

SIMONE RODRIGUES RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E DA SENSIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO
RÁPIDO (MCR) ISOLADAS DE PACIENTES SUBMETIDOS A
PROCEDIMENTOS INVASIVOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Salles Moura Fernandes
- UFMG

Coorientadora: Prof^a Dr^a Silvana Spíndola de Miranda -
UFMG

Belo Horizonte - MG

2013

R484c Ribeiro, Simone Rodrigues.
Caracterização molecular e da sensibilidade a antimicrobianos de micobactérias de crescimento rápido (MCR) isoladas de pacientes submetidos a procedimentos invasivos do Estado de Minas Gerais / Simone Rodrigues Ribeiro. – 2013.

117 f. : il.

Orientadora: Dra. Ana Paula Salles Moura.

Co-orientadora: Dra. Silvana Spíndola de Miranda.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Micobactérias - Teses. 2. Infecção – Teses. I. Moura, Ana Paula Salles. II. Miranda, Silvana Spíndola. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.01


FOLHA DE APROVAÇÃO


SIMONE RODRIGUES RIBEIRO


“Caracterização molecular e da sensibilidade a antimicrobianos de micobactérias de crescimento rápido (MCR), isoladas de pacientes submetidos a procedimentos invasivos do Estado de Minas Gerais”

Dissertação, como requisito parcial para obter o título de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e seis de fevereiro de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA


 Profa. Dra. Regina Maria Nardi Drummond – UFMG


 Dra. Mireille Ângela Bernardes Sousa - Hermes Pardini


 Profa. Dra. Silvana Spindola de Miranda - UFMG


 Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes - UFMG

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, pelos ensinamentos, pela força e por colocar pessoas especiais ao meu lado. Agradeço por esta etapa cumprida.

A Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes, com grande respeito e admiração, pela dedicação, disponibilidade, sabedoria e pela confiança em mim depositada.

A Profa. Dra. Silvana Spíndola de Miranda, pelo incentivo a pesquisa, ensinamentos e apoio.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFMG pela minha formação.

Ao Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG pelo apoio ao projeto e pelos excelentes professores.

A Fundação Ezequiel Dias, pela liberação dos dados e amostras, pela oportunidade de realização do mestrado, por acreditar e investir na capacitação de seus profissionais. A todos os servidores que de alguma forma apoiaram a realização do mesmo.

A todos os colegas e estagiários do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas, em especial do laboratório de micobactérias, pelo apoio técnico.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG, em especial Leopoldo e Elaine pelo auxílio na realização do sequenciamento.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UFMG, em especial Lúcia e Letícia, pelo auxílio na realização do MIC.

A Profa. Dra. Wânia da Silva Carvalho, por fazer parte do início da minha trajetória na pesquisa e pelo incentivo.

A Profa. Dra. Regina Maria Nardi Drummond e a Dra. Mireille Ângela Bernardes Souza pelas contribuições.

A João Paulo pelo incentivo, por acreditar em meus objetivos, por estar sempre ao meu lado dedicando amor, carinho e atenção e apoio.

A minha família pelos momentos juntos e pelo amor.

A Lídia e Simone, pela amizade, pelas palavras, pelo incentivo, pelo apoio nas horas difíceis e também pelos bons momentos vivenciados.

Aos Professores, colegas e funcionários da Pós Graduação que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Micobactérias de crescimento rápido (MCR) são patógenos oportunistas envolvidos especialmente em infecções associadas a procedimentos invasivos. Neste estudo, foram caracterizadas MCR isoladas de pacientes submetidos a procedimentos invasivos do Estado de Minas Gerais. Informações epidemiológicas e microbiológicas foram revisadas retrospectivamente, a partir dos registros laboratoriais. A tipagem molecular foi realizada por *PCR*, seguida de análise de fragmentos de restrição do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*) e *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR* (ERIC-PCR). Isolados de *M. abscessus* e *M. chelonae* foram avaliados para sensibilidade *in vitro* como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, empregando teste colorimétrico com rezasurina. Um total de 31 isolados de 20 pacientes foram recuperados da coleção de cepas da Fundação Ezequiel Dias, laboratório de referência do Estado, entre janeiro de 2007 e julho de 2011. A técnica de PRA-*hsp65* identificou 87,1% dos isolados analisados, correspondendo a *M. fortuitum*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *boletii*, *M. chelonae* e *M. peregrinum*. Procedimentos invasivos cirúrgicos representaram a maior parte dos casos (60%). Dentre as cirurgias, mamoplastia foi a mais frequente (50% dos casos). Casos eram oriundos de Belo Horizonte (30%), Uberaba (10%), Contagem (5%), Lavras (5%), Nova Lima (5%) e Uberlândia (5%). Com exceção de três isolados de *M. chelonae*, os diferentes isolados estudados não apresentaram vínculo epidemiológico. Quatro isolados apresentaram novo padrão PRA-*hsp65*. O ERIC-PCR foi útil na discriminação dos isolados, evidenciando maior diversidade genética que o PRA-*hsp65*, mas 100% de similaridade genética de dois isolados de *M. chelonae* envolvidos em um surto. Os dois isolados de *M. chelonae* foram sensíveis à amicacina, ciprofloxacino, claritromicina e doxiciclina, mas resistentes à sulfametoxazol e tobramicina. Isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* foram sensíveis a amicacina, apresentaram perfil intermediário para cefoxitina e foram resistentes ao sulfametoxazol. Isolados de *M. abscessus* subsp. *boletii* foram sensíveis à amicacina e claritromicina, apresentaram perfil intermediário para cefoxitina e foram resistentes à ciprofloxacino, doxiciclina e sulfametoxazol.

Palavras-chave: micobactérias de crescimento rápido, infecção.

ABSTRACT

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are opportunistic pathogens involved mainly in infections associated with invasive procedures. Here, we have characterized RGM isolated from patients undergoing invasive procedures, from the state of Minas Gerais. Microbiological and epidemiological information were reviewed retrospectively from laboratory records. For molecular typing, PCR followed by analysis restriction fragment length of the gene *hsp65* (PRA-*hsp65*) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) were applied. Isolates of *M. abscessus* and *M. chelonae* were evaluated for sensitivity in vitro as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute through a colorimetric assay using rezasurina. A total of 31 RGM isolated from specimens of 20 patients were recovered from the strain collection of Ezequiel Dias Foundation, between January 2007 and July 2011. The *hsp65* PRA technique allowed the identification of 87.1% RGM isolates, corresponding to *M. fortuitum*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolettii*, *M. chelonae* and *M. peregrinum*. Invasive surgical represented the majority of cases (60%). Among the surgery, mammoplasty was most common (50% of cases). Cases were concentrated in them Belo Horizonte (30%), Uberaba (10%), Contagem (5%), Lavras (5%), Nova Lima (5%) and Uberlândia (5%). Except for three clinical isolates of *M. chelonae*, different clinical isolates of RGM studied showed no epidemiological link. Four isolates showed PRA-*hsp65* pattern not reported in the literature. The ERIC-PCR was useful for discriminating clinical isolates of RGM, showing a higher degree of genetic heterogeneity as compared to PRA-*hsp65*, but 100% genetic similarity of two clinical isolates of *M. chelonae* involved in an outbreak. The two isolates of *M. chelonae* were susceptible to amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline, and sulfamethoxazole but resistant to tobramycin. All isolates of *M. abscessus* subsp. *abscessus* were sensitive to amikacin, profile showed intermediate to ceftazidime and were resistant to sulfamethoxazole. All isolates of *M. abscessus* subsp. *bollettii* were sensitive to amikacin and clarithromycin, profile showed intermediate to ceftazidime and were resistant to ciprofloxacin, doxycycline and sulfamethoxazole.

Keywords: Rapidly growing mycobacteria; infection.

LISTA DE FIGURAS

- 1** Diagrama dos componentes da parede celular micobacteriana. AG: arabinogalactano. MAPc: complexo formado por ácidos micólicos, arabinogalactano e peptidoglicano. Fonte: HETT & RUBIN, 2008, p. 128. 21
- 2** Infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido. (A) Infecção disseminada de tecido mole após o uso de esteróides sistêmicos. (B) Abscesso após injeção com solução de córtex adrenal contaminada. (C) Infecção associada à redução de mama. (D) Infecção associada à pedicure. (E) Infecção associada à cirurgia cosmética facial. Fonte: GROOTE & HUITT, 2006, p. 1759. 26
- 3** *Mycobacterium fortuitum* (bactéria álcool-ácido resistente) após coloração de Zielh-Neelsen de secção de tecido. Aumento de 1000 vezes (Adaptado de KOTHAVADE *et al.*, 2012)..... 35
- 4** Crescimento de micobactérias em meio Löwenstein-Jensen. Da esquerda para a direita: *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis*. Fonte: PALOMINO *et al.*, 2007, p.104. 37
- 5** Montagem da microplaca com as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) em cada orifício para cada antimicrobiano. CCC = Controle de Crescimento da Cepa, CEM = Controle de Esterilidade do Meio, AMK = amicacina, CIP = ciprofloxacino, CLA = claritromicina, DOX = doxiciclina, CEF = cefoxitina, SUL = sulfametoxazol e TOB = tobramicina. 63
- 6** Bactéria álcool-ácido resistente em esfregaço de cultura de MCR corado pelo método de Zielh-Neelsen. Aumento de 1000 vezes..... 69
- 7** Eletroforese em gel de agarose 3% de perfis de PRA-*hsp65* de 15 isolados clínicos e de cepas de referência com a enzima de restrição *BstEII*. M: Marcador de 50pb. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7: isolados clínicos incluídos no estudo. MT: *M. tuberculosis* ATCC® 27294. MA: *M. avium* subsp. *avium* ATCC® 25291. 71
- 8** Eletroforese em gel de agarose 3% de perfis de PRA-*hsp65* de 8 isolados clínicos e de cepa de referência com a enzima de restrição *HaeIII*. M: Marcador Low Range, Fermentas®. F1, F2,

F3, F4, F5, F6, F7 e F8: isolados clínicos incluídos no estudo. MT: <i>M. tuberculosis</i> ATCC® 27294.	71
9 Eletroforese em gel de agarose 3% de perfis de PRA- <i>hsp65</i> de 7 isolados clínicos e de cepa de referência com a enzima de restrição <i>HaeIII</i> . M: Marcador Low range, Fermentas®. Mass: <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS 594. A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7: isolados clínicos incluídos no estudo.	72
10 Eletroforese em gel de agarose 3% de perfis de PRA- <i>hsp65</i> de 5 isolados clínicos e de cepa de referência com as enzimas de restrição <i>BstEII</i> e <i>HaeIII</i> . M: marcador de 50pb. MT: <i>M. tuberculosis</i> ATCC® 27294. C1, C2, C3, C5 e C4: isolados clínicos incluídos no estudo.	72
11 Dendograma gerado por perfis PRA- <i>hsp65</i> de isolados clínicos de MCR e cepa de referência. Dendograma preparado utilizando coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979) e método de agrupamento UPGMA no programa <i>Treecon</i> . O número em cada bifurcação, determinado com base em 1.000 conjuntos de dados reamostrados (teste de <i>bootstrap</i>), é indicado em porcentagem. Escala de distância genética é mostrada na parte superior da figura. Identificação dos isolados é indicada a direita. MT: <i>M. tuberculosis</i> ATCC® 27294. MAS: <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS 594. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, C1, C2, C3, C4, C5, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7: isolados clínicos incluídos no estudo.	74
12 Eletroforese em gel de agarose dos perfis de ERIC-PCR obtidos pela análise de isolados clínicos de MCR de Minas Gerais e cepas de referência. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, C1, C2, C3, C4, C5, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7: isolados clínicos incluídos no estudo M: Marcador Φ X174 DNA/BsuRI. MT: <i>M. tuberculosis</i> ATCC® 27294; Ma: <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS 594; B: controle negativo da reação.	76
13 Dendograma gerado por ERIC-PCR dos isolados clínicos de MCR e cepas de referência. Dendograma preparado utilizando coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979) e método de agrupamento UPGMA no programa <i>Treecon</i> . O número em cada bifurcação, determinado com base em 1.000 conjuntos de dados reamostrados (teste de <i>bootstrap</i>), é indicado em porcentagem. Escala de distância genética é mostrada na parte superior da figura. Identificação dos isolados é indicada a direita. MT: <i>M. tuberculosis</i> ATCC® 27294. MAS: <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS 594. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, C1, C2, C3, C4, C5, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7: isolados clínicos incluídos no estudo.	77
14 Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para avaliação de método de extração de DNA de micobactérias de crescimento rápido para uso em ERIC-PCR. Padrões de bandas obtidos, de	

um mesmo isolado clínico, foram indistinguíveis quando a reação foi realizada com DNA extraído por método de choque térmico ou método CTAB. (1) marcador de peso molecular Φ X174 DNA/*Bsu*RI. (2) DNA de isolado de *M. fortuitum* extraído por método de choque térmico. (3) DNA de isolado de *M. fortuitum* extraído por método CTAB. (4) DNA de isolado de *M. abscessus* extraído por método de choque térmico. (5) DNA de isolado de *M. abscessus* extraído por método CTAB. 113

15 Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% de ERIC-PCR para comparação de perfis de ERIC-PCR obtidos para casos de pacientes com mais de um isolado clínico de MCR. (1 e 2) Isolados de *M. fortuitum*. (3 e 4) Isolados de *M. fortuitum*. (5 e 6) Isolados de *M. fortuitum*. (7, 8 e 9) Isolados de *M. abscessus*. 114

16 Amplificação de fragmento de 764 pb do gene *rpoB*. M: Marcador de 100pb; B: controle negativo da reação; A5, A6, A7 e C4: isolados incluídos no estudo. 117

17 Amplificação de fragmento de 764 pb do gene *rpoB* a partir dos plasmídeos recombinantes. M: Marcador de 100pb; P: controle negativo do plasmídeo sem o inserto de 764pb; B: controle negativo da reação de PCR; A5, A6, A7 e C4: isolados incluídos no estudo. 117

LISTA DE TABELAS

1 Infecções de pele e tecidos moles causadas por micobactérias de crescimento rápido.	27
2 Testes úteis para a identificação das micobactérias de crescimento rápido mais frequentemente isoladas de material clínico.	38
3 Antimicrobianos usados para o tratamento de espécies de MCR mais comumente encontradas.	45
4 Concentração das soluções de uso de antimicrobianos.	62
5 Critérios de interpretação para microdiluição em meio líquido para MCR.	65
6 Dados epidemiológicos de pacientes com isolamento de MCR após procedimentos invasivos em Minas Gerais.	67
7 Distribuição dos casos de isolados de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais, quanto ao procedimento.....	68
8 Distribuição dos casos de isolados de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais, quanto ao tipo de procedimento.....	68
9 Distribuição dos casos de isolados de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais, quanto ao município de ocorrência.....	69
10 Perfis de PRA-<i>hsp65</i> dos isolados clínicos de MCR de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais.	70
11 Distribuição dos casos de isolados de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais, segundo a espécie de MCR.....	73

12 MIC de <i>M. chelonae</i> isoladas de pacientes de Minas Gerais.	79
13 Interpretação de MIC de <i>M. chelonae</i> isoladas de pacientes de Minas Gerais.	79
14 MIC de <i>M. abscessus</i> isoladas de pacientes de Minas Gerais.	80
15 Interpretação de MIC de <i>M. abscessus</i> isoladas de pacientes de Minas Gerais.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar
AG	Arabinogalactano
AMK	Amicacina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BLAST	<i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
<i>Bst</i> EI	Endonuclease de restrição isolada de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
CCC	Controle de crescimento da cepa
CEF	Cefoxitina
CEM	Controle de esterilidade do meio
CIP	Ciprofloxacino
CLA	Claritromicina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
DOX	Doxiciclina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
ERIC-PCR	PCR de <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
<i>erm</i>	gene metilase induzível
<i>Hae</i> III	Endonuclease de restrição isolada de <i>Haemophilus aegypticus</i>
<i>hsp65</i>	Gene que codifica proteína de choque térmico de 65kDa
I	Intermediário
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodaltons
LACEN-MG	Laboratório Central Saúde Pública de Minas Gerais
LASIK	<i>Laser-Assisted in Situ Keratomileusis</i>
MA	ácidos micólicos
MAPc	Complexo formado por ácidos micólicos, arabinogalactano e peptidoglicano
MCR	micobactéria de crescimento rápido
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIC	concentração inibitória mínima, do inglês, <i>minimum inhibitory concentration</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
MNT	micobactéria não tuberculosa
MOTT	<i>mycobacteria other than tubercle bacilli</i>
MS	Ministério da Saúde
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
ng	nanograma
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em gel em campo pulsado, do inglês, <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PG	peptidoglicano
pH	potencial hidrogeniônico
pmoles	picomoles
PNB	ácido p-nitrobenzóico
PRA	análise dos fragmentos de restrição
PRA- <i>hsp65</i>	reação em cadeia da polimerase seguida de clivagem com endonucleases e análise dos fragmentos de restrição do gene <i>hsp65</i>
R	Resistente
RAPD	<i>Randomly amplification of polymorphic DNA</i>
RAPD-PCR	PCR <i>Randomly amplification of polymorphic DNA</i>
rpm	rotações por minuto

<i>rpoB</i>	gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase
rRNA	RNA ribossomal
S	Sensível
SDBF	Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SUL	Sulfametoxazol
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCH	ácido tiofeno 2-carboxílico
TOB	Tobramicina
U	Unidade
UFC	Unidade formadora de colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3- indolyl-b-D-galactoside
β -gal	β galactosidade

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
\geq	Maior ou igual
\leq	Menor ou igual
\pm	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Micobactérias	20
1.2	Micobactérias não tuberculosas	22
1.3	Micobactérias de crescimento rápido	24
1.4	Micobactérias de crescimento rápido de interesse clínico	28
1.4.1	<u>Grupo <i>Mycobacterium fortuitum</i></u>	29
1.4.2	<u>Grupo <i>Mycobacterium chelonae-abscessus</i></u>	29
1.4.3	<u>Grupo <i>Mycobacterium mucogenicum</i></u>	32
1.4.4	<u>Grupo <i>Mycobacterium smegmatis</i></u>	33
1.5	Diagnóstico de infecção por MCR	33
1.5.1	<u>Diagnóstico microbiológico de infecções por MCR</u>	34
1.6	Identificação de micobactérias	36
1.7	Métodos moleculares	38
1.8	Testes de sensibilidade aos antimicrobianos	43
1.9	Epidemiologia de infecções por MCR no Brasil	47
1.9.1	<u>Casos notificados</u>	48

1.10	Prevenção	50
2	JUSTIFICATIVA.....	52
3	OBJETIVOS.....	55
3.1	Objetivo geral.....	55
3.2	Objetivos específicos.....	55
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1	Aspectos éticos.....	56
4.2	Seleção de isolados.	56
4.3	CrITÉRIOS de inclusão.....	57
4.4	CrITÉRIOS de exclusão.....	57
4.5	Dados epidemiológicos.....	57
4.6	Obteno dos isolados	58
4.7	Triagem fenotípica	58
4.8	Identificao e tipagem molecular.....	58
4.8.1	<u>Extrao de DNA</u>	58
4.8.2	<u>PRA-hsp65</u>	59
4.8.3	<u>ERIC-PCR</u>	60

4.9	Teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos.....	61
4.9.1	<u>Agentes antimicrobianos</u>.....	61
4.9.2	<u>Preparo da solução de uso de antimicrobianos</u>.....	62
4.9.3	<u>Preparo das diluições em microplaca</u>.....	62
4.9.4	<u>Preparo da suspensão bacteriana (inóculo)</u>.....	63
4.9.5	<u>Inoculação e incubação das microplacas</u>.....	64
4.9.6	<u>Leitura do teste</u>.....	64
4.9.7	<u>Interpretação dos resultados</u>.....	65
5	RESULTADOS.....	66
5.1	Identificação bacteriana.....	69
5.2	ERIC-PCR.....	75
5.3	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	78
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONCLUSÕES.....	95
8	PERSPECTIVAS.....	97
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	110
ANEXO B - Ficha de notificação de caso de micobacteriose não tuberculosa (MCR) após procedimentos médicos invasivos	111
APÊNDICE A – Protocolo para extração de DNA utilizando CTAB	112
APÊNDICE B – Padronização do método de extração para ERIC-PCR	113
APÊNDICE C – Comparação de isolados clínicos de um mesmo paciente, colhidos em momentos distintos, pela técnica de ERIC-PCR	114
APÊNDICE D – Protocolos para sequenciamento parcial do gene <i>rpoB</i>	115
APÊNDICE E – Primeiros resultados do sequenciamento do gene <i>rpoB</i>	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Micobactérias

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único da família *Mycobacteriaceae*, associadas ao domínio Archea, filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae (BRENNER *et al.*, 2005; EUZÉBY, 2012).

O gênero *Mycobacterium* compreende mais de 150 espécies (EUZÉBY, 2012), entre as quais se incluem o Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. cannetii*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedi*. Todas as micobactérias, exceto o Complexo *M. tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, são conhecidas como micobactérias não tuberculosas (MNT) e constituem a maioria das espécies do gênero *Mycobacterium* (TORTOLI, 2003).

As micobactérias são bacilos retos ou ligeiramente curvos, medem de 0,2 a 0,6 μm de largura e 1 a 10 μm de comprimento, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e não possuem esporos ou cápsulas (HOLT *et al.*, 1994).

A parede celular micobacteriana consiste de uma camada interna e uma camada externa que rodeiam a membrana plasmática. O compartimento exterior é constituído por lipídeos e proteínas. Frequentemente, os lipídeos são associados com a parede celular, com alguns ácidos graxos de cadeia longa e curta complementando as cadeias curtas e longas encontradas na camada interna. O compartimento interior consiste de peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG), e ácidos micólicos (MA) covalentemente ligados entre si para formar um complexo conhecido como o complexo MAPc, que se estende a partir da membrana plasmática para fora, em camadas, começando com PG e terminando com MA (**Figura 1**). Este complexo é insolúvel e se refere como o núcleo essencial da parede celular micobacteriana (HETT & RUBIN, 2008).

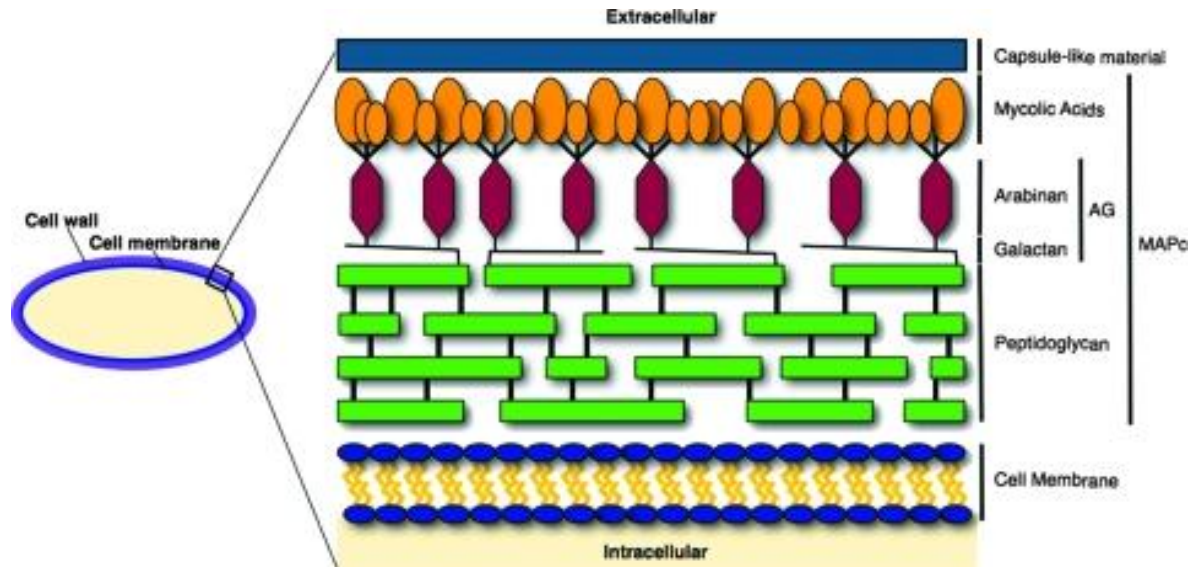


Figura 1 - Diagrama dos componentes da parede celular micobacteriana. AG: arabinogalactano. MAPc: complexo formado por ácidos micólicos, arabinogalactano e peptidoglicano. Fonte: HETT & RUBIN, 2008, p. 128.

A parede celular de uma micobactéria tem características únicas e é impermeável a uma série de compostos, incluindo antibióticos e desinfetantes (por exemplo, o cloro). São caracterizadas por possuírem elevado conteúdo lipídico em sua parede (30 a 40% de seu peso total), com estrutura própria, que apresenta uma organização diferente de outros procariotos. A complexidade da parede micobacteriana, em particular a riqueza de lipídeos complexos, explica, em parte, as propriedades de resistência das micobactérias aos agentes químicos (RASTOGI, 2001). Os ácidos micólicos, que constituem mais de 50% dos componentes lipídicos da parede, formam uma cobertura que permite a micobactéria ser resistente à dessecação, podendo sobreviver por períodos prolongados em condições extremas. Essa proteção é importante na resistência aos antibióticos, pois a grande maioria é incapaz de penetrar na parede celular (PRIMM *et al.*, 2004).

O tempo de multiplicação das micobactérias é geralmente lento (quando comparado com *Escherichia coli*), com grande variação dentro do gênero. A temperatura de crescimento é também variável de acordo com a espécie, e oscila entre 25°C a 45°C, assim como a morfologia das colônias. Colônias de micobactérias podem ser de aspecto liso ou rugoso e algumas, na presença ou ausência de luz, apresentam pigmentos carotenóides (BRASIL, 2008a; GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

O crescimento lento das micobactérias deve-se ao baixo número (uma ou duas cópias) de óperons rRNA (*Escherichia coli* possui sete cópias), à impermeabilidade da parede celular, rica em lipídeos e o custo energético da síntese de ácidos micólicos de cadeia longa. A parede celular complexa rica em lipídeos, que concede às mesmas a propriedade de ácido resistência, também resulta numa superfície celular hidrofóbica, que é um determinante principal da distribuição ambiental. Elas se fixam em superfícies simplesmente por interações hidrofóbicas e podem formar biofilmes, um fator importante na sobrevivência em sistemas de abastecimento de água potável, por exemplo. Bacilos hidrofóbicos formam aerossóis mais facilmente, um mecanismo importante de acesso pulmonar em hospedeiros animais. A parede celular também desempenha um importante papel na sobrevivência intracelular durante infecções de animais e protozoários, uma parte importante do ciclo de vida de micobactérias (PRIMM *et al.*, 2004).

Runyon, em 1959, classificou as micobactérias em quatro grupos, I, II, III e IV, usando como critério o tempo de crescimento “*in vitro*” e a produção de pigmentos carotenóides. Os grupos de crescimento lento são grupo I (fotocromógenas, que produzem pigmento somente na presença de luz), grupo II (escotocromógenas, que produzem pigmento também na ausência de luz) e grupo III (acromógenas, que não produzem pigmento). O grupo IV, composto por micobactérias de crescimento rápido (MCR), inclui espécies pigmentadas ou não (RASTOGI, 2001).

1.2 Micobactérias não tuberculosas

Micobactérias não tuberculosas (MNT), também denominadas micobactérias “atípicas” ou “outras micobactérias que não o bacilo da tuberculose” (MOTT, do inglês: *mycobacteria other than tubercle bacilli*) compreendem mais de 120 espécies reconhecidas. MNT são distinguidas dos membros do Complexo *M. tuberculosis* e do *M. leprae* pelo fato de que elas não são patógenos obrigatórios, mas são verdadeiros habitantes do meio ambiente. A fonte de infecção dos seres humanos é o ambiente com base na ausência de transmissão de humano para humano (FALKINHAM, 2009; PIERSIMONI & SCARPARO, 2009). Algumas espécies de MNT

são ubíquas e outras têm distribuição mais restrita. O tratamento das infecções por esses agentes pode ser difícil e varia de acordo com os organismos envolvidos e o local da doença. A patogênese ainda é indefinida, dependendo da interação entre o microrganismo e o sistema imune do hospedeiro (PIERSIMONI & SCARPARO, 2009).

As MNT são habitantes normais de uma grande variedade de reservatórios ambientais, incluindo solo, água de fontes naturais e tratadas e aerossóis (FALKINHAM, 1996, 2002; GROOTE & HUITT, 2006; PRIMM *et al.*, 2004). Elas podem ser adquiridas por inalação, ingestão ou inoculação direta na pele (GRIFFITH *et al.*, 2007).

A baixa virulência e a ausência de transmissão de humano para humano são as características mais importantes que distinguem MNT do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, porém a patogenicidade das MNT não deve ser subestimada, especialmente em hospedeiro imunocomprometido (TORTOLI, 2006). As MNT podem ser encontradas como patógenos ocasionais, oportunistas ou espécies saprófitas e têm impactos significativos sobre a morbidade e mortalidade de humanos e impactos econômicos importantes na agricultura (PRIMM *et al.*, 2004).

O isolamento de MNT a partir de uma amostra clínica pode representar infecção, colonização, ou pseudoinfecção. "Colonização" é definida como o estabelecimento de MNT dentro da microbiota do paciente, sem evidência de doença ou invasão de tecidos. A "pseudoinfecção" é definida como um isolamento de MNT resultante de um paciente sem evidência de infecção ou verdadeira colonização, que normalmente é causada por contaminação durante manuseamento de amostras (PHILLIPS & REYN, 2001), de instrumentos ou soluções (GROOTE & HUITT, 2006).

Embora relatos tenham sugerido que a incidência de infecções causadas por MNT tem aumentado ao longo dos últimos anos, dados ainda são escassos (PIERSIMONI & SCARPARO, 2009; SET & SHASTRI, 2011). Além do fato de que infecções por MNT não são usualmente reportadas para órgãos de saúde pública,

há ausência de estudos epidemiológicos sistemáticos, definições de casos padrão e de identificação precisa de micobactérias (GRIFFITH *et al.*, 2007; SET & SHASTRI, 2011).

Cerca de 90% dos casos de infecções por MNT envolvem o sistema pulmonar. As infecções extrapulmonares envolvem gânglios linfáticos, pele, tecidos moles e ossos e, menos frequentemente relatados, doença do sistema nervoso central, ceratite e otite média (GRIFFITH *et al.*, 2007; PIERSIMONI & SCARPARO, 2009).

Apesar de um aumento considerável no conhecimento sobre infecções por MNT, elas ainda representam um desafio diagnóstico e terapêutico. Isolados patogênicos de MNT podem ser indistinguíveis de isolados contaminantes ou saprófitas. A identificação oportuna e confiável dos isolados pode depender de uma comunicação adequada entre o médico e o laboratório. Por fim, a falta de diretrizes de tratamento em alguns casos expõe os pacientes a drogas tóxicas e resultados decepcionantes (PIERSIMONI & SCARPARO, 2009).

1.3 Micobactérias de crescimento rápido

O termo “micobactéria de crescimento rápido” inclui micobactérias que formam colônias em meio sólido em sete dias de subcultivo (van INGEN *et al.*, 2009; GROOTE & HUITT, 2006). Atualmente, existem mais de 80 espécies de MCR descritas, das quais cerca de 50 foram relacionadas com infecções humanas (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

Assim como descrito para as demais MNT, o ambiente constitui a principal fonte de MCR na infecção humana (GRIFFITH *et al.*, 2007). Por causa da sua ubiquidade, infecções por MCR têm sido relatadas em diversas áreas geográficas do mundo. MCR são extremamente resistentes e prosperam mesmo nos ambientes mais hostis. Além disso, são resistentes a desinfetantes e biocidas, tais como

organomercuriais e cloro e podem contaminar soluções, medicamentos e equipamentos médicos (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002).

Entre as MNT, MCR são patógenos humanos emergentes importantes que podem causar uma variedade de doenças, desde infecção cutânea localizada até doença disseminada (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002).

Doenças causadas por MCR (**Figura 2**) incluem infecções traumáticas e de sítio cirúrgico, infecções de pele e tecidos moles, abscessos após injeção, doença do sistema nervoso central, infecções pulmonares, doença de ossos e articulações, e infecções associadas a cateteres (GARCIA-MARTOS & GARCIA-AGUDO, 2012; SET & SHASTRI, 2011).

Embora a infecção por MCR seja comum em pacientes imunocomprometidos (uso de esteróides, HIV e malignidade) ou em pacientes com antecedente de doença crônica (fibrose cística), ela também pode ocorrer em pacientes previamente saudáveis com uma história de procedimentos invasivos (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

Tem-se observado um notável aumento de infecções por MCR em todo o mundo durante as últimas três décadas, principalmente infecções pós-traumáticas e pós-operatórias, e em anos recentes, infecções localizadas e disseminadas e surtos de infecção (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

Estas infecções emergentes são cada vez mais importantes, especialmente por causa de sua associação com procedimentos cirúrgicos. A prevalência de infecções devido à MCR é desconhecida, mas provavelmente subestimada dada a ampla gama de síndromes associadas e a falta de conhecimento sobre estes organismos por muitos clínicos. O diagnóstico é muitas vezes retardado, pois culturas de micobactérias não são rotineiramente realizadas em amostras de biópsia de pele ou infecção de ferida cirúrgica (USLAN *et al.*, 2006).



Figura 2 - Infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido. (A) Infecção disseminada de tecido mole após o uso de esteróides sistêmicos. (B) Abscesso após injeção com solução de córtex adrenal contaminada. (C) Infecção associada à redução de mama. (D) Infecção associada à pedicure. (E) Infecção associada à cirurgia cosmética facial. Fonte: GROOTE & HUITT, 2006, p. 1759.

Na literatura, há relatos destas micobactérias como agentes causadores de infecções nosocomiais esporádicas e associadas a cuidados de saúde, incluindo diálise renal, biópsia, cirurgias plásticas, cirurgias cardíacas, oftalmológicas, laparoscópicas e abscesso pós-injeção (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002; SAMPAIO *et al.*, 2006c; VIANA-NIERO *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2009).

Manifestações clínicas de doença por MCR dependem da imunocompetência da pessoa infectada. Infecções de pele e tecidos moles (**Tabela 1**) podem aparecer como uma única lesão em uma pessoa imunocompetente, usualmente após trauma penetrante ou procedimento cirúrgico invasivo no sítio da infecção, ou podem aparecer como lesões múltiplas ou disseminadas, usualmente associadas com tratamentos imunossupressores ou outras condições imunossupressivas (PIERSIMONI & SCARPARO, 2009). A maioria das infecções ocorre 4 a 6 semanas após o evento traumático (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Infecções de pele e tecidos moles causadas por micobactérias de crescimento rápido

Tipo de infecção ou procedimento	Achados clínicos
Infecções de feridas pós-traumáticas	Abscessos subcutâneos, celulites
Pedicures	Furunculoses
Injeções subcutâneas, intra-articulares ou periarticulares	Abscessos subcutâneos, nódulos dolorosos, sinusite, infecções comuns, febre, calafrios após injeção.
Acupuntura	Pápulas eritematosas, nódulos, lesões ulcerativas, abscessos, placas confluentes, drenagem de tratos sinusais, tenossinovite.
Cirurgia cardíaca	Infecção da ferida esternal, endocardite.
Cirurgia plástica ou outros procedimentos cirúrgicos: lipoaspiração, lipoescultura, <i>lift</i> na face, mamoplastia (redução e aumento), injeção de silicone.	Eritema, sensibilidade, nódulos da pele, endurecimento, abscessos subcutâneos ou em tecido profundo, febre, mal-estar, múltiplos abscessos ao longo do trato de aspiração, dor local, inchaço.
<i>Piercing</i> nos mamilos	Nódulos assintomáticos, nódulos sensíveis.
Implantados com prótese	Abscessos
Colocação de marca-passo	Abscessos
Cateter de diálise peritoneal	Abscessos

Traduzido e adaptado de PIERSIMONI & SCARPARO, 2009.

Uso de cateteres, longa duração do cateterismo e antibioticoterapia prévia são causas de bacteremia, infecção de cateter, meningite e peritonite. Lesões, soluções anestésicas locais contaminadas, corticosteróides em frascos multiuso, injeções no córtex adrenal ou agulhas reutilizadas em mesoterapia estão relacionadas como causas de infecções da pele e tecidos moles, após traumas ou injeção. Instrumentos cirúrgicos, implantes, próteses valvares, cânulas, material de sutura ou soluções, assim como cirurgia a laser para correção da visão, procedimentos faciais, abdominoplastia, lipoaspiração, mamoplastia de aumento ou de redução e perfuração para colocação de *piercing* são consideradas as causas de infecção pós-operatória, especialmente quando a cirurgia é realizada sob condições não controladas corretamente (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

1.4 Micobactérias de crescimento rápido de interesse clínico

A cada ano são descritas novas espécies implicadas em infecções nosocomiais, assim como infecções em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos, graças aos modernos sistemas de diagnóstico molecular. Esta tecnologia tem permitido a identificação de um bom número de espécies novas, algumas delas de difícil crescimento em meios sólidos convencionais ou ausência de completa tipificação com métodos bioquímicos clássicos (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

As MCR predominantes nas infecções humanas são pertencentes aos grupos *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae-abscessus*, *Mycobacterium mucogenicum* e *Mycobacterium smegmatis*. As espécies restantes são minoritárias e o isolamento é ocasional (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

1.4.1 Grupo *Mycobacterium fortuitum*

O grupo *Mycobacterium fortuitum* inclui as espécies *M. fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium senegalese*, *Mycobacterium mageritense* e várias espécies descritas recentemente, como *Mycobacterium septicum*, *Mycobacterium alvei*, *Mycobacterium houstonense*, *Mycobacterium boenickei*, *Mycobacterium conceptionense*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium neworleansense* e *Mycobacterium brisbanense* (ADÉKAMBI & DRANCOURT, 2004; BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002; GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

Espécies do grupo *M. fortuitum* ocorrem na maioria dos casos de infecção cutânea localizada por MCR, mas é rara causa de doença crônica pulmonar e doenças disseminadas (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002; BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012).

1.4.1.1 *Mycobacterium fortuitum*

A maioria das infecções causadas por *M. fortuitum* são secundárias a traumas nos quais há quebra da barreira cutânea. Dessa forma, *M. fortuitum* causa infecção localizada pós-traumática, infecção de cateter, infecção de sítio cirúrgico, como na cirurgia cardíaca e mamoplastia de aumento (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012).

1.4.2 Grupo *Mycobacterium chelonae-abscessus*

O grupo *Mycobacterium chelonae-abscessus* é composto por três espécies: *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium immunogenum* e *Mycobacterium abscessus*, sendo esta última dividida em duas subespécies, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* e *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. A

subespécie *M. abscessus* subsp. *bolletii* acomoda micobactérias previamente identificadas como *Mycobacterium bolletii* e *Mycobacterium massiliense*. (ADÉKAMBI *et al.*, 2006; EUZÉBY, 2006; LEÃO *et al.*, 2009; LEÃO *et al.*, 2011).

As infecções nosocomiais, ou relacionadas aos cuidados com a saúde, causadas por espécies do Grupo *Mycobacterium chelonae-abscessus*, representam um problema emergente no Brasil e em vários países (BRASIL, 2009b).

Além da capacidade de multiplicação e sobrevivência em condições de escassez de nutrientes, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. immunogenum* podem ser resistentes ao cloreto de benzalcônio, compostos organo-mercuriais, cloro, glutaraldeído e clorexidina (BRASIL, 2009b).

1.4.2.1 Mycobacterium abscessus

Mycobacterium abscessus foi primeiramente descrita em 1953, mas somente em 1992, *M. abscessus* adquiriu o reconhecimento de importante patógeno humano responsável por um amplo espectro de infecções (NESSAR *et al.*, 2012). Dentre as MCR, *M. abscessus* é o mais notório agente causador de doença (JARAND *et al.*, 2011; van INGEN *et al.*, 2012) e é a mais patogênica e mais resistente aos quimioterápicos (PETRINI, 2006).

M. abscessus causa infecções adquiridas na comunidade e infecções relacionadas a procedimentos invasivos. No primeiro caso, é um patógeno pulmonar em pacientes predispostos, cujo quadro clínico mais comum é a doença pulmonar crônica em pacientes com alterações anatômicas e ou funcionais pulmonares ou ainda em pacientes com doença granulomatosa crônica como tuberculose ou sarcoidose. Além disso, *M. abscessus* possui um distinto potencial patogênico quando inoculado no tecido normal. Infecções extrapulmonares adquiridas na comunidade usualmente consistem em infecções cutâneas nas quais há uma quebra da barreira cutânea e contato com solo ou água contaminada (BRASIL, 2009b; PETRINI, 2006).

Nos últimos anos, estudos determinaram mudanças na nomenclatura das MCR. Estudos taxonômicos demonstraram que a diferenciação de três espécies do grupo (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense* e *Mycobacterium bollettii*) não é simples e duas subespécies de *M. abscessus* foram validadas após extensiva caracterização. Uma delas, denominada *Mycobacterium abscessus* subsp. *bollettii*, inclui todos os isolados com o perfil de restrição para segmento do gene *hsp65* (técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR, seguida de clivagem com endonucleases e análise dos fragmentos de restrição do gene *hsp65* - PRA-*hsp65*) de *Mycobacterium abscessus* tipo II e também aqueles identificados por sequenciamento de *rpoB* como *Mycobacterium massiliense* ou *Mycobacterium bolletti*. A outra subespécie, denominada *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*, apresenta perfil PRA-*hsp65* correspondente a *Mycobacterium abscessus* tipo I (LEÃO *et al.*, 2009; LEÃO *et al.*, 2011).

O *M. abscessus* subsp. *abscessus* causa infecção respiratória crônica, infecção localizada pós-traumática, infecção de cateter, infecção cutânea disseminada, infecção ocular. O *M. abscessus* subsp. *bollettii* causa doença respiratória crônica, infecção localizada pós-traumática, infecção pós-cirúrgica, infecção de cateter (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012).

1.4.2.2 *Mycobacterium chelonae*

M. chelonae é descrita como agente de infecções adquiridas na comunidade e infecções nosocomiais, mas em contraste com *M. abscessus*, raramente causa infecção do trato respiratório. É uma das micobactérias mais frequentes em pacientes imunocomprometidos e mostra uma maior resistência aos antibióticos. De modo similar a *M. abscessus*, *M. chelonae* causa infecções adquiridas na comunidade e relacionadas a traumas abertos, onde houve exposição a solo, água ou objetos contaminados. A infecção cutânea é o quadro clínico mais habitual, às vezes com disseminação. Pode causar também infecção localizada pós-traumática,

sinusite e infecção ocular (BRASIL, 2009b; BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012; GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

1.4.2.3 *Mycobacterium immunogenum*

Os estudos que culminaram com a descrição desta espécie foram iniciados com a investigação de um surto de pneumonite de hipersensibilidade entre trabalhadores em indústria metalúrgica. A espécie *M. immunogenum* já foi isolada a partir de diversas amostras clínicas, como pele de paciente receptor de transplante hepático, córnea, sítio de inserção de cateter vascular, líquido sinovial, lavado bronco-alveolar, sítio de inserção de marca-passo e sangue (BRASIL, 2009b).

1.4.3 Grupo *Mycobacterium mucogenicum*

O grupo *Mycobacterium mucogenicum* compreende as espécies *M. mucogenicum*, *Mycobacterium aubagnense* e *Mycobacterium phocaicum* (ADÉKAMBI, 2009).

O *M. mucogenicum* é encontrado frequentemente em água potável, tem demonstrado a sua capacidade patogênica e tem sido associado com surtos de infecção hospitalar em pacientes submetidos à diálise, com infecções relacionadas a cateteres intravenosos, infecções do sistema nervoso central, respiratórias e infecção de pele e tecidos moles, bacteremia e infecção disseminada (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

1.4.4 Grupo *Mycobacterium smegmatis*

O grupo *Mycobacterium smegmatis* é composto de *M. smegmatis*, *Mycobacterium wolinskyi* e *Mycobacterium goodii* (ADÉKAMBI & DRANCOURT, 2004; BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002; GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

O grupo *Mycobacterium smegmatis*, que foi inicialmente considerado como não patogênico, é agora conhecido por causar doenças adquiridas na comunidade e doenças associadas a cuidados de saúde. Estas incluem celulite pós-traumática, abscesso localizado e osteomielite de sítio cirúrgico. Raramente *M. smegmatis* pode estar envolvido em doença pulmonar (SET & SHASTRI, 2011).

1.5 Diagnóstico de infecção por MCR

O diagnóstico de doença por MNT exige cautela. Uma vez que a patogenicidade das MNT para humanos varia de colonização inócua à doença, a determinação do significado clínico de uma MNT detectada numa amostra clínica nem sempre é fácil e requer critérios específicos (LEÃO *et al.*, 2004). É preciso considerar os dados clínicos do paciente, a fonte de isolamento, as características microbiológicas do cultivo e a presença da mesma cepa em outras amostras e em cultivos repetidos da mesma amostra. Também é importante considerar a evolução do paciente ao tratamento específico (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

No caso de pacientes submetidos a procedimentos invasivos no Brasil, o raciocínio diagnóstico de infecção por MCR deverá levar em consideração os aspectos epidemiológicos, clínicos e resultados de exames complementares. As evidências epidemiológicas estão associadas a pacientes submetidos a procedimentos invasivos que apresentem sinais de flogose persistente por mais de uma semana. O componente clínico relaciona-se a pacientes apresentando lesões

eritematosas de difícil cicatrização, nodulares, com ou sem drenagem de secreção, fístulas, ulcerações, abscesso quente ou frio, não responsivo aos tratamentos antimicrobianos convencionais. Exames complementares envolvem testes microbiológicos, ultrassonografia, tomografia ou ressonância magnética (BRASIL, 2009b).

Casos envolvendo surtos de infecção por micobactéria são classificados como suspeitos ou confirmados. Caso suspeito corresponde a paciente submetido a procedimento invasivo que apresenta os sinais e sintomas associados à clínica compatível, que não apresenta resposta aos antimicrobianos utilizados para os agentes etiológicos habituais e que aguarda resultado laboratorial para MCR. Caso confirmado corresponde a paciente exposto a procedimento invasivo que apresenta os sinais e sintomas clínicos compatíveis (dois ou mais) e que apresenta cultura positiva para MCR; ou ainda que apresenta granuloma, com ou sem necrose caseosa, no estudo anatomopatológico de peça ressecada e que apresenta vínculo epidemiológico com casos confirmados de MCR (BRASIL, 2009b).

1.5.1 Diagnóstico microbiológico de infecções por MCR

O diagnóstico etiológico é feito pela análise microbiológica de espécimes clínicos (tecidos e secreções), demonstrando a presença do microrganismo (BRASIL, 2009b). Este inclui a observação microscópica direta (baciloscopia) das amostras clínicas, o cultivo das mesmas em meios seletivos e a identificação das espécies mediante técnicas fenotípicas, cromatográficas e moleculares (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

A baciloscopia é a pesquisa de Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR) em um esfregaço de amostra clínica, preparado e corado com metodologia padronizada. É um exame apenas presuntivo, pois permite a visualização de BAAR presentes na amostra, mas não a sua identificação. Vários métodos de coloração têm sido desenvolvidos na microscopia para BAAR, dentre eles os métodos baseados na utilização de fucsina fenicada como corante primário, como os métodos de Ziehl-

Neelsen (**Figura 3**) e Kinyoun modificado, e também métodos utilizando fluorocromos específicos, como a auramina O e auraminarodamina (BRASIL, 2008a).

A cultura é um método mais sensível que a baciloscopia, possibilitando, além de um aumento da cobertura diagnóstica dos casos paucibacilares, a identificação das espécies e/ou realização dos testes de sensibilidade às drogas (BRASIL, 2005). A identificação da espécie e a determinação do perfil de sensibilidade direcionam para a correta terapêutica (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002). Dada à diversidade de espécies, os diferentes perfis de sensibilidade observados para cada grupo de espécies e o número limitado de opções terapêuticas, o diagnóstico microbiológico obtido por cultura específica para micobactérias deve ser priorizado (BRASIL, 2009b).

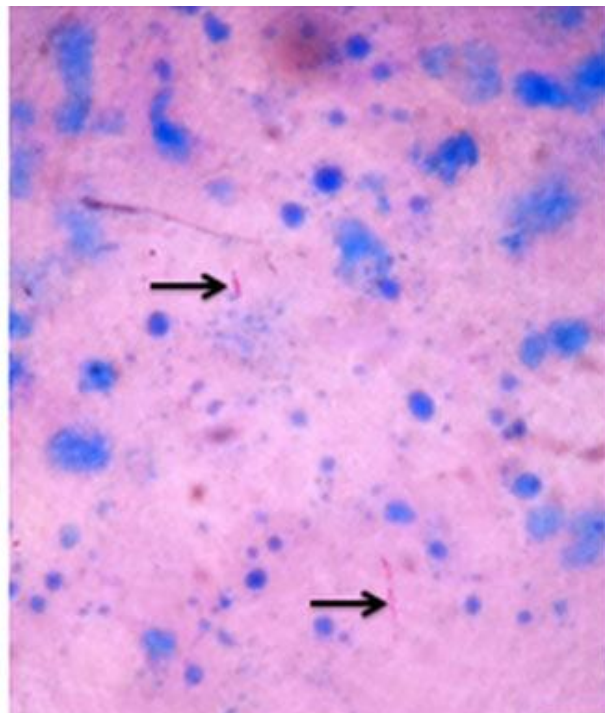


Figura 3 - *Mycobacterium fortuitum* (bactéria álcool-ácido resistente) após coloração de Ziehl-Neelsen de secção de tecido. Aumento de 1000 vezes (Adaptado de KOTHAVADE *et al.*, 2012).

Cultura é o exame laboratorial que permite a multiplicação e o isolamento de micobactérias a partir da semeadura da amostra clínica em meios de cultura específicos para tais agentes. Espécimes clínicos para cultura podem ser inoculados em meios de cultura sólidos ou líquidos. Os meios de cultura sólidos são à base de

ovos, como os meios Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh, ou meios à base de ágar, como os meios Middlebrook 7H10 e 7H11. Meios de cultura líquidos, como o Middlebrook 7H9, recuperam maior número de micobactérias que o meio sólido e podem ser processados em sistemas de incubação e leitura automatizados (BRASIL, 2008a).

Após a realização da semeadura nos meios de cultura indicados, estes são colocados em temperaturas apropriadas e constantes, para o tempo de incubação necessário ao desenvolvimento de micobactérias. A maioria das espécies necessita de temperaturas entre 35°C e 37°C para multiplicação. A leitura deve ser feita após 48 horas de incubação e, posteriormente, em até sete dias para verificação do crescimento bacteriano. Micobactérias de crescimento lento requerem verificação de crescimento até completar oito semanas (BRASIL, 2008a).

1.6 Identificação de micobactérias

A identificação precisa das bactérias do gênero *Mycobacterium* torna-se cada vez mais problemática devido ao aumento constante do número de espécies e porque estas são estreitamente mais relacionadas entre si em termos genéticos, em comparação com os microrganismos pertencentes a outros gêneros (TORTOLI, 2003).

As micobactérias podem ser diferenciadas em espécies por métodos fenotípicos, com base em investigações bioquímicas e culturais (**Figura 4**), que incluem um conjunto de testes, tais como determinação de tempo e temperatura de crescimento (que varia de 25 a 45°C), produção de pigmento, capacidade de crescimento em meios seletivos e testes enzimáticos. Micobactérias de crescimento rápido, como definido anteriormente (item 1.3), caracterizam-se por crescimento em meio sólido em menos de sete dias e apresentam colônias pigmentadas ou não (BRASIL, 2008a). Testes bioquímicos úteis (**Tabela 2**) para a identificação de MCR mais frequentemente isoladas de espécime clínico incluem: crescimento em NaCl 5%; crescimento em ácido pícrico, crescimento em meio com ácido p-nitrobenzóico

(PNB), teste de redução do nitrato, detecção da enzima arilsulfatase em 3 dias, detecção da enzima β -galactosidase, captação do ferro, hidrólise do tween 80, utilização dos substratos manitol, inositol e citrato de sódio (BRASIL, 2005; BRASIL, 2008a; LEÃO *et al.*, 2004).

A identificação de espécies baseada na análise de características fenotípicas e bioquímicas apresenta inúmeras limitações (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002). Pode resultar em identificação errônea ou incompleta por causa da indisponibilidade de um número suficiente de testes discriminativos. Dificuldade adicional origina da existência de mais de 150 diferentes espécies atualmente reconhecidas de micobactérias, sendo que muitas delas não podem ser identificadas usando os protocolos disponíveis (TORTOLI, 2003).



Figura 4 – Crescimento de micobactérias em meio Löwenstein-Jensen. Da esquerda para a direita: *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis*. Fonte: PALOMINO *et al.*, 2007, p.104.

Técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gás-líquido estão disponíveis para análise de ácidos micólicos e ácidos graxos da parede celular das micobactérias. As técnicas cromatográficas permitem identificar a maioria das espécies de MCR descritas em infecções humanas, são rápidas, reprodutíveis e específicas, mas requerem infraestrutura dificilmente acessível a qualquer laboratório (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

Tabela 2 – Testes úteis para a identificação das micobactérias de crescimento rápido mais frequentemente isoladas de material clínico.

Testes	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. smegmatis</i>
Pigmentação	N	N	N	N	N	N
25°C	+	+	+	+	ND	+
37°C	+	+	+/-	+	+	+
45°C	-	-	-	-	ND	+
NaCl 5%	+	-/+	-	+	-	+
Ácido Pírico	+	+	-/+	+	ND	+
PNB	+	+	+	+	+	+
Fosfatase ácida	+	+	+	+		-
Nitrato	+	+	-	-	+/-	+
Arilsulfatase	+	+	+	+	+	-
Hidroxilamina	+	+	+	+		-
β-gal	-	-	+	-	-	-
Ferro	+	+	-	-	ND	+
Tween	+	+	-/+	-/+	+	+
Inositol	-	-	-	-		+
Manitol	-	+	-	-		+
Citrato	-	-	+	-		+

+: mais de 85% das cepas positivas; **-**: menos de 15% das cepas negativas; **+/-**: 50 a 85% das cepas positivas; **-/+**: 15 to 49% das cepas positivas; **N**: não cromogênico; **ND**: não há dados; **25°C**: crescimento a 25°C; **37°C**: crescimento a 37°C; **45°C**: crescimento a 45°C; **NaCl**: crescimento em NaCl 5%; **Ácido Pírico**: crescimento em ácido pícrico 0.2%; **PNB**: crescimento em meio com ácido p-nitrobenzóico; **Nitrato**: redução do nitrato a nitrito; **Arilsulfatase**: detecção da enzima arilsulfatase em 3 dias; **β-gal**: detecção da enzima beta galactosidase; **Ferro**: captação de ferro; **Tween**: hidrólise do tween 80; **Inositol**: utilização do inositol; **Manitol**: utilização do manitol; **Citrato**: utilização do citrato (Adaptado de LEÃO *et al.*, 2004).

1.7 Métodos moleculares

Para isolados de MCR, outras técnicas de identificação podem ser necessárias incluindo PCR seguida de clivagem com endonucleases e análise dos fragmentos de restrição (PRA) ou sequenciamento de DNA (GRIFFITH *et al.*, 2007). Métodos moleculares, especialmente o PRA, não só melhoram o reconhecimento correto das espécies circulantes, assim como a identidade prévia de espécies não caracterizadas, mas também diminuem os atrasos de laboratório tradicionais na

identificação das espécies e, conseqüentemente, levam a um diagnóstico mais rápido e preciso do agente causador da doença. Isso deve resultar em maior rapidez no estabelecimento da antibioticoterapia, assim como maior especificidade para a mesma (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002).

A região genômica que codifica a proteína de choque térmico de 65 KDa (*hsp65*) é altamente conservada entre espécies de micobactérias. No entanto, apresenta regiões hipervariáveis, cuja sequência pode ser utilizada para fins de identificação (TORTOLI, 2003). Esta sequência, portanto, pode ser usada para estudos de taxonomia, com valor na identificação de MCR. O *hsp65* é mais conhecido pelo padrão de PCR com análise dos fragmentos de restrição (PRA), como descrito por Telenti e colaboradores (1993). Tal estudo demonstrou que uma porção de 441 pares de bases do gene *hsp65* poderia ser usada para PRA e apresentou padrões distintos para a maioria das micobactérias de crescimento lento e rápido (TELENTI *et al.*, 1993).

PRA envolve visualização de padrões de fragmentação do DNA obtidos clivando a sequência amplificada por PCR com enzimas de restrição (normalmente *BstEII* e *HaeIII*). Os produtos da digestão, separados por eletroforese em gel de agarose, aparecem como bandas cujos padrões são normalmente espécie-específicos (TORTOLI, 2003).

No Brasil, a técnica *PRA-hsp65* tem possibilitado a identificação rápida de diversas espécies de micobactérias, possui boa correlação com os resultados de identificação fenotípica e o reconhecimento de espécies que não eram anteriormente identificadas, devido às limitações dos métodos fenotípicos (CHIMARA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2001). Embora possa ser utilizado para identificação preliminar das espécies de MCR mais frequentes, o *PRA-hsp65* é limitado porque não permite diferenciação entre algumas espécies devido à superposição de perfis de várias espécies distintas (CHIMARA *et al.*, 2008; DEVALLOIS *et al.*, 1997). Além das espécies com superposição de padrões, podem ocorrer vários padrões dentro de uma única espécie (TORTOLI, 2003).

O sequenciamento de regiões genéticas conservadas é universalmente reconhecido como o padrão ouro para a identificação das micobactérias, porém é limitado a laboratórios altamente especializados. Alvos úteis para efeitos de identificação tem sido detectados no genoma das micobactérias, como o gene 16S rRNA, universalmente considerado a primeira escolha, e a região hipervariável do gene *hsp65*, melhor alternativa ao 16S rRNA. Outras regiões são o espaçador interno transcrito e o *rpoB*, além dos alvos menos comumente investigados como *recA*, *sodA* e *gyrB*. A análise de uma combinação de sequências a partir de vários genes tem sido sugerida para aumentar o poder discriminatório (TORTOLI, 2010).

Adékambi e colaboradores (2003), analisando regiões polimórficas do gene *rpoB* em MCR, definiu que a região polimórfica V foi melhor para analisar o polimorfismo neste gene por apresentar maior variabilidade.

Métodos genotípicos para tipificação de isolados são particularmente úteis para estudos de surtos e outras pesquisas epidemiológicas, por serem discriminativos e capazes de demonstrar que muitos focos de infecção com MCR envolvem várias espécies e/ou múltiplas estirpes da mesma espécie. Como ressaltado por Set e Shastri (2011), os métodos moleculares têm se tornado ferramentas valiosas nas investigações de surtos causados por MCR.

Eletroforese em gel de campo pulsado (do inglês, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE) é um dos métodos mais utilizados para a tipagem molecular de cepas de MCR. A técnica consiste em incorporar os isolados MCR em gel de agarose, seguido de lise celular e digestão do DNA cromossômico com endonucleases de restrição específicas (SET & SHASTRI, 2011). PFGE é discriminatória, mas é tecnicamente difícil, trabalhosa e requer um equipamento caro (SAMPAIO *et al.*, 2006b).

Técnicas baseadas em PCR são menos onerosas e são mais fáceis de executar, geram resultados em tempo hábil, e exigem apenas protocolos bem padronizados e equipamento que estão disponíveis em boa parte dos laboratórios (SAMPAIO *et al.*, 2006a).

DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (do inglês, *Randomly amplification of polymorphic DNA* - RAPD) por PCR é um método de análise molecular que tem sido utilizado para comparar cepas de inúmeros microrganismos. Utiliza um oligonucleotídeo iniciador arbitrário que se liga a fita molde de DNA de forma completa ou parcial, resultando em um produto heterogêneo espécie-específico. Esta é uma técnica simples, rápida, não requer conhecimento da sequência molde do DNA. É útil para a análise molecular de surtos causados por MCR. Como esse método utiliza oligonucleotídeo iniciador de pequeno porte e temperaturas de anelamento tão baixas quanto 37°C para permitir anelamento inespecífico, o mínimo de mudanças nas condições da reação pode afetar a intensidade da banda, resultando em interpretação equivocada. Além disso, o poder discriminatório varia de acordo com a sequência do oligonucleotídeo iniciador (SAMPAIO *et al.*, 2006b).

As “Sequências Consensuais Intergênicas Repetitivas Enterobacterianas” (do inglês, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - ERIC) são elementos repetitivos de 126 pares de bases, distribuídos ao longo do cromossomo de bactérias gram negativas entéricas e o número de cópias da sequência e a posição no genoma variam em diferentes espécies. Esses elementos repetitivos contêm uma região central altamente conservada (WILSON & SHARP, 2006).

Sequências ERIC têm sido utilizadas como base para uma técnica de genotipagem bacteriana denominada ERIC-PCR. Tal metodologia utiliza a PCR com oligonucleotídeos iniciadores consenso para amplificar regiões entre as sequências ERIC do genoma bacteriano. A comparação entre os perfis eletroforéticos gerados por ERIC-PCR é utilizada para determinar o grau de similaridade entre as cepas bacterianas testadas (WILSON & SHARP, 2006).

ERIC-PCR tem sido utilizada para tipagem molecular de muitas bactérias Gram negativas e algumas bactérias Gram positivas. ERIC-PCR permitiu estabelecer relações clonais entre diferentes isolados de *Mycobacterium tuberculosis* (SECHI *et al.*, 1998).

ERIC-PCR foi aplicada para análise de clonalidade em isolados de *M. abscessus* da córnea de um paciente com ceratite (GUSMÃO *et al.*, 2005). Foi também utilizada em isolados de *Mycobacterium* de pacientes submetidos à cirurgia de correção de miopia em São Paulo (SAMPAIO *et al.*, 2006c). Em outro estudo, a técnica de ERIC-PCR mostrou ser uma ferramenta útil para avaliar as relações entre clones de MCR, sendo suficientemente discriminativa e útil para a geração de resultados confiáveis, na investigação de surtos causados por *M. fortuitum* (SAMPAIO *et al.*, 2006a).

Em um estudo envolvendo MCR do Grupo *M. chelonae-abscessus*, ERIC-PCR foi considerado um método útil para discriminação molecular para inferência de parentesco genético para essas micobactérias (SAMPAIO *et al.*, 2006b). ERIC-PCR foi utilizada para tipagem de isolados de MNT de surto relacionado à cirurgia de implante mamário em Campinas, no estado de São Paulo (PADOVEZE *et al.*, 2007). ERIC-PCR também foi aplicada para tipagem de isolados de *M. immunogenum* na Argentina, de *M. chelonae* no Peru e Colômbia e de *M. abscessus* na Venezuela, todos de casos de infecção de pacientes submetidos à mesoterapia (CORREA *et al.*, 2010; GARCÍA-NAVARRO *et al.*, 2008; JARDIN *et al.*, 2010; MUNAYCO *et al.*, 2008).

Em micobactérias, ERIC-PCR não amplifica bandas diretamente de sequências ERIC verdadeiras, uma vez que a presença de repetições ERIC não foi demonstrada em genomas de *Mycobacterium* disponíveis (GILINGS & HOLLEY, 1997). Oligonucleotídeos ERIC podem atuar como iniciadores arbitrários ou aleatórios de PCR como em RAPD-PCR. A utilização de oligonucleotídeos iniciadores maiores (22 nucleotídeos) e maior temperatura de anelamento torna ERIC-PCR menos sensível às mudanças nas condições da reação (SAMPAIO *et al.*, 2006a).

1.8 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

As alternativas de tratamento de infecções causadas por MNT constituem cirurgia, terapia com antimicrobianos ou ambos. A terapia medicamentosa para doença causada por MNT é longa, cara, e muitas vezes associada a drogas com relativa toxicidade (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012; van INGEN *et al.*, 2012).

MCR são intrinsecamente resistentes a vários antibióticos, reduzindo o número de drogas ativas para o tratamento de infecções por estas bactérias. Uma característica marcante das MCR é a resistência às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose. A terapia antimicrobiana deve ser mantida por no mínimo seis meses e pode estar associada ao desbridamento do sítio infectado, dependendo da extensão da doença, e remoção de próteses ou qualquer outro corpo estranho (BRASIL, 2009b; BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002; BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012). Na maioria dos casos há necessidade do uso concomitante de dois antimicrobianos. A monoterapia, em particular com fluoroquinolonas, pode selecionar mutantes resistentes e restringir ainda mais as opções terapêuticas (BRASIL, 2009b; BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002).

O esquema terapêutico proposto no Brasil foi descrito em Nota Técnica Conjunta SVS/MS e ANVISA, em 2009. Para lesões únicas ou múltiplas, limitadas à pele e subcutâneo e ausência de próteses, o esquema terapêutico deve incluir claritromicina, por mínimo de seis meses, e amicacina, pelo período de um a dois meses, podendo ser estendido por até seis meses de acordo com a evolução do caso. Para infecções profundas acometendo fáscia e músculo, comprometimento intraperitoneal ou evidência de disseminação, ou para os casos de infecções secundárias a mamoplastia de aumento, além dos antimicrobianos anteriores, deve-se incluir imipenem pelo período de três a oito semanas. Tigeciclina pode ser utilizada como alternativa a amicacina. É recomendado o desbridamento cirúrgico das lesões e a remoção de próteses ou órteses do sítio acometido. No caso de infecções secundárias a mamoplastia de aumento, doxiciclina, sulfametoxazol e ciprofloxacina podem ser opções para as espécies do grupo *M. fortuitum*, e a linezolidina pode ser uma opção terapêutica para diferentes espécies. Nos casos nos

quais houver o comprometimento de mais de um sítio, o tratamento poderá ser prolongado para 9 a 12 meses, ou mais, de acordo com a evolução clínica (BRASIL, 2009b).

Testes de sensibilidade são essenciais para escolha da terapêutica adequada e eficazes para monitorar o desenvolvimento de resistência à drogas por mutação, que pode ocorrer com terapia prolongada (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002). Nos casos nos quais foi obtido o diagnóstico etiológico, o esquema terapêutico deve ser baseado nos resultados de teste de sensibilidade às drogas *in vitro* e na espécie identificada (BRASIL, 2009b; BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012, JARAND *et al.*, 2011).

Em uma revisão, van Ingen e colaboradores (2012) relatam que relações entre sensibilidade às drogas *in vitro* e o resultado do tratamento são mais diretas nos casos de doença extrapulmonar por MCR, mas para casos de doença pulmonar por *M. abscessus*, o resultado do tratamento com drogas para as quais é observada sensibilidade *in vitro* é muito limitado.

Para testes de sensibilidade de MCR, o método de microdiluição em meio líquido (*Mueller-Hinton*), tal como utilizado para outras bactérias aeróbicas que crescem rapidamente, foi adotado inicialmente. De acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), anteriormente denominado *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e *American Thoracic Society* (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2011; GRIFFITH *et al.*, 2007), o método mais aceito para teste de sensibilidade de micobactérias não tuberculosas é o que determina a Concentração Inibitória Mínima (MIC, do inglês: *Minimum Inhibitory Concentration*) por microdiluição em caldo. MIC é definida como a menor concentração da droga capaz de impedir o crescimento microbiano. Este método está padronizado e validado para ser realizado para algumas espécies de MCR (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2011).

Ensaio a base de indicadores de oxidação-redução têm sido utilizados para avaliar a sensibilidade antimicrobiana em isolados de micobactérias, principalmente *M. tuberculosis*. Resazurina é um indicador de oxidação-redução utilizado para a avaliação do crescimento celular. A forma oxidada deste corante é azul, e se torna

rosa quando reduzida por oxidoredutases dentro do ambiente de células viáveis. Uma vez aplicada na determinação da MIC, esta é definida como a menor concentração da droga que impede a mudança de cor. (TANEJA & TYAGI, 2007; MARTIN *et al.*, 2005; MARTIN *et al.*, 2007).

A tabela 3 resume os antimicrobianos utilizados no tratamento das MCR mais comumente encontradas.

Tabela 3 - Antimicrobianos usados para o tratamento de espécies de MCR mais comumente encontradas

Espécies	Antimicrobianos
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Linezolida (~50%), moxifloxacino (~15%), ciprofloxacino, levofloxacino (<5%), doxiciclina (<5%), claritromicina-azitromicina (~20%) oral, ampicacina, tigeciclina, cefoxitina (70%), imipenem (~50%), linezolida (50%) parenteral
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	Claritromicina-azitromicina, linezolida (~50%), moxifloxacino (~15%), ciprofloxacino (<5%), doxiciclina (<5%) oral, ampicacina, tigeciclina, cefoxitina (~70%), imipenem (~50%), linezolida (50%) parenteral
<i>M. chelonae</i>	Claritromicina-azitromicina, linezolida, moxifloxacino (~25%), ciprofloxacino (~20%), doxiciclina (~20%) oral, tobramicina, ampicacina (~50%), imipenem (~60%), tigeciclina parenteral
<i>M. fortuitum</i>	Ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, sulfametoxazol-trimetoprim, linezolida, doxiciclina (~50%), claritromicina-azitromicina (~20%) oral, imipenem, tigeciclina, ampicacina e cefoxitina (~50%) parenteral.

Porcentagem indica percentual de sensibilidade de um organismo a uma dada droga. Drogas sem percentual listadas correspondem a 100% de sensibilidade (Traduzido e adaptado de BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012).

As infecções por *M. abscessus* são difíceis de tratar porque essas micobactérias são intrinsecamente resistentes não apenas aos agentes antimicrobianos clássicos utilizados no tratamento da tuberculose, mas também a maioria dos antibióticos disponíveis atualmente (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012).

Poucas drogas tem atividade *in vitro* contra *M. abscessus*. No entanto, algumas cepas são muito mais sensíveis a algumas drogas, e isso pode referir-se a diferenças entre as subespécies dentro do grupo *M. abscessus* (NESSAR *et al.*, 2012).

Em 1990, a claritromicina tornou-se a droga de escolha para infecções por *M. abscessus*, mas as recomendações atuais são combinar claritromicina com um aminoglicosídeo (geralmente amicacina) e outra droga injetável como ceftazidima ou imipenem (NESSAR *et al.*, 2012).

Embora cepas selvagens tenham sensibilidade ou MIC intermediária para macrolídeos, isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* têm MICs resistentes, devido à expressão de um gene metilase induzível (*erm*) que confere resistência aos macrolídeos. A presença de um gene *erm* funcional em *M. abscessus* subsp. *abscessus*, em contraste a sua ausência em *M. abscessus* subsp. *bolletii* tem sido estudada. Pacientes infectados com *M. abscessus* subsp. *bolletii* têm melhor resposta terapêutica que aqueles com *M. abscessus* subsp. *abscessus* (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012).

Os macrolídeos claritromicina e azitromicina são os agentes terapêuticos mais empregados para tratamento das infecções por *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Isolados de *M. abscessus* de pacientes não tratados também têm mostrado MIC baixa ou intermediária de ceftazidima ($\leq 32-64 \mu\text{g/mL}$). Muitos isolados são resistentes a doxiciclina e ciprofloxacino. No entanto, o agente mais ativo contra *M. abscessus* é amicacina, administrada diariamente ou três vezes por semana, dependendo das circunstâncias clínicas. Para situações difíceis, como resistência de cepas de *M. abscessus* a macrolídeos, recomenda-se uma combinação de agentes parenterais, baseado no resultado da MIC *in vitro* (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012).

O *M. fortuitum* é geralmente mais sensível às drogas que *M. chelonae* ou *M. abscessus* e, frequentemente, regime oral é escolhido (GROOTE & HUITT, 2006). Isolados de *M. fortuitum* são usualmente sensíveis a múltiplos agentes antimicrobianos orais e parenterais, incluindo quinolonas, sulfonamidas, imipenem, doxiciclina, ceftazidima e aminoglicosídeos. Isolados de *M. fortuitum* e espécies

relacionadas (*M. boenickei*, *M. houstonense* e *M. neworleansense*) contém o gene induzível *erm* que confere resistência a macrolídeos (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012). Por causa dessa propriedade, monoterapia não é recomendada para tratamento de infecções por MCR, especialmente quando MIC é encontrada em 4-8 µg/mL (GROOTE & HUITT, 2006).

Como as outras MCR, *M. chelonae* é resistente às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose, mas é frequentemente sensível às drogas antibacterianas comuns. Isolados de *M. chelonae* devem ser testados para sensibilidade à claritromicina, doxiciclina, fluoroquinolonas, tobramicina, a combinação de sulfametoxazol e trimetoprim e imipenem. Isolados de *M. chelonae* não possuem o gene *erm* de resistência induzível a macrolídeos, como *M. abscessus* e *M. fortuitum*. Como o perfil de sensibilidade aos agentes orais varia em diferentes isolados, teste de sensibilidade *in vitro* para orientar o tratamento medicamentoso ideal é justificado (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012).

O grupo *Mycobacterium smegmatis* tem como característica marcante a resistência à claritromicina, mas sensibilidade às quinolonas, amicacina, imipenem, linezolida e sulfametoxazol (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002).

1.9 Epidemiologia de infecções por MCR no Brasil

Casos isolados e surtos de infecções por MCR têm sido descritos em diferentes países. Os casos ocorreram após procedimentos precedidos de processos inadequados de esterilização de equipamentos utilizados em cirurgias para diversas finalidades, broncoscopia, acupuntura, hemodiálise, cateteres, aplicação de *piercing* e contaminação de soluções. No Brasil foi reportada, em 1938, a primeira descrição clínica e laboratorial de *Mycobacterium fortuitum*, no primeiro caso de doença nosocomial por MNT em paciente que teve um abscesso pós-injeção de vitamina intramuscular (da COSTA CRUZ, 1938). Desde então, surtos, pseudo-surtos e casos de infecções causadas por MNT, associadas a cuidados de saúde, especialmente MCR, tem sido relativamente comuns (WALLACE *et al.*,

1998). Há cada vez mais relatos de infecções localizadas cutâneas e de tecido causadas por MCR em pacientes que foram submetidos a procedimentos invasivos como laparoscopia, artroscopia, cirurgia plástica ou intervenções cosméticas (DUARTE *et al.*, 2009; VIANNA-NIERO *et al.*, 2008).

Surtos de infecções causados por MCR relacionadas aos cuidados com a saúde (hospitalares e não hospitalares) têm sido detectados no Brasil desde 1998, principalmente nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo (BRASIL, 2009b). Os surtos mais antigos foram relacionados à cirurgia para correção de miopia (*Laser-Assisted in Situ Keratomileusis* - LASIK), sessões de mesoterapia (injeções intradérmicas) ou implantes mamários, a maioria deles associados a espécies que pertencem ao grupo *M. chelonae-abscessus* (FREITAS *et al.*, 2003; SAMPAIO *et al.*, 2006b; SAMPAIO *et al.*, 2006c). Infecções cutâneas por *M. abscessus* e *M. fortuitum*, após mesoterapia ou cirurgia plástica, foram relatadas também (PADOVEZE *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2001). Recentemente, uma epidemia de infecções em sítio cirúrgico foi relatada em sete diferentes regiões do Brasil, e foi relatado como causa um único clone de *M. massiliense* (CARDOSO *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2009; LEÃO *et al.*, 2010; VIANNA-NIERO *et al.*, 2008). Os casos isolados de mesoterapia foram inicialmente identificados como *M. bolletii* (VIANNA-NIERO *et al.*, 2008).

1.9.1 Casos notificados

Por se tratar de uma doença emergente, a notificação de todos os casos suspeitos e confirmados de infecção por MCR, após procedimentos invasivos deve ser feita às vigilâncias epidemiológicas e sanitárias, por meio de formulário próprio “Ficha de Notificação de Caso de Micobacteriose Não Tuberculosa após procedimentos invasivos” (ANEXO B). A notificação é obrigatória (compulsória) para monitoramento de surtos relacionados aos serviços de saúde e objetiva identificar a magnitude do problema no país, conhecer o perfil epidemiológico do evento e realizar vigilância e resposta às ocorrências infecciosas pós-procedimentos invasivos, especialmente infecções por MCR (BRASIL, 2009b).

Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentou relatório de investigação de casos reportados de infecções por MCR no Brasil, no período de 1998 a 2009. Os dados epidemiológicos apontam para a ocorrência de situações distintas, com diferentes surtos, por diferentes espécies de MCR como agentes etiológicos e diferentes procedimentos associados (BRASIL, 2011).

Os casos notificados ocorreram em 23 Estados, sendo que dez estados concentraram 97,8% dos casos (Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso, Distrito Federal e Minas Gerais). O Estado com maior número de notificações foi o Rio de Janeiro (com 1.007 casos). Minas Gerais notificou apenas 31 casos, no período. O maior número de casos estava relacionado a procedimentos realizados no período entre 2006 e 2008 (BRASIL, 2011).

Em relação à distribuição por grupos de procedimento, do total dos 2.520 casos notificados, cirurgia abdominal representou 59,2% (1.492 casos), mama 6,9% (174 casos), pélvica 6,6% (167 casos), ortopédica 4,6% (117 casos), urológica 2,4% (60 casos), lipoaspiração 1,2% (31 casos), facial 0,6% (15 casos), abdominal com mama e lipoaspiração 0,5% (13 casos), mama com lipoaspiração 0,5% (13 casos), torácica 0,4% (11 casos), obstétrica 0,2% (6 casos), abdominal com lipoaspiração 0,2% (6 casos), abdominal com mama 0,2% (6 casos), neurológica 0,1% (2 casos), oftalmológica (1 caso) e procedimento não invasivo (1 caso). Em 10,7% dos casos, não havia informação quanto ao tipo de procedimento invasivo realizado e 135 casos foram referentes a procedimentos invasivos não cirúrgicos (tratamentos estéticos corporais e faciais, mesoterapia, injeção de medicamentos e imunobiológicos, procedimentos endoscópicos por vias naturais e biópsias).

Após a classificação final dos casos notificados no Brasil de 1998 a 2009, 792 (31,4%) foram confirmados, 76 (3,0%) prováveis e 1.652 (65,6%) suspeitos. Considerou-se como confirmados apenas os casos com cultura positiva e identificação da micobactéria. Os casos com resultados de histopatológico compatível e ou BAAR positivo foram considerados como prováveis e os casos com cultura positiva, porém sem identificação de MCR foram classificados como

suspeitos, junto aos demais casos que tiveram cultura negativa ou não realizada (BRASIL, 2011).

Do total de casos notificados no Brasil entre 1998 a 2009, 257 (30,4%) envolveram *M. abscessus* subsp. *bolletii*, 265 (31,3%) *M. abscessus*, 117 (13,8%) *M. fortuitum*, 13 (1,5%) *M. chelonae*, 21 (2,7%) outras espécies de micobactérias e 119 (14,1%) foram MCR sem identificação de espécie. Outras espécies de micobactérias incluíram *M. mucogenicum*, *M. porcinum*, *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. immunogenum*, *M. neoarum*, *M. peregrinum*, *M. kansasii*, *M. phocaicum* e *M. senegalense* (BRASIL, 2011).

Em Minas Gerais, no período de 1998 a 2009, dos casos confirmados de infecções associadas a procedimentos invasivos, cinco foram por *M. abscessus* envolvendo três instituições, três por *M. fortuitum*, três por *M. chelonae* e um caso sem identificação de espécie no município de Belo Horizonte envolvendo uma instituição (BRASIL, 2011).

1.10 Prevenção

Controle de surtos nosocomiais de MNT requer vigilância adequada pela equipe de controle de infecção, aplicação de técnicas de tipagem molecular, identificação rápida da fonte e instituição de medidas de controle eficazes (PHILLIPS & von REYN, 2001).

A prevenção de infecções hospitalares devido a MNT é um desafio. O alto teor de lipídeos e da parede celular de micobactérias as tornam mais resistentes à morte por desinfecção, temperatura elevada e luz ultravioleta, comparado com outras bactérias patogênicas que podem colonizar a água potável. Além disso, frequentemente existe MNT dentro de biofilmes nas superfícies internas e acessórios de sistemas de distribuição de água e tanques de armazenamento. Biofilmes parecem suportar o crescimento de micobactérias e proteger o organismo,

o que faz com que a desinfecção completa da água de sistemas colonizados seja muitas vezes difícil de alcançar (PHILLIPS & von REYN, 2001).

As infecções por MCR estão fortemente relacionadas às falhas nos processos de limpeza, desinfecção e esterilização de produtos médicos, além do não atendimento às normas de uso dos produtos esterilizantes. Na maioria dos serviços de saúde investigados, os instrumentais cirúrgicos foram submetidos somente ao processo de desinfecção e não ao processo de esterilização como é definido pela Resolução da Anvisa - RE nº. 2606/06. Também foi detectada a precariedade no funcionamento dos Centros de Material e Esterilização dos serviços, já que estes não possuem registros e validação dos processos de limpeza, desinfecção e esterilização dos instrumentais cirúrgicos (BRASIL, 2008b).

As ações para prevenir e interromper as infecções por MCR, em serviços de saúde, foram estabelecidas. Como medida para redução da ocorrência de infecções causadas por MCR no país, a Resolução nº 8 da ANVISA, de 27 de fevereiro de 2009, publicada no Diário Oficial da União, em 02 de março de 2009, determinou a suspensão da esterilização química por imersão, utilizando agentes esterilizantes líquidos, para os artigos invasivos usados em cirurgias. Todavia, esta resolução não se aplica a instrumentais ópticos utilizados em procedimentos endoscópicos para acesso em cavidades corporais, por orifícios naturais. O processamento de instrumental cirúrgico e produtos para saúde devem ser feitos em Centro de Material e Esterilização, supervisionado por profissional habilitado, ou por empresa terceirizada regularizada junto à Autoridade Sanitária (BRASIL, 2009a). Além disso, como estabelecido na Resolução nº 51, de 21 de outubro de 2009, empresas fabricantes e importadoras de produtos hospitalares devem comprovar eficácia de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos¹ frente à *Mycobacterium massiliense*, sob pena de ter seu registro cancelado e produto apreendido em todo território nacional (BRASIL, 2009c).

¹Artigos semicríticos são aqueles que entram em contato com a pele não íntegra ou com mucosas íntegras. Como exemplo tem-se cânula endotraqueal, espéculo vaginal, sondas nasogástricas, gastroscópios e colonoscópios. Requerem desinfecção de alto nível ou esterilização para ter garantida a qualidade do seu múltiplo uso (BRASIL, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Relatos de infecções por micobactérias não tuberculosas (MNT) vêm aumentando em todo o mundo ao longo das últimas duas décadas. Dentre as MNT, micobactérias de crescimento rápido (MCR) são descritas como patógenos oportunistas envolvidos em infecções, especialmente aquelas associadas a procedimentos invasivos, e devem, portanto, ser consideradas como um importante grupo de agentes infecciosos. Infecções por esses agentes resultam em tratamentos longos, de alto custo, e por vezes são necessárias intervenções cirúrgicas.

A ocorrência de infecções pós-cirúrgicas por MCR em diferentes regiões do Brasil é monitorada de forma permanente. A ocorrência de infecção em serviços de saúde é considerada uma emergência epidemiológica e sua investigação vem sendo conduzida pela ANVISA, Ministério da Saúde, vigilâncias epidemiológicas e sanitárias dos estados e dos municípios. Dados epidemiológicos levantados pela ANVISA apontam que dez estados concentram o maior número de casos no período de 1998 a 2009, sendo que Minas Gerais ocupa a décima posição. Neste período foram notificados 31 casos em Minas Gerais, embora possa existir subnotificação dos casos, cuja magnitude é impossível de ser estimada (BRASIL, 2011).

De acordo com recomendações estabelecidas por nota técnica da Secretaria de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde e ANVISA, em 2009, toda MCR isolada de pacientes submetidos a procedimentos invasivos deve ser encaminhada ao laboratório de referência para identificação da espécie e teste de sensibilidade (BRASIL, 2009b).

O Instituto Octávio Magalhães, parte integrante da Fundação Ezequiel Dias, representa o LACEN-MG. Desse instituto faz parte o Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas (SDBF) onde é realizado o diagnóstico de diversas doenças e agravos de interesse na saúde pública. O LACEN-MG também é um laboratório de referência de abrangência estadual para o diagnóstico bacteriológico de micobactérias e, portanto, para lá são encaminhadas amostras clínicas e isolados bacterianos de casos suspeitos de infecções por MCR do Estado. Portanto, as

micobactérias recebidas nesse laboratório refletem, ainda que não em sua totalidade, a diversidade de espécies isoladas de espécimes clínicos de Minas Gerais.

Até o momento, o LACEN-MG realiza identificação fenotípica, de forma limitada, e molecular por meio do método PRA-*hsp65*. Tais técnicas permitem identificação de algumas espécies de MCR. No entanto, ainda não foram implantadas metodologias para determinação da sensibilidade aos antimicrobianos para esses agentes. Além disso, não se encontram disponíveis métodos de genotipagem sensíveis, de fácil execução, rápidos e de baixo custo para avaliação de surtos, embora o LACEN-MG se constitua no único laboratório do Estado responsável pela vigilância epidemiológica de tais condições.

Tendo em vista tais considerações, este estudo buscou a aquisição de conhecimentos quanto ao perfil molecular e de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados clínicos de MCR envolvidas ou não em surtos em Minas Gerais, no período de janeiro de 2007 a junho de 2011.

O método de ERIC-PCR foi utilizado em diferentes estudos envolvendo isolados clínicos de MCR e, dentre os métodos moleculares, mostrou-se uma alternativa simples, rápida, discriminativa para esclarecimento de surtos por esses agentes. Assim, entre os possíveis métodos moleculares, este foi selecionado para o presente estudo, visando a sua padronização e potencial utilização como ferramenta a ser implantada no LACEN-MG para acompanhamento dos isolados clínicos de MCR envolvidos ou não em surtos no Estado de Minas Gerais.

Em geral, testes de sensibilidade aos antimicrobianos de MCR encontram-se disponíveis apenas em laboratórios de referência, embora o LACEN-MG ainda não possua a técnica padronizada na rotina. A metodologia para determinação de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de MCR mais comuns está padronizada pelo CLSI e envolve a determinação da concentração inibitória mínima, avaliando o crescimento por leitura visual. Tal forma de avaliação apresenta limitações como difícil visualização e potenciais variações entre observadores. A

avaliação utilizando indicador colorimétrico resazurina pode simplificar tal avaliação, além de torná-la mais objetiva.

Assim se constituíram objetivos deste estudo i) levantar dados epidemiológicos dos pacientes, do Estado de Minas Gerais, submetidos a procedimentos invasivos com isolamento de MCR no período de janeiro de 2007 a junho de 2011; ii) caracterizar isolados clínicos de MCR mantidos no LACEN-MG; iii) avaliar o método de ERIC-PCR como alternativa para sua genotipagem; iv) determinar o perfil de sensibilidade das MCR aos antimicrobianos por meio de determinação da concentração inibitória.

Espera-se dessa forma contribuir para melhor conhecimento da epidemiologia de MCR no Estado de Minas Gerais e no Brasil e, por meio da padronização e avaliação de novas metodologias, aprimorar as condições do LACEN-MG como suporte ao diagnóstico e acompanhamento de surtos de MCR no Estado de Minas Gerais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral.

Caracterizar micobactérias de crescimento rápido (MCR) isoladas de pacientes de Minas Gerais submetidos a procedimentos invasivos, em relação aos seus perfis epidemiológico, molecular e de sensibilidade aos antimicrobianos.

3.2 Objetivos específicos.

- Levantar dados epidemiológicos dos casos de MCR isoladas de pacientes submetidos a procedimentos invasivos, disponíveis nos registros laboratoriais do LACEN-MG.
- Recuperar cepas de referência e isolados clínicos de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos.
- Confirmar, por testes fenotípicos de triagem, as MCR recuperadas.
- Identificar, genotipicamente, isolados clínicos de MCR por PCR seguida de clivagem com endonucleases e análise dos fragmentos de restrição do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*).
- Padronizar a técnica de ERIC-PCR para tipagem molecular de isolados clínicos de MCR.
- Determinar o perfil genético dos isolados clínicos de MCR, de Minas Gerais, por meio de tipagem molecular utilizando a técnica de ERIC-PCR.
- Padronizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos para MCR utilizando a técnica de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), com base em recomendações do CLSI.
- Determinar o perfil de sensibilidade dos isolados clínicos de *M. abscessus* e *M. chelonae* frente aos antimicrobianos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo A).

4.2 Seleção de isolados

O estudo foi realizado com isolados clínicos de micobactérias e cepas de referência mantidas na coleção de cepas no Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas da Fundação Ezequiel Dias – Laboratório de Referência de Micobactérias para o Estado de Minas Gerais.

Foi feita análise retrospectiva de dados de registro do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas da Fundação Ezequiel Dias, no período de janeiro de 2007 a junho de 2011, a fim de obter todos os isolados de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos.

Os isolados selecionados foram previamente identificados, por meio de testes fenotípicos rotineiramente utilizados e padronizados no Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas, tais como teste do tempo de crescimento em meio Löwenstein-Jensen, teste de produção de pigmento, crescimento em 25°C, teste de crescimento em meio de ágar comum, teste de crescimento em meio com ácido p-nitrobenzóico (PNB), teste de crescimento em meio com hidrazida do ácido tiofeno 2-carboxílico (TCH), teste de crescimento em meio com NaCl 5%, teste da niacina e teste de redução do nitrato. Alguns isolados tinham sido identificados pela técnica de PRA-*hsp65*.

Foram utilizadas na técnica de PRA-*hsp65* as cepas de referência *Mycobacterium tuberculosis* ATCC® 27294, *Mycobacterium avium* subsp. *avium* ATCC®25291 e isolado “*Mycobacterium massiliense*” INCQS 594 representante de surto de infecções cirúrgicas no Brasil. Para o controle de qualidade da determinação da MIC foram utilizadas as cepas de referência *Mycobacterium peregrinum* ATCC® 700686 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213. Para a técnica de ERIC-PCR foi utilizado um isolado “*Mycobacterium massiliense*” INCQS 594 representante de surto de infecções cirúrgicas no Brasil, além da cepa de *Mycobacterium tuberculosis* ATCC® 27294.

4.3 Critérios de inclusão

As cepas incluídas no estudo foram MCR armazenadas no Laboratório de Referência de Micobactérias para o Estado de Minas Gerais provenientes de espécimes clínicos de pacientes submetidos a procedimentos invasivos.

4.4 Critérios de exclusão

Cepas contaminadas ou aquelas com crescimento bacteriano insuficiente para a realização das técnicas.

4.5 Dados epidemiológicos

Informações epidemiológicas relativas aos isolados clínicos selecionados no estudo foram levantadas a partir de livros de registro do laboratório, ficha de encaminhamento de amostras biológicas para diagnóstico de micobactérias e ficha de notificação de caso de micobacteriose não tuberculosa após procedimentos médicos invasivos.

4.6 Obtenção dos isolados

Os diferentes isolados clínicos e as cepas de referência de micobactérias foram recuperados, por subcultivo, e mantidos em meio Löwenstein-Jensen. A cepa de referência de *S. aureus* foi recuperada e mantida em ágar sangue de carneiro.

4.7 Triagem fenotípica

Para cada isolado ou cepa recuperado, foi feita triagem por análise macroscópica e microscópica (verificação da presença de BAAR e outros microrganismos contaminantes por meio da confecção de esfregaços e coloração pelo método de Zielh-Neelsen). Os isolados de MCR e as cepas de referência de *M. peregrinum* e “*M. massiliense*” foram examinados diariamente, no período de uma semana, para verificação do tempo de crescimento, além da observação do aspecto das colônias em meio de Löwenstein-Jensen (morfologia e pigmentação). As cepas de referência de *M. tuberculosis* e *M. avium* subsp. *avium* foram examinadas diariamente, no período de uma semana, e semanalmente, no período de um mês, com a mesma finalidade.

4.8 Identificação e tipagem molecular

4.8.1 Extração de DNA

Uma alça do crescimento bacteriano em meio de Löwenstein-Jensen foi suspensa em 500 µL de água ultrapura. A suspensão foi aquecida por 20 minutos a 100°C e em seguida resfriada a -20°C por pelo menos 18 horas. No momento do uso, o sobrenadante foi coletado após centrifugação a 8000g por 10 minutos e utilizado na PCR.

4.8.2 PRA-hsp65

Todos os isolados foram analisados usando a *PCR* (reação em cadeia da polimerase) seguida de clivagem com endonucleases e análise dos fragmentos de restrição do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*) como previamente descrito por Telenti e colaboradores (1993), com pequenas modificações.

O DNA extraído das cepas foi submetido ao PRA-*hsp65*. A PCR utilizou os iniciadores TB11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') e TB12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') e foi realizada nas seguintes condições: tampão da reação 1X (20 mM de Tris e 50 mM de KCl), 10% de glicerol, 1.5mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*[®]), 200 µM de dNTP, 25 pmoles de cada iniciador e 5 µL do sobrenadante da suspensão bacteriana. Um controle negativo (água ultrapura) e pelo menos um controle positivo (*M. tuberculosis* ATCC[®] 27294, *M. avium* subsp. *avium* ATCC[®]25291 ou "*Mycobacterium massiliense*" INCQS 594) foram incluídos em cada corrida. Após a desnaturação inicial por 10 minutos a 95°C, foram realizados 45 ciclos de amplificação, cada um de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C. A extensão final foi de 10 minutos a 72°C.

Alíquotas dos produtos de amplificação de 441pb foram digeridas com as enzimas de restrição *BstEII* (*Promega*[®]) e *HaeIII* (*Promega*[®]), separadamente. As reações de digestão foram feitas com volume final de 31µL, contendo 1U de enzima de restrição, tampão específico 1X concentrado e 20µL de alíquota do produto amplificado. As misturas enzimáticas foram incubadas por 3 horas a 60°C para *BstEII* e 37°C para *HaeIII*. Os fragmentos de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (*Seakem*[®]) 3%, com padrão de peso molecular de 50 pares de bases (*Sigma*[®]) ou Low Range (*Fermentas*[®]). O gel foi corado com brometo de etídio, fotografado em um transiluminador ultravioleta e os fragmentos de restrição foram estimados. Os padrões obtidos foram comparados com o reportado no PRASITE e publicações (PRASITE, TELENTI *et al.*, 1993; BRUNELLO *et al.*, 2001; CHIMARA *et al.*, 2008; DEVALLOIS *et al.*, 1997; LEÃO *et al.*, 2004; HAFNER *et al.*, 2004).

Os fragmentos obtidos, baseados em seu tamanho, foram usados para a construção dos dendogramas, representando a ausência e a presença de bandas por 0 e 1, respectivamente. Dendogramas foram construídos, utilizando o programa *Treecon*[®], sendo utilizada análise de agrupamento pelo Método da Média Aritmética não Ponderada de Grupos - UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*), utilizando o coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de *Bootstrap* com 1000 reamostragens.

4.8.3 ERIC PCR

O DNA extraído das cepas foi submetido a ERIC-PCR. A PCR utilizou os iniciadores ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), descritos por Sechi e colaboradores (1998), e foi realizada com volume de 50 µL nas seguintes condições: tampão da reação 1X (20 mM de Tris e 50 mM de KCl), 1.5mM de MgCl₂, 0,6U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*[®]), 200 µM de dNTP, 1 µM de cada iniciador e 5 µL do sobrenadante da suspensão bacteriana. Um controle negativo (água ultrapura) e duas cepas de referência (*M. tuberculosis* ATCC[®] 27294 e "*Mycobacterium massiliense*" INCQS 594) foram incluídos em cada corrida. Após a desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C, foram realizados 35 ciclos de amplificação, cada um de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 52°C e 10 minutos a 70°C. A extensão final foi de 20 minutos a 70°C. Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 2% (*Seakem*[®]) a 5 V/cm e brometo de etídio, utilizando como padrão molecular ΦX174 DNA/*Bsu*RI (Fermentas[®]). Alternativamente, os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com coloração por nitrato de prata, utilizando como marcador de peso molecular ΦX174 DNA/*Bsu*RI (Fermentas[®]).

O peso molecular dos fragmentos foi calculado com o programa GelAnalyser 2010[®]. Foram considerados todos os fragmentos visíveis, independentemente de sua intensidade. Os fragmentos obtidos, baseados em seu tamanho, foram usados para a construção dos dendogramas, representando a ausência e a presença de bandas por 0 e 1, respectivamente. Dendogramas foram construídos, utilizando o

programa *Treecon*[®], sendo utilizada análise de agrupamento pelo Método da Média Aritmética não Ponderada de Grupos - UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*), utilizando o coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de *Bootstrap* com 1000 reamostragens.

4.9 Teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos

Isolados clínicos de *M. abscessus* e de *M. chelonae* foram submetidos ao teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. A técnica utilizada foi a microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), conforme recomendações do CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2007).

4.9.1 Agentes antimicrobianos

Os antimicrobianos selecionados para determinação da MIC, todos da *Sigma-Aldrich*[®], foram amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, sulfametoxazol e tobramicina. Na microplaca, foram obtidas concentrações diferentes do mesmo antimicrobiano a partir de diluições seriadas com o fator dois (por exemplo: 1, 2, 4, 8, 16, 32 µg/mL).

Os agentes antimicrobianos foram pesados, solubilizados e diluídos, de acordo com recomendações do fabricante, a fim de obter a concentração da solução estoque de 10 mg/mL.

4.9.2 Preparo da solução de uso de antimicrobianos

A partir da solução estoque, preparou-se a solução de uso de cada antimicrobiano. As diluições foram realizadas em meio *Mueller-Hinton* suplementado com cátions (BBL[®]), obtendo as concentrações descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Concentração das soluções de uso de antimicrobianos

Antimicrobiano	Concentração da solução de uso ($\mu\text{g/mL}$)
Amicacina	2.048
Ciprofloxacino	128
Clarithromicina	256
Doxiciclina	128
Cefoxitina	2.048
Sulfametoxazol	512
Tobramicina	256

4.9.3 Preparo das diluições em microplaca

Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 orifícios, fundo em U e com tampa de baixa evaporação. Nessas, inicialmente foram distribuídos 100 μL de meio *Mueller-Hinton* suplementado com cátions em cada orifício. Adicionou-se 100 μL da solução de uso de cada droga em seu respectivo orifício na primeira linha da microplaca, com exceção dos orifícios controle de crescimento da cepa e controle de esterilidade do meio, conforme ilustrado na figura 5.

Com auxílio de pipeta multicanal, foram realizadas diluições seriadas pela transferência de 100 μL de um orifício para o seguinte, homogeneizando duas vezes. Os 100 μL finais, referentes à última diluição, foram desprezados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	CCC	512	32	64	32	512	128	64	CEM
B	CCC	256	16	32	16	256	64	32	CEM
C	CCC	128	8	16	8	128	32	16	CEM
D	CCC	64	4	8	4	64	16	8	CEM
E	CCC	32	2	4	2	32	8	4	CEM
F	CCC	16	1	2	1	16	4	2	CEM
G	CCC	8	0,5	1	0,5	8	2	1	CEM
H	CCC	4	0,25	0,5	0,25	4	1	0,5	CEM
		AMK	CIP	CLA	DOX	CEF	SUL	TOB	

Figura 5 - Montagem da microplaca com as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) em cada orifício para cada antimicrobiano. CCC = Controle de Crescimento da Cepa, CEM = Controle de Esterilidade do Meio, AMK = amicacina, CIP = ciprofloxacino, CLA = claritromicina, DOX = doxiciclina, CEF = cefoxitina, SUL = sulfametoxazol e TOB = tobramicina.

4.9.4 Preparo da suspensão bacteriana (inóculo)

Os isolados clínicos foram repicados a partir de estoques congelados de isolamentos primários. Essas cepas foram armazenadas a -70°C em meio líquido *Middlebrook 7H9* com 10% de glicerol para minimizar o risco de alterar sua sensibilidade antimicrobiana. A suspensão foi preparada a partir de sementeiras em Löwenstein-Jensen com tempo de cultivo não superior a sete dias.

Retirou-se com alça descartável parte de crescimento confluyente da micobactéria e transferiu-se para um tubo contendo 3,0 mL de meio *Mueller-Hinton* suplementado com cátions. Incubou-se a $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 72 horas. Após o período de incubação, a suspensão foi ajustada com meio *Mueller-Hinton* suplementado com cátions até turbidez correspondente à escala de 0,5 McFarland, a qual foi quantificada no espectrofotômetro *Densicheck plus* (Biomérieux®).

A partir da suspensão ajustada, foram realizadas duas diluições em meio *Mueller-Hinton* suplementado com cátions. Primeiro retirou-se 300 μL da suspensão ajustada e colocou-se em tubo contendo 4,7 mL de meio. Para preparar o inóculo final, transferiu-se 1,0 mL da suspensão bacteriana diluída para um tubo contendo 9,0 mL de meio e homogeneizou-se.

4.9.5 Inoculação e incubação das microplacas

Suspensão de inóculo final foi misturada em agitador tipo vortex por 15 a 20 segundos. Transferiu-se 100 µL da suspensão para cada orifício da microplaca contendo as diluições antimicrobianas, exceto os controles de esterilidade do meio, sendo o volume final de 200 µL em cada orifício contendo a diluição. As microplacas foram tampadas e vedadas com filme plástico e incubadas em estufa a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. A densidade final esperada do microrganismo é de aproximadamente $4,5 \times 10^5$ UFC/mL.

4.9.6 Leitura do teste

Após incubação, foi feita uma leitura visual para avaliar o crescimento, conforme recomendado pelo CLSI, comparando o orifício de controle de crescimento da cepa e o controle de esterilidade do meio. O crescimento é interpretado positivo quando há turvação ou depósito de células no fundo da microplaca (botão) e negativo quando não há.

Adicionalmente, foi realizada leitura das microplacas utilizando o indicador para ensaio colorimétrico resazurina, conforme descrito por Martin e colaboradores (2005). Uma solução de estoque de resazurina (*Sigma*[®]) foi preparada a 0,01% em água destilada estéril. Após 72 horas de incubação, 30 µL de solução de resazurina foram adicionados a todos os poços e a placa foi reincubada por 24 horas. Uma mudança de cor de azul (estado oxidado) para rosa (reduzido) indicou o crescimento de bactéria.

Cada teste de sensibilidade foi realizado em triplicata em dois dias diferentes a fim de garantir a qualidade e reprodutibilidade. O controle de qualidade foi realizado e avaliado, como descrito pelo CLSI, com as cepas de referência *Mycobacterium peregrinum* ATCC[®] 700686 e *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2007).

4.9.7 Interpretação dos resultados

Após aprovação dos controles de qualidade, o valor da MIC foi determinado para cada droga frente aos isolados bacterianos de *M. abscessus* e *M. chelonae*. O resultado foi acompanhado da interpretação das categorias sensível, intermediário e resistente.

A MIC é a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento da bactéria testada. Os critérios de interpretação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos por microdiluição em meio líquido para determinação da MIC para MCR estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Critérios de interpretação para microdiluição em meio líquido para MCR

Antimicrobiano	MIC (µg/mL) por categoria		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina	≤ 16	32	≥ 64
Cefoxitina	≤16	32-64	≥ 128
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8
Doxiciclina	≤1	2-4	≥ 8
Sulfametoxazol	≤ 32	-	≥ 64
Tobramicina	≤ 2	4	≥ 8

MIC: Concentração Inibitória Mínima. Fonte: CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2007.

5 RESULTADOS

Um total de trinta e um isolados de MCR oriundos de espécimes clínicos de vinte pacientes foram selecionados para o estudo. Isolados de quatro pacientes foram excluídos devido à contaminação.

A tabela 6 mostra o número de isolados por paciente e os seus respectivos sítios de origem, além das demais informações obtidas dos registros laboratoriais. Entre os isolados, 24 (77,4%) foram a partir de secreções e 7 (22,6%) de biópsias. Neste estudo, a maioria dos isolamentos foi de sítios não estéreis (secreções da pele). No entanto, esses casos foram acompanhados de informações clínicas, evidências epidemiológicas e/ou relatos de exames complementares (item 1.5) compatíveis com casos de infecção por MCR após procedimentos invasivos. Alguns dos casos também apresentaram mais de um isolamento de MCR (**Tabela 6**). A maior parte dos isolados tinha sido identificada por meio de provas de identificação fenotípica, exceto o isolado C4, como apresentado na tabela 6.

Do total de vinte pacientes, dezenove (95,0%) foram do sexo feminino e um (5,0%) masculino. A idade dos pacientes foi de 21 a 51 anos (média de 30,1 anos) e para seis pacientes essa informação foi desconhecida.

Dentre as ocorrências (**Tabela 7**), doze casos foram eventos associados a procedimentos invasivos cirúrgicos e quatro casos foram de eventos associados a procedimentos invasivos não cirúrgicos. Desses últimos, três envolveram a realização de procedimentos estéticos em face e foi considerado um surto localizado em uma única instituição. Um caso foi associado a injeções repetidas de anabolizante.

Dentre os procedimentos invasivos (**Tabela 8**), mamoplastia foi realizada em dez pacientes, procedimento estético facial foi realizado em três pacientes, um paciente realizou videolaparoscopia abdominal, um realizou lipoaspiração, e para um paciente foram realizadas injeções repetidas de anabolizante. Não foi informado qual tipo de procedimento invasivo foi realizado para quatro casos.

Tabela 6 – Dados epidemiológicos de pacientes com isolamento de MCR após procedimentos invasivos em Minas Gerais.

Paciente	Nº de isolados	Espécime clínico	Município	Local do procedimento	Sexo	Idade	Tipo de procedimento	Identificação fenotípica
F1	2	Secreção de abscesso abdominal	Não informado	NI	F	35	Lipoaspiração	<i>M. fortuitum</i>
F2	2	Secreção de mama	Contagem	Hospital A	F	27	Mamoplastia	<i>M. fortuitum</i>
F3	1	Secreção de abscesso	Uberlândia	NI	M	21	Injeções intramusculares*	<i>M. fortuitum</i>
F4	2	Secreção de mama	Uberaba	Hospital B	F	28	Mamoplastia	<i>M. fortuitum</i>
F5	2	Secreção de mama	Belo Horizonte	Clínica A	F	23	Mamoplastia	<i>M. fortuitum</i>
F6	1	Secreção de mama	Não informado	NI	F	35	Mamoplastia	<i>M. fortuitum</i>
F7	3	Secreção de mama	Belo Horizonte	Hospital C	F	38	Mamoplastia	<i>M. fortuitum</i>
F8	1	Secreção de mama	Uberaba	Hospital D	F	24	Mamoplastia	<i>M. fortuitum</i>
A1	3	Secreção de mama	Belo Horizonte	Hospital E	F	33	Mamoplastia	<i>M. abscessus</i>
A2	1	Biópsia de mama	Não informado	NI	F	31	Mamoplastia	<i>M. abscessus</i>
A3	1	Secreção	Não informado	NI	F	NI	Não informado	<i>M. abscessus</i>
A4	1	Secreção	Não informado	NI	F	NI	Não informado	<i>M. abscessus</i>
A5	1	Biópsia	Não informado	NI	F	51	Não informado	<i>M. abscessus</i>
A6	1	Secreção de abscesso	Nova Lima	Hospital F	F	29	Videolaparoscopia abdominal	<i>M. abscessus</i>
A7	1	Secreção	Não informado	NI	F	NI	Não informado	<i>M. abscessus</i>
C1	1	Biópsia	Belo Horizonte	Clínica B	F	NI	Estético*	<i>M. chelonae</i>
C2	1	Biópsia	Belo Horizonte	Clínica B	F	NI	Estético*	<i>M. chelonae</i>
C3	1	Secreção de abscesso de face	Belo Horizonte	Clínica B	F	NI	Estético*	<i>M. chelonae</i>
C4	4	Biópsia e secreção	Não informado	NI	F	25	Mamoplastia	<i>Mycobacterium sp grupo IV</i>
C5	1	Biópsia	Lavras	NI	F	22	Mamoplastia	<i>M. peregrinum</i>

F: Feminino. M: Masculino. NI: Não informado. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, C1, C2, C3, C4 e C5: isolados clínicos incluídos no estudo. *Procedimento invasivo não cirúrgico.

Tabela 7 - Distribuição dos casos de isolados de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais, quanto ao procedimento.

Procedimento	Número de casos	Porcentagem (%)
Invasivo cirúrgico	12	60
Invasivo não cirúrgico	4	20
Invasivo não informado	4	20
Total	20	100

Tabela 8 - Distribuição dos casos de isolados de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais, quanto ao tipo de procedimento.

Tipo de procedimento	Número de casos	Porcentagem (%)
Mamoplastia	10	50
Estético facial	3	15
Abdominal	1	5
Lipoaspiração	1	5
Injeções de anabolizante	1	5
Sem informação*	4	20
Total	20	100

*Casos sem informação quanto ao tipo de procedimento invasivo realizado

Casos ocorreram em seis municípios de Minas Gerais (**Tabela 9**). Seis casos (30%) ocorreram em Belo Horizonte, dois (10%) em Uberaba, um (5%) em Contagem, um (5%) em Lavras, um (5%) em Nova Lima e um (5%) em Uberlândia. Para oito casos (40%), a informação sobre o município de realização foi desconhecida.

Tabela 9 - Distribuição dos casos de isolados de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais, quanto ao município de ocorrência.

Município	Número de casos	Porcentagem (%)
Belo Horizonte	6	30
Uberaba	2	10
Contagem	1	5
Lavras	1	5
Nova Lima	1	5
Uberlândia	1	5
Sem informação	8	40
Total	20	100

5.1 Identificação bacteriana

Os isolados recuperados apresentaram cultura pura por visualização microscópica (**Figura 6**) e macroscópica, tempo de crescimento inferior a sete dias e ausência de pigmentação.

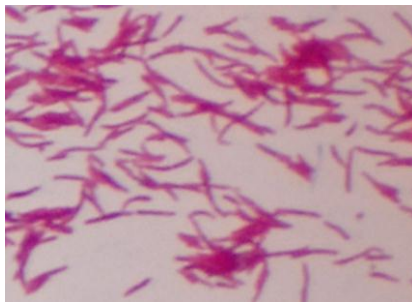


Figura 6 – Bactéria álcool-ácido resistente em esfregaço de cultura de MCR corado pelo método de Ziehl-Neelsen. Aumento de 1000 vezes.

No presente estudo, os isolados foram identificados pelo método PRA-*hsp65*. Após a realização da técnica, foram obtidos seis perfis de restrição com a combinação das enzimas *BstEII* e *HaeIII* (**Tabela 10**).

Tabela 10 – Perfis de PRA-*hsp65* dos isolados clínicos de MCR de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais.

Peso molecular (pb)		Espécie	Isolados
<i>Bst</i> EII	<i>Ha</i> eIII		
320-130	200-60-55	<i>M. chelonae</i> tipo 1	C1, C2, C3
235-210	200-70-60-50	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	A5, A6 e A7
	145-70-60-55	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	A1, A2, A3 e A4
235-130-85	145-140-100-60	<i>M. peregrinum</i> tipo 3	C5
235-120-85	145-120-60-55	<i>M. fortuitum</i> tipo 1	F1, F2, F3, F4, F5,
		<i>M. fortuitum</i> s. <i>acetamidolyticum</i> tipo 1	F6, F7 e F8.
235-120-85	140-125-100-55	Novo perfil	C4

Colunas 1 e 2: tamanho dos fragmentos, em pares de bases, com as enzimas de restrição *Bst*EII e *Ha*eIII, respectivamente. pb: pares de bases. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, C1, C2, C3, C4 e C5: isolados clínicos incluídos no estudo.

Dentre os perfis encontrados, um corresponde a *M. chelonae* tipo 1, dois perfis de *M. abscessus* (*M. abscessus* subsp. *bolletii* e *M. abscessus* subsp. *abscessus*), um perfil de *M. peregrinum* tipo 3, um perfil compartilhado por *M. fortuitum* tipo 1 e *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* tipo 1 e um perfil ainda não descrito na literatura. O isolado com padrão PRA-*hsp65* ainda não descrito na literatura gerou fragmentos de restrição *Bst*EII de 235, 120 e 85 pares de bases e *Ha*eIII de 140, 125, 100 e 55 pares de bases. Sete pacientes possuíam mais de um isolado e em todos os casos o padrão PRA-*hsp65* foi idêntico, sendo aqui

representados por apenas um isolado. Em geral, o método PRA-*hsp65* confirmou a identificação fenotípica. Os perfis PRA-*hsp65* dos isolados estão apresentados nas figuras 7, 8, 9 e 10.

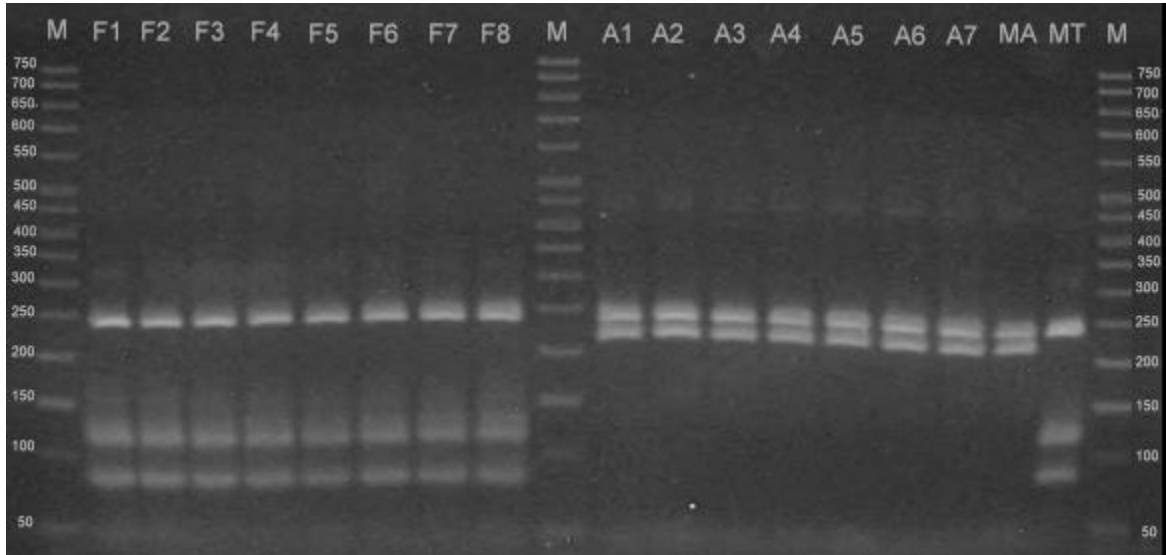


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 3% de perfis de PRA-*hsp65* de 15 isolados clínicos e de cepas de referência com a enzima de restrição *BstEII*. M: Marcador de 50pb. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7: isolados clínicos incluídos no estudo. MT: *M. tuberculosis* ATCC® 27294. MA: *M. avium* subsp. *avium* ATCC® 25291.

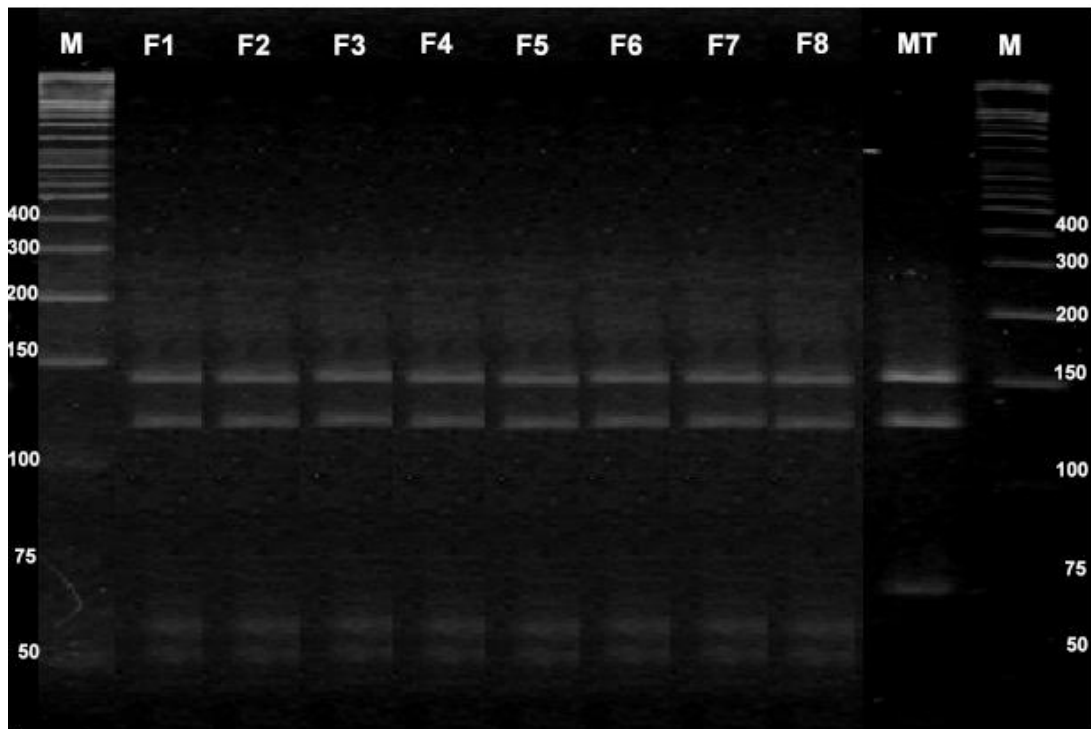


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 3% de perfis de PRA-*hsp65* de 8 isolados clínicos e de cepa de referência com a enzima de restrição *HaeIII*. M: Marcador Low Range, Fermentas®. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 e F8: isolados clínicos incluídos no estudo. MT: *M. tuberculosis* ATCC® 27294.

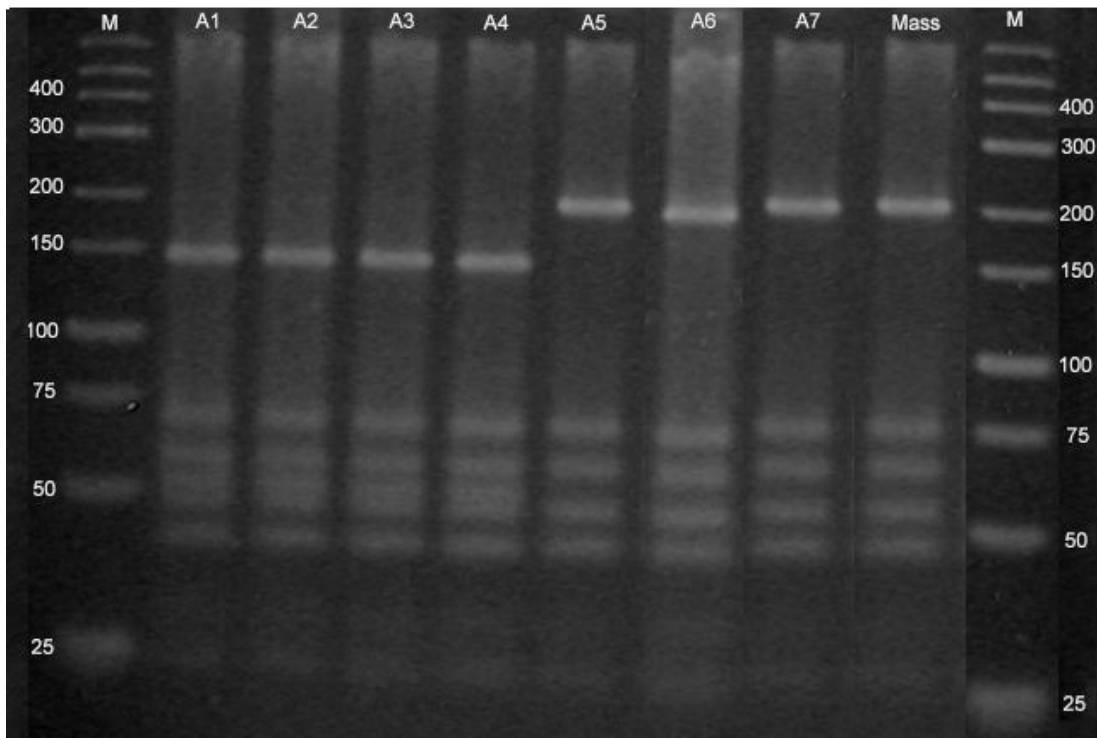


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 3% de perfis de PRA-*hsp65* de 7 isolados clínicos e de cepa de referência com a enzima de restrição *HaeIII*. M: Marcador Low range, Fermentas[®]. Mass: *Mycobacterium massiliense* INCQS 594. A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7: isolados clínicos incluídos no estudo.

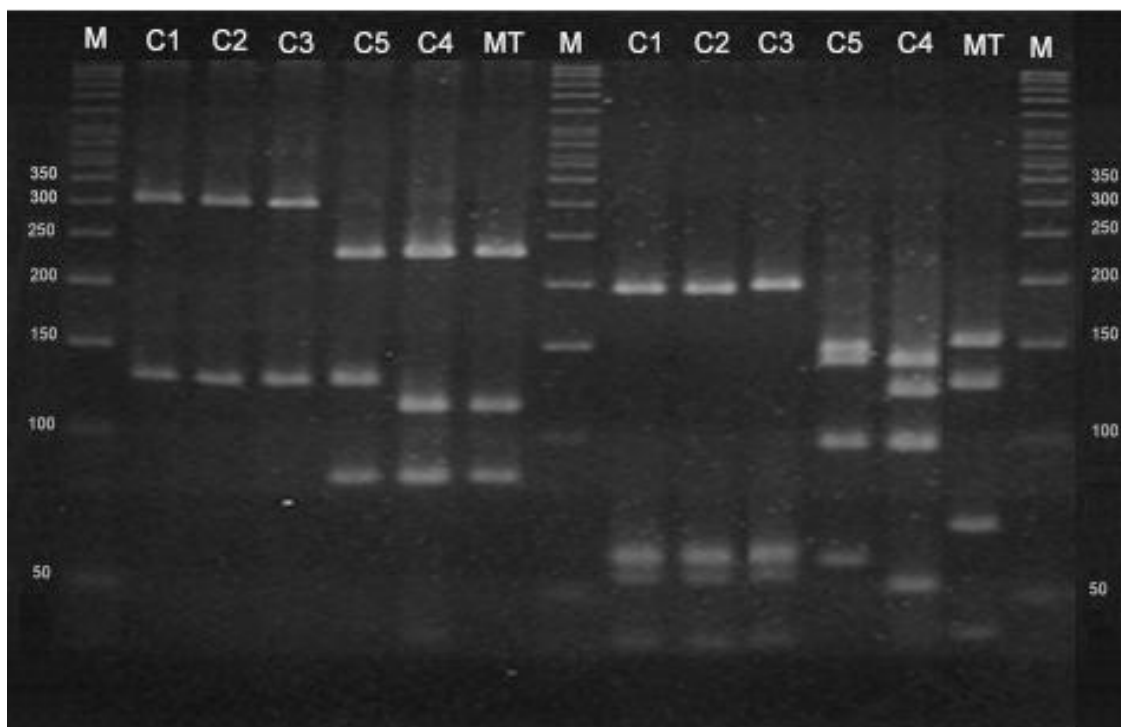


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 3% de perfis de PRA-*hsp65* de 5 isolados clínicos e de cepa de referência com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*. M: marcador de 50pb. MT: *M. tuberculosis* ATCC[®] 27294. C1, C2, C3, C5 e C4: isolados clínicos incluídos no estudo.

A espécie mais frequentemente isolada (**Tabela 11**) foi *M. fortuitum* (8 casos), seguida de *M. abscessus* (7 casos), *M. chelonae* (3 casos) e *M. peregrinum* (1 caso).

Tabela 11- Distribuição dos casos de isolados de MCR provenientes de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais, segundo a espécie de MCR.

Identificação da espécie	Número de casos	Porcentagem (%)
<i>M. fortuitum</i>	8	40
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	4	20
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	3	15
<i>M. chelonae</i>	3	15
<i>M. peregrinum</i>	1	5
<i>Mycobacterium</i> sp.	1	5
Total	20	100

Dentre os isolados de *M. fortuitum*, seis estavam associados à realização de mamoplastia, um de lipoaspiração e um de injeções repetidas de anabolizante. Dentre os isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus*, para apenas dois eram conhecidas essas informações, sendo isolados após a realização de mamoplastia. Para dois isolados não se conhecia o tipo de procedimento invasivo. Um isolado de *M. abscessus* subsp. *bolletii* foi associado à videolaparoscopia abdominal e para dois não se conhecia o tipo de procedimento invasivo associado.

A figura 11 apresenta o dendograma gerado para análise de perfis de PRA-*hsp65* obtidos para isolados clínicos de MCR em estudo.

Por meio desse dendograma, observa-se que todos os isolados de *M. fortuitum* s. *acetamidolyticum* tipo 1 se encontram agrupados com 100% de similaridade. Os isolados de *M. abscessus* foram agrupados em dois grupos cada um: um grupo incluindo todos *M. abscessus* subsp. *abscessus* (A1, A2, A3 e A4) e outro com todos *M. abscessus* subsp. *bolletii* (A5, A6, A7 e cepa de referência “*M. massiliense*”), cada um com 100% de similaridade. Os isolados de *M. chelonae* tipo 1 (C1, C2 e C3) foram altamente similares. Os isolados C4 e C5 apresentam baixa similaridade entre si e com os demais isolados.

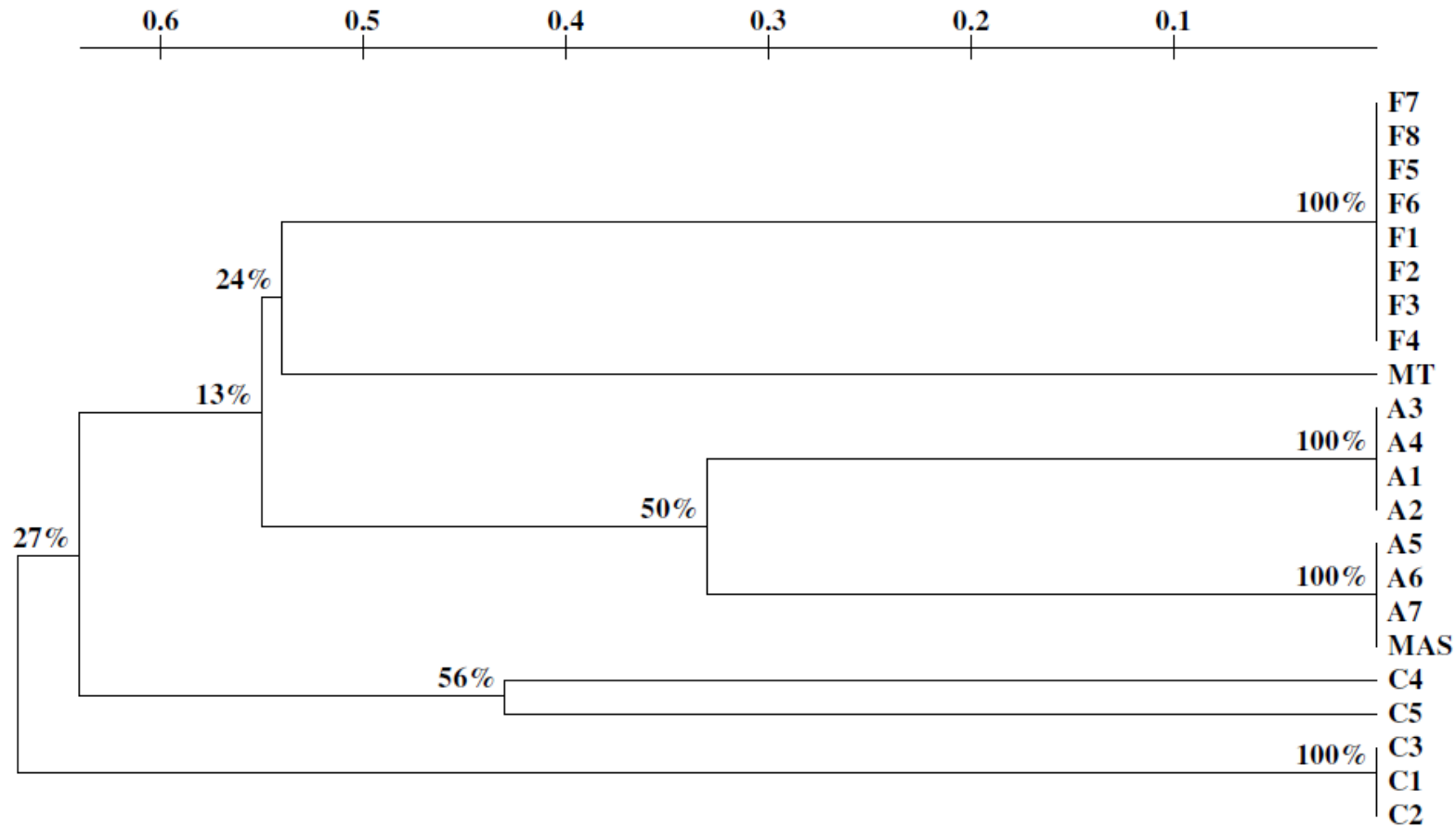


Figura 11 – Dendrograma gerado por perfis PRA-*hsp65* de isolados clínicos de MCR e cepa de referência. Dendrograma preparado utilizando coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979) e método de agrupamento UPGMA no programa *Treecon*. O número em cada bifurcação, determinado com base em 1.000 conjuntos de dados reamostrados (teste de *bootstrap*), é indicado em porcentagem. Escala de distância genética é mostrada na parte superior da figura. Identificação dos isolados é indicada a direita. MT: *M. tuberculosis* ATCC® 27294. MAS: *Mycobacterium massiliense* INCQS 594. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, C1, C2, C3, C4, C5, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7: isolados clínicos incluídos no estudo.

5.2 ERIC-PCR

Para padronização do ERIC-PCR, foram testados dois métodos de extração de DNA de micobactérias. Como os perfis ERIC-PCR obtidos com extração utilizando CTAB (**Apêndice B**), como descrito por van Soolingen e colaboradores (1991), foram indistinguíveis daqueles obtidos pelo método de choque térmico, este último foi escolhido devido a maior facilidade. Os perfis foram também comparados em eletroforese em gel de poliacrilamida, corado pelo nitrato de prata e de agarose, corado pelo Brometo de Etídio. Pela simplicidade de execução, optou-se pelo gel de agarose, uma vez que os perfis foram similares nas duas condições.

Foi feita comparação de perfis de ERIC-PCR obtidos para casos de pacientes com mais de um isolado clínico de MCR. Padrões de ERIC-PCR obtidos para casos com mais de um isolado de MCR foram semelhantes (**Apêndice B**) e, dessa forma, apenas um isolado por paciente foi representado neste trabalho. Cada isolado foi também testado várias vezes, em experimentos diferentes, demonstrando que os perfis foram reprodutíveis.

A figura 12 apresenta os perfis de ERIC-PCR obtidos para isolados clínicos de MCR de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais e de cepas de referência.

Foram considerados para análise fragmentos de 80 a 1600 pares de bases. Pela análise dos perfis de bandas, foi possível identificar diferenças pela presença ou ausência de um ou vários fragmentos amplificados. A análise dos perfis de ERIC-PCR dos isolados estudados mostrou um alto grau de similaridade entre alguns isolados. Perfis de ERIC-PCR dos isolados de C1 e C2 e dos isolados F4 e F8 foram indistinguíveis.

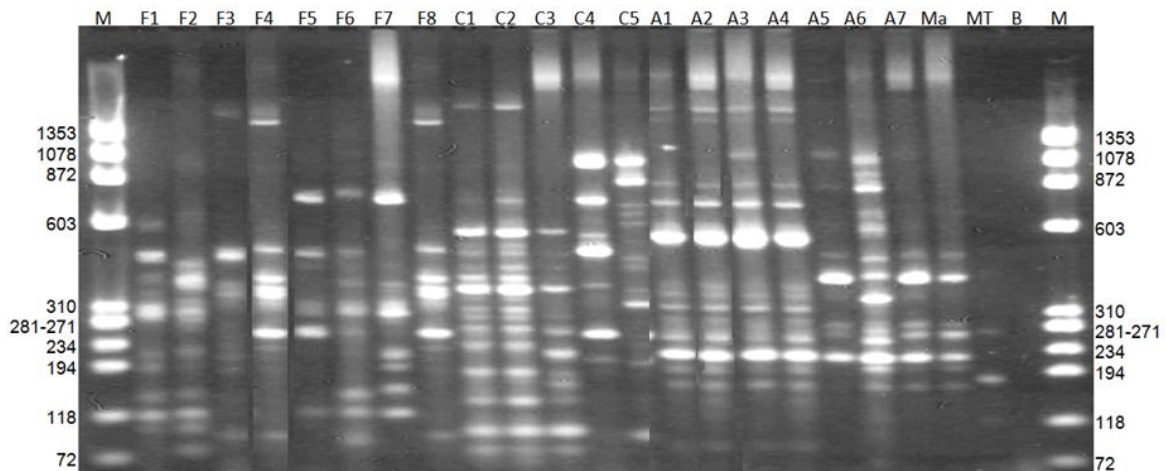


Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose dos perfis de ERIC-PCR obtidos pela análise de isolados clínicos de MCR de Minas Gerais e cepas de referência. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, C1, C2, C3, C4, C5, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7: isolados clínicos incluídos no estudo M: Marcador Φ X174 DNA/BsuRI. MT: *M. tuberculosis* ATCC® 27294; Ma: *Mycobacterium massiliense* INCQS 594; B: controle negativo da reação.

A figura 13 apresenta o dendograma construído para análise dos perfis de ERIC-PCR. No dendograma, além dos agrupamentos obtidos, observa-se a escala de distância genética e os valores do teste de *Bootstrap* (em porcentagem), que indicam a significância estatística de um determinado agrupamento baseada nos dados reamostrados contendo aquele agrupamento.

Para o dendograma de ERIC-PCR observa-se que ele foi capaz de separar a cepa de *M. tuberculosis* das outras micobactérias não tuberculosas (isolados incluídos no estudo e cepa de referência de “*M. massiliense*”). Outro agrupamento formado dividiu os isolados em um grupo contendo *M. abscessus* (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 e “*M. massiliense*”) e outro contendo *M. fortuitum* (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8), *M. chelonae* (C1, C2 e C3), *M. peregrinum* (C5) e a MCR sem identificação da espécie (C4). Esses agrupamentos são comparáveis aos obtidos por *PRA-hsp65*, no entanto, dentro de cada um desses “*clusters*” observou-se maior diversidade genética do que aquela revelada pelo *PRA-hsp65*.

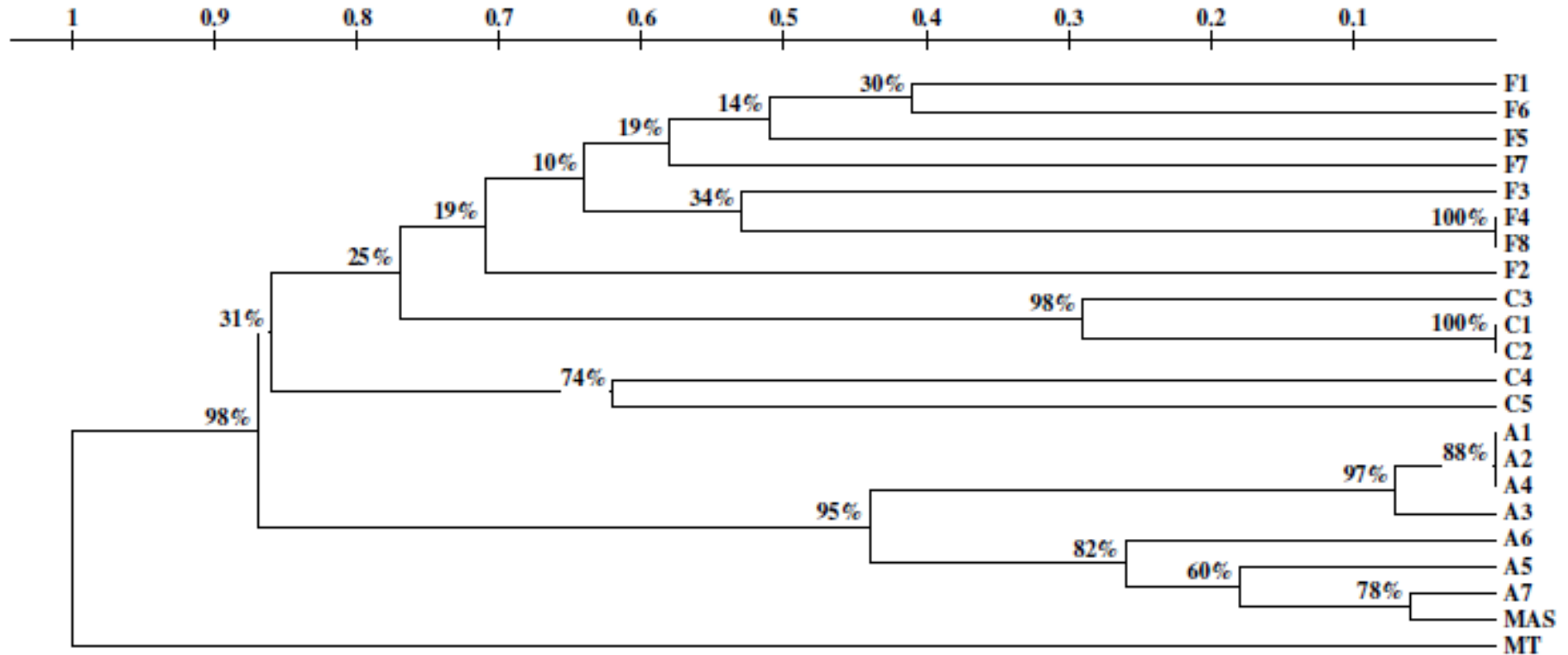


Figura 13 – Dendrograma gerado por ERIC-PCR dos isolados clínicos de MCR e cepas de referência. Dendrograma preparado utilizando coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979) e método de agrupamento UPGMA no programa *Treecon*. O número em cada bifurcação, determinado com base em 1.000 conjuntos de dados reamostrados (teste de *bootstrap*), é indicado em porcentagem. Escala de distância genética é mostrada na parte superior da figura. Identificação dos isolados é indicada a direita. MT: *M. tuberculosis* ATCC® 27294. MAS: *Mycobacterium massiliense* INCQS 594. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, C1, C2, C3, C4, C5, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7: isolados clínicos incluídos no estudo.

Dendograma de ERIC-PCR gerou um agrupamento que incluiu os isolados de *M. abscessus subsp. abscessus*, sendo que os isolados A1, A2 e A4 foram mais similares em relação ao A3. Outro agrupamento incluiu isolados de *M. abscessus subsp. bolletti*, sendo que A5, A7 e “*M. massiliense*” mostraram-se mais próximos em relação a A6. No agrupamento A5, A7 e “*M. massiliense*”, os dois últimos foram mais próximos em relação ao primeiro. Outro agrupamento gerado incluiu isolados pertencentes a espécie *M. chelonae*, sendo que os isolados C1 e C2 foram mais próximos (100% similares) em relação a C3. Os isolados de *M. fortuitum* apresentaram maior distância genética entre si, com exceção dos isolados F4 e F8, que foram 100% similares, com padrão de clonalidade, sendo os dois oriundos de uma cidade (Uberaba), embora não tenham sido caracterizados como provenientes de um surto infeccioso.

5.3 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Nove isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade *in vitro* (sete de *M. abscessus* e dois de *M. chelonae*). Um dos três isolados de *M. chelonae* foi excluído do teste por crescimento insuficiente. Para paciente que apresentou mais de um isolado, foi escolhido o isolado mais antigo.

Em relação aos isolados de *M. chelonae*, todos foram sensíveis à amicacina, ciprofloxacino, claritromicina e doxiciclina, mas resistentes à sulfametoxazol e tobramicina (**Tabelas 12 e 13**). A MIC para tobramicina foi elevada (MIC = 16 µg/mL). O isolado C2 foi sensível a cefoxitina, enquanto que o C1 apresentou perfil intermediário para este antimicrobiano.

Tabela 12 – MIC de *M. chelonae* isoladas de pacientes de Minas Gerais

Antimicrobiano	MIC ($\mu\text{g/mL}$) por isolado	
	C1	C2
Amicacina	≤ 4	≤ 4
Ciprofloxacino	$\leq 0,25$	0,5
Claritromicina	1	1
Doxiciclina	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$
Sulfametoxazol	>128	>128
Tobramicina	16	16

C1 e C2: isolados clínicos incluídos no estudo.

Tabela 13 – Interpretação de MIC de *M. chelonae* isoladas de pacientes de Minas Gerais

Antimicrobiano	Categoria por isolado	
	C1	C2
Amicacina	S	S
Ciprofloxacino	S	S
Claritromicina	S	S
Doxiciclina	S	S
Sulfametoxazol	R	R
Tobramicina	R	R

S: sensível. I: intermediário. R: resistente. C1 e C2: isolados clínicos incluídos no estudo.

Em relação à *M. abscessus* subsp. *abscessus* (**Tabelas 14 e 15**), todos os isolados foram sensíveis à amicacina ($\text{MIC} \leq 4 \mu\text{g/mL}$), apresentaram resistência intermediária à cefoxitina ($\text{MIC} = 32 \mu\text{g/mL}$) e foram resistentes ao sulfametoxazol ($\text{MIC} = 64 \mu\text{g/mL}$). Três destes foram sensíveis à claritromicina, porém resistentes à ciprofloxacino ($\text{MIC} = 4 \mu\text{g/mL}$) e doxiciclina ($\text{MIC} > 32 \mu\text{g/mL}$). Um isolado apresentou sensibilidade à doxiciclina e ciprofloxacino, mas resistência à claritromicina ($\text{MIC} = 16 \mu\text{g/mL}$).

Em relação à *M. abscessus* subsp. *bolletii*, todos os isolados foram sensíveis à amicacina ($\text{MIC} \leq 4 \mu\text{g/mL}$) e claritromicina ($\text{MIC} \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$), apresentaram resistência intermediária à cefoxitina ($\text{MIC} = 32 \mu\text{g/mL}$), porém foram resistentes à ciprofloxacino, doxiciclina e sulfametoxazol (**Tabelas 14 e 15**).

Os isolados selecionados, incluindo *M. abscessus*, para determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foram submetidos a testes com amicacina, tobramicina, cefoxitina, ciprofloxacino, doxiciclina e sulfametaxazol, conforme recomendações do CLSI. No entanto de acordo com esse mesmo manual, os resultados de tobramicina não devem ser reportados para *M. abscessus*, uma vez que a referida droga não deve ser utilizada no tratamento desse agente (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2011). Assim esses resultados não foram incluídos na análise. Além disso, cefoxitina não foi reportada para *M. chelonae*, pois isolados dessa espécie se caracterizam por MIC elevada (MIC \geq 128 $\mu\text{g/mL}$) para cefoxitina (BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012).

Tabela 14 – MIC de *M. abscessus* isoladas de pacientes de Minas Gerais

Antimicrobiano	MIC ($\mu\text{g/mL}$) por isolado							
	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>				<i>M. abscessus subsp. bolletii</i>			
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	
Amicacina	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	
Cefoxitina	32	32	32	32	32	32	32	
Ciprofloxacino	4	$\leq 0,25$	4	4	4	8	16	
Clarithromicina	$\leq 0,5$	16	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	
Doxiciclina	>32	$\leq 0,25$	>32	>32	8	8	16	
Sulfametoxazol	64	64	64	64	128	64	64	

A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7: isolados clínicos incluídos no estudo.

Tabela 15 – Interpretação de MIC de *M. abscessus* isoladas de pacientes de Minas Gerais

Droga	Categoria por isolado							
	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i>				<i>M. abscessus subsp. bolletii</i>			
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	
Cefoxitina	I	I	I	I	I	I	I	
Ciprofloxacino	R	S	R	R	R	R	R	
Clarithromicina	S	R	S	S	S	S	S	
Doxiciclina	R	S	R	R	R	R	R	
Sulfametoxazol	R	R	R	R	R	R	R	

S: sensível. I: intermediário. R: resistente. A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7: isolados clínicos incluídos no estudo.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo realizou-se a caracterização de isolados de MCR de pacientes submetidos a procedimentos invasivos de Minas Gerais no período de janeiro de 2007 a junho de 2011. Segundo nota técnica da ANVISA, em 2008, as infecções por micobactérias relacionadas à assistência a saúde, na proporção alcançada no Brasil, se configuraram epidemiologicamente como uma doença emergente. Casos foram identificados em quase todos os estados do país (BRASIL, 2008b).

A literatura é escassa sobre dados dessas infecções em Minas Gerais. Segundo relatório da ANVISA, de 1998 a 2009, dez estados concentraram 97,8% dos casos notificados no Brasil, dentre eles Minas Gerais, com 31 (1,2%) casos (BRASIL, 2011). Assim, o presente estudo incluiu alguns isolados dos casos reportados pela ANVISA e outros não, embora a correspondência exata não possa ser avaliada precisamente. Sabe-se que existe uma subnotificação dos casos, cuja magnitude é impossível de ser estimada. Além disso, existem muitas falhas e inconsistências nas notificações, como ausência de informação quanto à localidade da ocorrência de casos e falta de padronização no registro de variáveis (BRASIL, 2011).

Segundo a ANVISA, a endemicidade crescente das infecções por MCR relacionadas à assistência a saúde pode ser explicada por várias hipóteses: introdução de novos agentes, que passam de uma apresentação rara para uma importância maior, à medida que ocorre a natural evolução da assistência à saúde; melhoria na capacidade diagnóstica laboratorial no país, com o avanço das tecnologias e competências diagnósticas; aumento da sensibilidade de detecção e notificação dos casos após a divulgação massiva das ocorrências nos anos de 2005 e 2007 no país; produção crescente de biofilmes nos produtos para saúde reprocessados; introdução e uso disseminado de novas práticas de saúde, como por exemplo, certos procedimentos cosméticos (BRASIL, 2011).

Estudo feito pela ANVISA sugere que os casos notificados nos Estados fazem parte de uma situação endêmica de infecções de sítio cirúrgico por MCR, cujos números não são expressivos quando comparados ao número de procedimentos realizados nestes Estados. Apesar das MCR envolvidas nas infecções relacionadas à assistência a saúde serem consideradas de endemicidade crescente, tal fenômeno é inaceitável, dado que a grande maioria dessas infecções são preveníveis por meio de estratégias elementares de controle de infecções (BRASIL, 2011). Estratégias efetivas de educação, vigilância, controle, supervisão e fiscalização são, portanto, necessárias. Dentre as ações necessárias, incluem-se implantação de sistema de resposta rápida para ocorrências de eventuais surtos; estruturação de sistema de resposta apropriada para o diagnóstico laboratorial de infecções; ênfase na aplicação das normativas da ANVISA, particularmente ao que se refere ao processamento de artigos, vigilância epidemiológica de casos e rastreabilidade de produtos e insumos (BRASIL, 2008b; BRASIL, 2011).

No presente estudo, pacientes que realizaram procedimentos invasivos cirúrgicos representaram a maioria (60%), enquanto que procedimentos invasivos não cirúrgicos foram relacionados em 20% dos casos. Dentre as cirurgias, seis foram realizadas em hospitais, uma em clínica e cinco casos não informaram o local de realização da cirurgia. Verificou-se a predominância de cirurgias estéticas (mamoplastia e lipoaspiração) e, na grande maioria, realizadas no sexo feminino.

É importante ressaltar o elevado número de casos (40%) sem informação quanto ao local e município do procedimento. Notou-se que, em muitas fichas de notificação, os campos contendo dados da instituição que realizou o procedimento não foram preenchidos.

As MCR isoladas foram *M. fortuitum* (40% dos casos), *M. abscessus* subsp. *abscessus* (20%), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (15%), *M. chelonae* (15%), *M. peregrinum* (5%) e uma MCR sem identificação de espécie (5%). Estudo feito pela ANVISA, avaliando casos notificados de infecções associadas a procedimentos invasivos no Brasil, mostrou que as espécies mais incidentes, como um todo, foram *M. abscessus* (31,3%), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (30,4%), *M. fortuitum* (13,8%), *M. chelonae* (1,5%) e outras espécies corresponderam a 2,7%, como *M.*

mucogenicum, *M. porcinum*, *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. immunogenum*, *M. neoarum*, *M. peregrinum*, *M. phocaicum* e *M. senegalense* (BRASIL, 2011). Observa-se, portanto, correspondência entre as espécies mais frequentemente isoladas em Minas Gerais e no Brasil, embora a frequência relativa para cada uma delas apresente variações. Essa variação pode estar relacionada ao pequeno número de isolados avaliados no presente estudo.

Os procedimentos invasivos deste estudo envolveram, em sua maioria, cirurgia de mama (50%). Nesse tipo de cirurgia, o agente mais presente foi *M. fortuitum* (60%), seguida de *M. abscessus* (20%), *M. peregrinum* (10%) e MCR sem identificação de espécie (10%). Em estudo feito pela ANVISA, quando avaliados procedimentos de cirurgia de mama, houve predominância de procedimentos realizados no sexo feminino e o agente mais isolado foi *M. fortuitum* (57,6%), seguido de *M. abscessus* (15,2%), MCR sem identificação da espécie (14,1%), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (7,1%); outras espécies de MCR corresponderam a 6% dos casos. Casos confirmados e suspeitos de infecções por MCR associados a procedimentos de cirurgia de mama, no Brasil, de 1998 a 2009, envolveram vários Estados, sendo que os Estados com maior número de casos foram São Paulo (27,6%), Espírito Santo (26,2%), Rio de Janeiro (14,8%), Mato Grosso (8,6%), Goiás (5,7%) e Pará (4,8%). Minas Gerais apresentou cinco casos no período (2,4%). Do total de casos do Brasil, 98,6% envolveram sexo feminino e a idade média foi de 34,4 anos. (BRASIL, 2011).

Neste estudo, em apenas um caso foi relatado acesso por videocirurgia, em que foi realizada cirurgia abdominal, cujo agente isolado foi *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Eventos associados a procedimentos com acesso por videocirurgias no Brasil corresponderam a 1722 casos, com predominância de procedimentos abdominais (80,1%), visto ser esta a topografia mais frequentemente manipulada nos procedimentos cirúrgicos com acesso por videocirurgia. Estes foram distribuídos principalmente em oito Estados do país e envolveram várias espécies de micobactérias. Deve-se ressaltar que houve uma epidemia de grandes dimensões em diferentes Estados do país, que se caracterizou pela presença de um clone predominante de *M. abscessus* subsp. *bolletii* (BRASIL, 2011).

Os isolados do estudo oriundos de pacientes que realizaram procedimentos invasivos não cirúrgicos corresponderam a procedimentos estéticos na face (três casos) e de injeções repetidas de anabolizante (um caso). No Brasil, de 1998 a 2009, foram notificados 141 casos, confirmados ou suspeitos, associados a procedimentos invasivos não cirúrgicos. Tais procedimentos envolveram tratamento estético, aplicação de substâncias cosméticas por via subcutânea, aplicação de medicamentos e imunobiológicos, procedimentos endoscópicos por vias naturais (endoscopia, broncoscopia, histeroscopia) e biópsias. Essas ocorrências foram registradas nos Estados de São Paulo (56,7%), Rio de Janeiro (14,9%), Distrito Federal (11,3%), Pará (10,6%). Em Minas Gerais foram registrados quatro casos, o que correspondeu a 2,8%. Do total dos casos, 77,3% envolveram sexo feminino e 22% masculino, a idade média foi de 35 anos. Procedimentos estéticos e aplicação de imunobiológicos foram os mais frequentes e representaram 41,8% dos casos cada um. Dos casos confirmados, a maior parte envolveu *M. abscessus* (57,1%), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (26,8%), *M. chelonae* (7,1%), MCR sem identificação da espécie (7,1%) e 1,8% envolvendo *M. fortuitum* (BRASIL, 2011).

Nota-se que os casos incluídos no estudo aparentemente não apresentaram vínculo epidemiológico, uma vez que envolveram instituições, municípios e agentes etiológicos diferentes. Oito instituições foram listadas, dentre elas hospitais (A, B, C, D, E e F) e clínicas (A e B). A exceção ocorreu em uma instituição (clínica B), no município de Belo Horizonte, onde foi caracterizado surto de infecção por MCR.

A ausência de informações epidemiológicas de variáveis de interesse foi uma limitação para a condução desse estudo, para uma acurada análise da situação epidemiológica, principalmente em relação ao município e local do procedimento. Devido às poucas informações obtidas, os resultados apresentados devem ser considerados como uma análise descritiva dos dados disponíveis.

Com o avanço das tecnologias diagnósticas, microrganismos de identificação mais rara passam a figurar no cenário epidemiológico (BRASIL, 2011). A identificação das espécies é importante, não só para a conduta terapêutica adequada, pois cepas isoladas apresentam diferentes padrões de sensibilidade antimicrobiana, mas também para o mapeamento, análise epidemiológica, vigilância

e controle sanitário. A implementação de testes específicos e precisos é importante em laboratórios de referência em saúde pública para elucidação rápida de diversos casos.

Micobactérias podem ser rapidamente identificadas no laboratório clínico pelo método PRA-*hsp65*. Tal método amplifica uma região conservada do gene *hsp65* que está presente em todas as espécies de micobactérias e em algumas outras bactérias, como *Nocardia* spp. (CHIMARA *et al.*, 2008).

A técnica PRA-*hsp65* foi importante para a identificação de quase todos os isolados clínicos desse estudo. Sua aplicação confirmou a identificação fenotípica e possibilitou a identificação precisa de 27 (87,1%) isolados de 19 pacientes (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*). Para quatro isolados de um paciente (C4) não foi possível realizar identificação por essa técnica, uma vez que o perfil PRA-*hsp65* gerado não foi reportado nas publicações consultadas. Novos perfis de PRA-*hsp65* podem ser novas variações alélicas dentro das espécies, mutações que resultam em perda de sítios de restrição de *HaeIII*. Para identificação desses isolados seria necessário realização de outras técnicas de identificação, como o sequenciamento de DNA (CHIMARA *et al.*, 2008).

Não obstante, o PRA-*hsp65* apresenta limitações tais como vários padrões distintos, que podem resultar em uma alta frequência de padrões ambíguos ou não interpretáveis. As tabelas de referência publicadas apresentam padrões que diferem dentro de um intervalo de 5-15 pares de bases e não há padrões para espécies recentemente descritas. Além disso, variações relacionadas com a preparação de gel, condições de execução e ferramentas de documentação complicam a interpretação dos padrões de digestão (CHIMARA *et al.*, 2008).

Outra limitação relaciona-se ao fato que pelo PRA-*hsp65* relativamente poucos sítios polimórficos em uma região conservada do genoma são avaliados, que embora permita a identificação de vários isolados, limita a análise de variabilidade genética dentro de cada espécie, aspecto útil para o reconhecimento de surtos e padrões epidemiológicos significativos.

Métodos moleculares têm se tornado ferramenta valiosa nas investigações de surtos e epidemias causadas por MCR. PFGE, método mais utilizado para a diferenciação de cepas de MCR e de outras micobactérias não tuberculosas (GRIFFITH *et al.*, 2007), tem sido aplicado na confirmação da clonalidade de cepas envolvidas em surtos e epidemias. Tal método possibilita maior poder discriminatório de padrões, mas é tecnicamente difícil, trabalhosa, e requer equipamentos caros.

Alternativamente, o *DNA fingerprinting* é importante ferramenta para complementar dados obtidos com investigação epidemiológica. Técnicas de RAPD-PCR também têm sido utilizadas, sendo rápidas e úteis para análise molecular de surtos por MCR (SAMPAIO *et al.*, 2006b).

O ERIC-PCR, uma técnica utilizada para tipagem de enterobactérias, permite a avaliação de regiões polimórficas do genoma e permitiu estabelecer relações clonais entre diferentes isolados de *Mycobacterium tuberculosis* (SECHI *et al.*, 1998). ERIC-PCR provavelmente funciona como método RAPD-PCR em micobactérias, uma vez que a presença de repetições ERIC não foi demonstrada em genomas de *Mycobacterium* disponíveis, e a amplificação com oligonucleotídeos iniciadores ERIC1 e ERIC2 pode ocorrer na ausência de sequências ERIC verdadeiras (GILLINGS & HOLLEY, 1997; SAMPAIO *et al.*, 2006b). Sampaio e colaboradores (2006b), avaliando MCR do Grupo *M. chelonae-abscessus*, considerou ERIC-PCR um método de tipagem molecular simples, de alto rendimento, a custos acessíveis, reprodutível e de discriminação molecular para inferência de parentesco genético para essas micobactérias.

Entre as limitações relacionadas a técnica de RAPD-PCR, ressalta-se que mudanças nas condições de reação e diferentes protocolos podem afetar os resultados e sua interpretação (SAMPAIO *et al.*, 2006b). Além disso, por se tratar de uma técnica pouco específica, DNA proveniente de populações heterogêneas e contaminações podem afetar os perfis e a reprodutibilidade dos resultados.

Neste estudo, foi aplicada pela primeira vez a técnica ERIC-PCR para reconhecer isolados clínicos de MCR de Minas Gerais e verificar potencial parentesco genético. Esta técnica foi aplicada em diferentes espécies de MCR,

cl clinicamente relevantes, e, com exceção de isolados de três casos, tais agentes aparentemente não apresentavam vínculo epidemiológico. Este foi um estudo retrospectivo e com número reduzido de isolados, limitando uma acurada análise da situação epidemiológica das MCR em Minas Gerais. No entanto, alguns aspectos relacionados aos resultados obtidos com ERIC-PCR merecem ser ressaltados e discutidos.

A técnica de ERIC-PCR permitiu a realização de uma análise geral da diversidade genética entre as cepas estudadas, pela facilidade e rapidez, e mostrou-se reprodutível. Os perfis de ERIC-PCR obtidos para mais de um isolado de um mesmo paciente foram indistinguíveis e, por isso, foi selecionado apenas um isolado de cada paciente para representação neste trabalho. A técnica apresentou relativa dificuldade na análise devido ao grande número de bandas, com intensidades variáveis, geradas na eletroforese.

Os perfis obtidos por ERIC-PCR revelaram maior diversidade genética entre os isolados clínicos de MCR, como um todo, em comparação com método PRA-*hsp65*. Enquanto o PRA-*hsp65* demonstrou similaridade entre os isolados de *M. fortuitum*, o ERIC-PCR revelou perfis distintos para os isolados F1, F2, F3, F5, F6, F7 e indistinguíveis para F4 e F8. Para os isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus*, enquanto o PRA-*hsp65* demonstrou similaridade entre todos eles, o ERIC-PCR revelou distinção entre A3 e os isolados A1, A2 e A4. PRA-*hsp65* demonstrou também similaridade entre os isolados de *M. abscessus* subsp. *bolletii* (A5, A6 e A7), ERIC-PCR gerou três agrupamentos, um com A6, outro com A5 e um terceiro com A7 e "*Mycobacterium massiliense*" INCQS 594. Entre os isolados agrupados pelo PRA-*hsp65* como *M. chelonae*, C1 e C2 apresentaram perfis indistinguíveis, porém distintos de C3 pela ERIC-PCR. Os isolados C4 e C5 apresentaram perfis bem distintos dos demais.

Assim, o emprego da técnica de ERIC-PCR revelou, para alguns isolados, alto grau de similaridade, onde 100% das bandas observadas foram compartilhadas, indicando que estes isolados são geneticamente muito similares e possivelmente derivados de um mesmo precursor (origem clonal). Um deles correspondeu aos isolados de pacientes C1 e C2, com perfis PRA-*hsp65* correspondentes a *M.*

chelonae tipo 1, oriundos de pacientes com vínculo epidemiológico, ou seja, pacientes submetidos a procedimentos invasivos em uma mesma instituição. O isolado C3, apesar de proveniente de paciente da mesma instituição, não apresentou perfil ERIC-PCR idêntico. Tais isolados foram referidos pela ANVISA como surto localizado em uma única instituição, no ano de 2008, de casos confirmados oriundos de pacientes que realizaram procedimentos estéticos em face (BRASIL, 2011).

Para isolados agrupados pelo *PRA-hsp65* como *M. fortuitum* tipo 1/ *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* tipo 1, a tipagem pelo ERIC-PCR aponta para a presença de diferentes clones, sem a presença de um clone predominante ou fonte única, sugerindo que tais agentes correspondem a diferentes genótipos desta espécie e que não houve disseminação clonal entre as instituições envolvidas. A exceção ocorreu com os isolados F4 e F8, que apresentaram padrões ERIC-PCR indistinguíveis, e embora originados de pacientes do mesmo município (Uberaba), não apresentaram relação epidemiológica clara, uma vez que realizaram mamoplastia em instituições diferentes (Hospital B e D, respectivamente). Não foi possível estabelecer vínculos entre as instituições devido a ausências de informações.

Os isolados agrupados pelo *PRA-hsp65* como *M. abscessus* subsp. *abscessus* apresentaram perfis de ERIC-PCR bem similares, sendo que os isolados A1, A2 e A4 foram considerados similares e separados de A3. Dentre os isolados A1, A2 e A4, apenas foi conhecida a procedência do isolado A1 e, apesar de possivelmente derivados de um mesmo precursor, não foi possível estabelecer relações entre eles.

Entre os isolados agrupados pelo *PRA-hsp65* como *M. abscessus* subsp. *bolletii*, o isolado A7 foi mais próximo da cepa de referência "*M. massiliense*", que é representante de surto de infecções cirúrgicas no Brasil. No entanto, informações a respeito do local do procedimento para este isolado não foram obtidas. Estudos genotípicos determinaram mudanças na nomenclatura das MCR. *M. abscessus* é composta por um grupo heterogêneo de micobactérias, atualmente classificadas em *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* (LEÃO *et al.*, 2009)

com a última subespécie acomodando micobactérias previamente identificadas como "*Mycobacterium bolletii*" ou "*Mycobacterium massiliense*" (ADÉKAMBI *et al.*, 2004; ADÉKAMBI *et al.*, 2006).

Os isolados de C4 não foram identificados ao nível de espécie pelas técnicas aplicadas neste estudo e, além disso, não foi agrupado com demais isolados estudados após aplicação da técnica de ERIC-PCR. Sempre que houver disponibilidade técnica, é recomendável que a identificação em nível de espécie seja realizada por sequenciamento de DNA. Certo número de alvos úteis para efeitos de identificação têm sido detectados no genoma das micobactérias. Alvos incluem o gene 16S rRNA, universalmente considerado a primeira escolha para micobactérias em geral, e alternativas como análise das sequências de *hsp65*, *rpoB* e espaçadores internos transcritos 16S-23S. Alvos menos comuns incluem *recA*, *sodA* e *gyrB*. Estes alvos têm mostrado resultados promissores na detecção de espécies de MCR, porém, o alvo de escolha para MCR é o gene *rpoB* (ADÉKAMBI *et al.*, 2003; BRASIL, 2008; SET & SHASTRI, 2011; TORTOLI, 2010).

Identificação e teste de sensibilidade para MCR não são amplamente disponíveis em laboratórios clínicos. Visto que o Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas, inserido na Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças do LACEN-MG, é referência estadual em diagnóstico bacteriológico de micobactérias, é importante que o mesmo disponha de capacidade para realização de teste de sensibilidade e identificação da espécie por método molecular e, além disso, possa responder com metodologias, tais como ERIC-PCR, para esclarecimento de suspeita de surto por esses agentes no Estado. O LACEN-MG ainda não realiza o teste de sensibilidade para estes agentes. Assim, constituiu-se em objetivo desse trabalho padronizar e avaliar a técnica de MIC com modificações como teste de sensibilidade para estes agentes, visando sua implantação no LACEN-MG.

Nesse estudo, realizou-se avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos por microdiluição em caldo, método considerado padrão-ouro para realização de teste de sensibilidade *in vitro* para espécies de MCR mais comuns (Grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*). Visando avaliar e padronizar a metodologia de MIC, isolados de *M. chelonae* e de *M. abscessus* foram selecionados inicialmente, uma

vez que seu perfil de sensibilidade é variável. Por outro lado, o grupo *M. fortuitum* apresenta maior sensibilidade a drogas quando comparado a *M. abscessus* e *M. chelonae* (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002) e, embora não tenham sido analisados os perfis dos isolados de *M. fortuitum*, conduzir essa análise se constitui em uma perspectiva da continuidade do presente estudo.

Embora o procedimento de microdiluição para MCR não seja tecnicamente difícil de realizar, a interpretação requer habilidade, adquirida através da experiência, além do conhecimento de padrões de sensibilidade esperados para diferentes espécies. Crescimento de MCR em microplacas frequentemente não aparece com alta nitidez, como um “botão” bem definido no fundo do poço.

Como alternativa, um ensaio colorimétrico, utilizando o indicador resazurina permitiu a visualização da mudança de cor na leitura (MARTIN *et al.*, 2005). Porém, dificuldades de leitura e interpretação consistiram na viragem de cor do azul para rosa devido a diferentes nuances entre estas cores. A MIC obtida foi a mesma para as duas formas de avaliar o crescimento bacteriano, apenas foi verificado que a técnica colorimétrica utilizando resazurina foi considerada mais fácil de visualização.

Os dois isolados de *M. chelonae* foram resistentes à tobramicina, com MIC elevada. A MIC obtida para tobramicina foi superior ao normalmente encontrado para tais espécies, mesmo após a repetição dos testes. Cumpre ressaltar que tobramicina não é recomendada para tratamento de infecções por MCR no Brasil, como descrito em Nota técnica SVS/MS e ANVISA (BRASIL, 2009b).

Segundo o CLSI (2011), quando resultados são inesperados, o ideal seria a confirmação em outros laboratórios de referência. Não obstante e, enquanto se aguarda essa confirmação, uma vez que os controles empregados e outros isolados apresentaram perfil de sensibilidade a tobramicina, podemos levantar a hipótese de que os isolados C1 e C2 apresentam de fato um perfil distinto daquele em geral reportado pela literatura. Curiosamente, esses isolados apresentaram elevado nível de similaridade entre si no ERIC-PCR, distintos dos demais isolados de outras espécies analisadas. Embora oriundos de um surto, os isolados de *M. chelonae* apresentaram diferença de sensibilidade a cefoxitina, sendo C2 sensível e C1

apresentou perfil intermediário. O isolado C3, recuperado para realização das técnicas moleculares, não foi submetido ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos por não conseguir alcançar a turbidez correspondente à escala de 0,5 McFarland.

Todos os isolados testados (*M. chelonae* e *M. abscessus*) apresentaram resistência ao sulfametoxazol. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que menos de 10% dos isolados do grupo *M. chelonae-M. abscessus* exibem sensibilidade à sulfonamidas (BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012).

Em relação a *M. abscessus* subsp. *bolletii*, isolados apresentaram perfil de sensibilidade semelhante, sendo todos sensíveis à amicacina (MIC \leq 4 $\mu\text{g/mL}$) e claritromicina (MIC \leq 0,5 $\mu\text{g/mL}$), mas resistentes à ciprofloxacino, doxiciclina e sulfametoxazol. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Monego e colaboradores (2011), de isolados de infecção pós-cirúrgica em Curitiba, Duarte e colaboradores (2009), de isolados de surto no Rio de Janeiro e Cardoso e colaboradores (2011) ao avaliar cepas recuperadas de surto em Goiás. Estes isolados obtiveram MIC intermediária à cefoxitina (MIC = 32 $\mu\text{g/mL}$), como encontrado por Cardoso e colaboradores (2011).

Todos os isolados de *M. abscessus* apresentaram sensibilidade à amicacina e perfil intermediário à cefoxitina. De fato, o agente mais ativo contra *M. abscessus* é amicacina e isolados não tratados de *M. abscessus* têm MIC baixa ou intermediária (\leq 32-64 $\mu\text{g/mL}$) para cefoxitina (BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012).

Claritromicina têm sido indicada como droga de escolha para tratamento de infecções causadas por MCR (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002; GRIFFITH *et al.*, 2007). Macrolídeos, como claritromicina, são os agentes terapêuticos mais frequentemente empregados para *M. abscessus* subsp. *bolletii*, mas a importância deste grupo de antimicrobianos é muito menor para isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* (BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012). Neste estudo, apenas um isolado (A2), correspondente a *M. abscessus* subsp. *abscessus*, apresentou resistência a claritromicina, com MIC = 16 $\mu\text{g/mL}$. Para *M. abscessus*, resistência adquirida a claritromicina têm sido reportada em pacientes que receberam monoterapia. Em

situações difíceis, como resistência de *M. abscessus* a macrolídeos, é recomendada combinação de agentes parenterais, baseada na MIC *in vitro*, como por exemplo, amicacina com cefoxitina ou amicacina com imipenem para tratamento de pacientes adultos com infecções por *M. abscessus* subsp. *abscessus* (NESSAR *et al.*, 2012; BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012).

Infecções cutâneas associadas a *M. abscessus*, *M. chelonae* ou Grupo *M. fortuitum* devem ser tratadas de acordo com protocolos específicos para as espécies específicas envolvidas, considerando fatores como apresentação clínica e estado imunológico do paciente (BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012; GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012). Monoterapia com um macrolídeo para infecções localizadas com *M. chelonae* pode ser suficiente, enquanto que múltiplos antimicrobianos são essenciais se a infecção é disseminada ou se outras espécies estão envolvidas. Testes de sensibilidade *in vitro* são cruciais (BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012). Um aspecto de especial relevância no tratamento dos pacientes é a necessidade de se remover qualquer corpo estranho presente, como por exemplo próteses. Micobactérias são capazes de produzir biofilme, o que facilita resistência antimicrobiana e requer a remoção do material para alcançar cura definitiva do paciente (GARCÍA-MARTOS & GARCÍA-AGUDO, 2012).

Regimes de tratamento na doença extrapulmonar causada por MCR são principalmente baseados em resultados de testes de sensibilidade às drogas *in vitro*. Estudos de séries com grande número de cepas podem orientar a terapêutica empírica, tendo em conta o conhecimento global da sensibilidade de diferentes espécies de micobactérias em áreas geográficas específicas. No entanto, recomenda-se um estudo individual de cada isolado, porque as diferenças nos resultados da sensibilidade podem ter um significado considerável para o tratamento (GARCÍA-AGUDO & GARCÍA-MARTOS, 2011).

Resistência natural a drogas determina uma grande parte da multirresistência, que é comum na MNT. Esta multirresistência, por sua vez, é uma explicação provável da eficácia limitada dos atuais regimes de tratamento para a doença por MNT. Além disso, para a maioria das drogas não existe uma correlação clara entre a atividade *in vitro* e o resultado do tratamento, *in vivo*. Esses aspectos ainda devem

ser objeto de investigação para médicos e microbiologistas envolvidos no tratamento de doenças micobacterianas. A influência de interações farmacocinéticas entre as várias drogas e a formulação de parâmetros farmacodinâmicos que predizem os resultados devem ser contabilizados em estudos de correlação desse tipo (van INGEN *et al.*, 2012). Não obstante, a terapia das infecções por MNT é frequentemente estabelecida de forma empírica pelos médicos, embora testes de sensibilidade para MNT tenham sido feitos por muitos anos para prever a eficácia clínica de antimicrobianos específicos contra isolados de MNT (BROWN-ELLIOT *et al.*, 2012). Van Ingen relata que, apesar do fato de que os testes de sensibilidade de MNT a drogas serem uma ferramenta já estabelecida no laboratório, o seu valor clínico ainda não foi revelado e suficientemente estudado (van INGEN *et al.*, 2012).

No presente estudo foi conhecida a sensibilidade a drogas de isolados clínicos de *M. abscessus* e de *M. chelonae* do Estado de Minas Gerais. Consideramos que esse é um passo importante, pois se trata de um laboratório de referência do estado. Nesse sentido, o presente estudo oferece uma contribuição significativa ao conhecimento a cerca da sensibilidade e dos métodos de detecção das MCR em nosso meio.

Entre as MCR, há uma escassez de dados de sensibilidade para outras espécies que não as espécies mais encontradas - *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* (BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012). Embora no presente estudo o perfil de sensibilidade a alguns antimicrobianos tenha sido estabelecido para as espécies mais frequentes, a metodologia se encontra agora padronizada, podendo ser aplicada ao estudo de outras espécies, porventura isoladas no Estado, incluindo os isolados de *M. fortuitum* já disponíveis e que não foram avaliados até o momento.

Algumas limitações podem ser listadas e que dificultaram a condução do presente estudo e obtenção de dados que permitam traçar um perfil epidemiológico e genotípico das MCR em Minas Gerais. Entre essas limitações podemos listar algumas que, apesar de escapar do nosso controle, podem ter interferido em um maior poder estatístico e discriminatório ou na aplicação de métodos mais sofisticados de genotipagem, a saber: a escassez de informações sobre a origem, processos infecciosos associados aos isolados, pequeno número de isolados,

dificuldade de obtenção de cepas de referência, e escassez de tempo. Não obstante, o presente estudo representa uma importante contribuição sobre as MCR isoladas no Estado de Minas Gerais e no Brasil, estabelecendo uma base para estudos posteriores empregando maior número de isolados e técnicas diversificadas. Ressalta-se também contribuição relacionada ao aprimoramento técnico e científico dos profissionais e padronização de novas técnicas que podem ser aplicadas no LACEN-MG, permitindo a prestação de um serviço de melhor qualidade à população.

7 CONCLUSÕES

- A técnica de PRA-*hsp65* permitiu a identificação de 87,1% dos isolados de micobactérias de crescimento rápido analisados. Um novo perfil, ainda não descrito na literatura, foi também evidenciado.
- As micobactérias de crescimento rápido oriundas de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em Minas Gerais foram identificadas por PRA-*hsp65*, sendo *M. fortuitum*, a mais frequente, seguida de *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolettii*, *M. chelonae* e *M. peregrinum*.
- A técnica de ERIC-PCR permitiu a realização de uma análise geral da diversidade genética entre as cepas estudadas, pela facilidade, rapidez e reprodutibilidade em sua execução, sendo uma ferramenta útil para a avaliação epidemiológica de MCR.
- A genotipagem dos isolados por ERIC-PCR evidenciou perfil genético idêntico para dois isolados de *M. chelonae*, ambos envolvidos em surto de infecção após procedimento invasivo estético em Minas Gerais, sugerindo a possibilidade de fonte comum de infecção.
- Três isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* e dois isolados de *M. fortuitum* também apresentaram perfil genotípico idêntico, porém o vínculo epidemiológico entre eles não pôde ser estabelecido.
- A MIC, determinada por da técnica colorimétrica utilizando resazurina, se apresentou como uma boa alternativa para avaliação da sensibilidade de MCR aos antimicrobianos, comparável à determinação manual, principalmente pela visualização mais fácil e menos subjetiva.

- O perfil de sensibilidade dos isolados de *M. chelonae* evidenciou sensibilidade à amicacina, ciprofloxacino, claritromicina e doxiciclina e resistência à sulfametoxazol e tobramicina.
- Os isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* evidenciaram dois perfis de sensibilidade: um deles apresentou sensibilidade à amicacina e claritromicina, perfil intermediário para cefoxitina e resistência à ciprofloxacino, doxiciclina e sulfametoxazol. Outro apresentou sensibilidade à amicacina, ciprofloxacino e doxiciclina, perfil intermediário para cefoxitina e resistência à claritromicina e sulfametoxazol.
- O perfil de sensibilidade dos isolados de *M. abscessus* subsp. *bolletii* evidenciou sensibilidade à amicacina e claritromicina, sensibilidade intermediária para cefoxitina e resistência à ciprofloxacino, doxiciclina e sulfametoxazol.
- Ainda existem falhas importantes no registro e notificação de casos de infecções por MCR no Estado de Minas Gerais que limitam significativamente estudos científicos e geração de conhecimento sobre a epidemiologia e diversidade das mesmas em nosso Estado.

8 PERSPECTIVAS

- Introduzir, no LACEN-MG, o teste de sensibilidade para MCR por meio da determinação da concentração inibitória mínima e a técnica de genotipagem ERIC-PCR.
- Avaliar perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para os isolados de *M. fortuitum* que não foram avaliados neste estudo.
- Continuar avaliando novos isolados de MCR recuperados de pacientes com suspeita de infecção após procedimentos invasivos.
- Capacitar profissionais do LACEN-MG para realização das técnicas de testes de sensibilidade e genotipagem.
- Realizar sequenciamento parcial do gene *rpoB* para isolado não identificado no presente estudo.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o objetivo de melhor caracterizar alguns isolados, iniciamos a realização do sequenciamento parcial do gene *rpoB* para quatro amostras em estudo, três delas dos isolados de *M. abscessus* subsp. *bolletii* e um isolado não identificado no presente estudo. Os protocolos para realização do sequenciamento estão descritos no Apêndice D e os primeiros resultados obtidos no Apêndice E. O gene *rpoB* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico dos diferentes isolados, clonado em vetor plasmidial e submetido ao sequenciamento de DNA. No entanto, os resultados do sequenciamento não se tornaram disponíveis de serem incluídos no presente estudo. Esperamos, dessa forma, complementar o trabalho e contribuir ainda mais para o estudo das micobactérias de crescimento rápido em Minas Gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÉKAMBI, T.; COLSON, P.; DRANCOURT, M.. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing Mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 12, p. 5699-5708, dezembro de 2003.

ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 2095-2105, 2004.

ADÉKAMBI, T.; GAUBERT, R. M.; GREUB, G.; GEVAUDAN, M. J.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M.. Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 12, p. 5493-5501, dezembro 2004.

ADÉKAMBI, T.; BERGER, P.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M.. rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous Mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 133-143, 2006.

ADÉKAMBI, T. *Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review. **Clinical Microbiology and Infectious**. v. 15, n.10, p. 911-918, 2009.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ficha de notificação de caso de micobacteriose não tuberculosa (MCR) após procedimentos médicos invasivos. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2007/090507_form.pdf>. Acesso em 02 de fevereiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília, 2008a. 436p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota técnica. Micobactérias. 08 de agosto de 2008b. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.pdf>. Acesso em: 23 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução – RE nº 2.606, de 11 de agosto de 2006.** Dispõe sobre as diretrizes para elaboração, validação e implantação de protocolos de reprocessamento de produtos médicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 de agosto de 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/res2606_11_08_2006.html>. Acesso em 29 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 8, de 27 de fevereiro de 2009.** Dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido-MCR em serviços de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de março de 2009a. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0008_27_02_2009.html>. Acesso em 29 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações, diagnóstico clínico, microbiológico e tratamento. Nota técnica conjunta nº 01/2009 SVS/MS e ANVISA. Brasília, 24 de abril de 2009b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/nota_tecnica_conjunta.pdf>. Acesso em 21 de março de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009c.** Dispõe sobre a comprovação da eficácia de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente à micobactéria "*Mycobacterium massiliense*" e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 de outubro de 2009c. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0051_21_10_2009.html>. Acesso em 29 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos. Relatório descrito de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009. Fevereiro de 2011. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/relatorio_descrito_mcr_16_02_11.pdf> Acesso em 12 de novembro de 2012.

BRENNER, J. D.; KRIEG, R. N.; STANLEY, T. J.; **Bergey's manual of systematic bacteriology: the proteobacteria: introductory essays**. ed. 2, v. 2, Springer; New York 2005.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Jr.. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n. 4, p. 716-746, 2002.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; NASH, K. A.; JUNIOR, R. J. W.. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, p. 545-582, 2012.

BRUNELLO, F.; LIGOZZI, M.; CRISTELLI, E.; BONORA, S.; TORTOLI, E.; FONTANA, R. Identification of 54 micobacterial species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* gene. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 8, p. 2799-2806, agosto 2001.

CARDOSO, A.M.; SOUSA, E.M.; VIANA-NIERO, C.; BORTOLI, F.B.; NEVES, Z.C. P.; LEÃO, S.C.; KIPNIS, A.P.J.; KIPNIS, A. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes and Infection**. v. 10, p.1552-1557, outubro 2008.

CARDOSO, A. M.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium massiliense* recovered from wound samples of patients submitted to arthroscopic and laparoscopic surgeries. **Minimally Invasive Surgery**. v. 2011, I.D. 724635, 4 p., 2011.

CHIMARA, E; FERRAZOLI, L.; UEKY, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; DURHAM, A. M.; ARBEIT, R. D.; LEÃO, S. C. Reliable identification of Mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. **Biomed Central Microbiology**. v. 8, n. 48, 29 p., 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second Edition. **CLSI document M24-A2**. Pennsylvania. v. 23, n. 18, 14 p., 2011.

da COSTA CRUZ, J. C. *Mycobacterium fortuitum*: um novo bacilo acido-resistente patogênico para o homem. **Acta Medica do Rio de Janeiro**. v. 1, p. 297-301, 1938.

CORREA, N. E.; CATANO, J. C.; MEJIA, G. I.; REALPE, T.; OROZCO, B.; ESTRADA, S.; VELEZ, A.; VELEZ, L.; BARON, P.; GUZMAN, A.; ROBLEDOS, J. Outbreak of mesotherapy-associated cutaneous infections caused by *Mycobacterium chelonae* in Colombia. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v. 63, p. 143-145, 2010.

COSTA, A. R. F.; LOPES, M. L.; LEÃO, S. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; SOUSA, M. S.; SUFFYS, P. N.; CORVELO, T. C. O.; LIMA, K. V. B. Molecular identification of rapidly growing Mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the State of Pará, Amazon region, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 65, p. 358–364, 2009.

DEVALLOIS, A.; GOH, K.S.; RASTOGI, N. Rapid identification of Mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **Journal of Clinical Microbiology**. v.35, n.11, p. 2969-2973, novembro 1997.

DUARTE, R. S.; LOURENCO, M. C. S.; FONSECA, L. S.; LEÃO, S. C.; AMORIM, E. L. T.; ROCHA, I. L. L.; COELHO, F. S.; VIANA-NIERO, C.; GOMES, K. M.; SILVA, M. G.; LORENA, N. S. O.; PITOMBO, M. B.; FERREIRA, R. M. C.; GARCIA, M. H. O.; OLIVEIRA, G. P.; LUPI, O.; VILAÇA, B. R.; SERRADAS, L. R.; CHEBABO, A.; MARQUES, E. A.; TEIXEIRA, L. M.; DALCOLMO, M.; SENNA, S. G.; SAMPAIO, J. L. M. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 7, p. 2149-2155, julho 2009.

EUZÉBY, J. P. *Mycobacterium massiliense* sp. nov. In list of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published, Validation List no. 111. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 2025-2027, 2006.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em <<http://www.bacterio.net>>. Atualização em novembro de 2012. Acesso em 06 de dezembro de 2012.

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 9, n. 2, p. 177-215, abril 1996.

FALKINHAM III, J. O. Nontuberculous Mycobacteria in the environment. **Clinics in Chest Medicine**. v. 23, p. 529-551, 2002.

FALKINHAM III, J. O. Surrounded by micobactéria: nontuberculous Mycobacteria in the human environment. **Journal of Applied Microbiology**. v. 107, p. 356-367, 2009.

FREITAS, D.; ALVARENGA, L.; SAMPAIO, J.; MANNIS, M.; SATO, E.; SOUSA, L.; VIEIRA, L.; YU, M. C.; MARTINS, M. C.; HOFFLING-LIMA, A.; BELFORT, R. Jr. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. **Ophthalmology**. v. 110, n. 2, fevereiro 2003.

GARCÍA-AGUDO, L.; GARCÍA-MARTOS, P. Clinical significance and antimicrobial susceptibility of rapidly growing mycobacteria. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, v. 1, 691p., 2011.

GARCÍA-MARTOS, P., GARCÍA-AGUDO, L. Infecções por micobacterias de crescimento rápido. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 30, n. 4, p. 192-200, 2012.

GARCÍA-NAVARRO, X.; BARNADAS M. A.; DALMAU J.; COLL P.; GURGUI M.; ALOMAR A. Mycobacterium abscessus infection secondary to mesotherapy. **Clinical and Experimental Dermatology**. v. 33, n. 5, p. 658-659, setembro 2008.

GELANALYSER[®]. Versão 2010. Disponível em <<http://www.gelanalyzer.com>>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.

GENBANK Disponível em <<http://www.ncbi-nml.nih.gov/genbank/>>. Acesso em 02 de fevereiro de 2013.

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters in Applied Microbiology**. v. 25, n. 1, p. 17-21, julho 1997.

GRIFFITH, D. E.; AKSAMIT, T; BROWN-ELLIOTT, B. A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S. M.; HORSBURGH, R.; HUITT, G.; IADEMARCO, M. F.; ISEMAN, M.; OLIVIER, K.; RUOSS, S.; REYN, C. F. V.; WALLACE, R. J.; WINTHROP, K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous Mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 175, p. 367-416, 2007.

GROOTE, M. A. D.; HUITT, G. Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. **Emerging infections**. v. 42, p. 1756-1763, 2006.

GUSMÃO, F.; ALVARENGA, L.; BARBOSA, L.; SAMPAIO, J.; LEÃO, S. C.; HOFLING-LIMA, A. L.; FREITAS, D. Deep stromal mycobacterial keratitis: viable bacteria after six months of treatment: case report and literature review. **Arquivos Brasileiros Oftalmologia**. v. 68, n. 4, p. 551-553, julho-agosto 2005.

HAFNER, B.; HAAG, H.; GEISS, H-K.; NOLTE, O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous Mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. **Molecular and Cellular Probes**. v. 18, p. 59-65, 2004.

HETT, E. C., RUBIN, E. J. Bacterial growth and cell division: a Mycobacterial perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 72, n. 1, p. 126-156, março 2008.

HOLT J. G., KRIEG N. R., SNEATH P. H. A., STALEY J. T., WILLIAMS S. T. **Bergeys manual of determinative bacteriology**. ed. 9, Williams e Wilkins, p. 597-603, Baltimore 1994.

JARAND, J.; LEVIN, A.; ZHANG, L.; HUITT, G.; MITCHELL, J. D.; DALEY, C. L. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 5, p. 565-571, 2011.

JARDIN, O. M.; HERNANDEZ-PEREZ, R.; CORRALES, H.; CARDOSO-LEAO, S.; DE WAARD, J. H. Seguimiento de un brote de infeccion en tejido blando causado por *Mycobacterium abscessus* posterior a la mesoterapia en Venezuela. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 28, n. 9, p. 596-601, 2010.

KOTHAVADE, R. J.; DHURAT, R. S.; MISHRA, S. N. Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing Mycobacteria. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**. 28 p., novembro 2012.

LEÃO, S. C.; MARTIN, A.; MEJIA G. I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S. PORTAELS. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of Mycobacteria. Brugges, VandenBroelle. 164 p. 2004.

LEÃO, S. C.; TORTOLI, E.; VIANA-NIERO, C.; UEKI, S. Y. M.; LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L.; YUBERO, J.; MENENDEZ, M. C.; GARCIA, M. J. Characterization of Mycobacteria from a major brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-M. abscessus* group is needed. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 9, p. 2691-2698, setembro 2009.

LEÃO, S. C.; VIANA-NIERO, C.; MATSUMOTO, C. K.; LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L.; PALACI, M.; HADAD, D. J.; VINHAS, S.; DUARTE, R. S.; LOURENÇO, M. C. S.; KIPNIS, A.; NEVES, Z. C.; GABARDO, B. M. A.; RIBEIRO, M. O.; BAETHGEN, L.; de ASSIS, D. B.; MADALOSSO, G.; CHIMARA, E.; DALCOMO, M. P. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing *Mycobacteria* in Brazil, **Future Microbiology**. v. 5, n. 6, p. 971-980, junho 2010.

LEÃO, S. C.; TORTOLI, E.; EUZÉBY, J. P.; GARCIA, M. J. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 61, p. 2311-2313, 2011.

MARTIN, A.; MORCILLO, N.; LEMUS, D.; MONTORO, E.; TELLES, M. A. S.; SIMBOLI, N.; PONTINO, M.; PORRAS, T.; LEON, C.; VELASCO, M.; CHACON, L.; BARRERA, L.; RITACCO, V.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 9, n.8, p. 901-906, 2005.

MARTIN, A.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, p. 175–183, 2007.

MEGA. Versão 4.1. Disponível em <http://www.megasoftware.net/m_test_reliab.html>. Acesso em 20 de dezembro de 2012.

MONEGO, F.; DUARTE, R.S.; NAKATANI, S.M.; ARAUJO, W.N.; RIEDIGER, I.N.; BROCKELT, S.; SOUZA, V.; CATALDO, J.I.; DIAS, R.C.S; BIONDO, A.W. Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 15, n. 5, p. 436-441, 2011.

MUNAYCO, C. V.; GRIJALVA, C. G.; CULQUI, D. R.; BOLARTE, J. L.; SUÁREZ-OGNIO, L. A.; QUISPE, N.; CALDERON, R.; ASCENCIOS, L.; DEL SOLAR, M.; SALOMÓN, M.; BRAVO, F.; GOTUZZO, E. Outbreak of persistent cutaneous abscesses due to *Mycobacterium chelonae* after mesotherapy sessions, Lima, Peru. **Revista de Saúde Pública**. v. 42, n. 1, p. 146-149, 2008.

NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**. v. 76, n.10, p.5269–5273, 1979.

NESSAR, R.; CAMBAU, E.; REYRAT, J.M.; MURRAY, A.; GICQUEL, B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, p. 810-818, 2012.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B.; FREIRE, M. P.; ASSIS, D. B.; MADALOSSO, G.; PELLINI, A. C. G.; CÉSAR, M. L. V.; NETO, V. P.; BELTRAMELLI, M. M.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; TELLES, M. A. S.; SAMPAIO, J. L. M.; LEÃO, S. C. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous Mycobacteria in breast implants in Brazil. **Journal of Hospital Infection**. v. 67, p. 161-167, 2007.

PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V.; **Tuberculosis 2007. From basic science to patient care**. Ed. 1, 686p. Junho de 2007. Disponível em <www.tuberculosistextbook.com>. Acesso em 25 de novembro de 2012.

PETRINI, B. *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. Review article. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 114, p. 319-328, 2006.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous Mycobacteria in immunocompetent persons. **Emerging Infectious Diseases**. v. 15, n. 9, setembro 2009.

PHILLIPS, M. S.; von REYN, C. F. Nosocomial Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. **Clinical Infectious Diseases**. v. 33, p. 1363-1374, outubro 2001.

PRIMM, T. P.; LUCERO, C. A.; FALKINHAM III, J. O. Health impacts of environmental Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 17, n. 1, p. 98-106, janeiro 2004.

PRASITE. **Identification of Mycobacteria. PRA pattern**. Disponível em: <<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>>. Acesso em 02 de maio de 2011.

RASTOGI, N. Recent observations concerning structure and function relationships in the Mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of Mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. **Research in Microbiology**, v. 142, p. 464-476, 2001.

ROCHA, A. S.; BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D.; DA SILVA, M. V. B.; FONSECA, L.; SAAD, M. H.; DEGRAVE, W. M.; SUFFYS, P. N. Novel allelic variants of *Mycobacteria* isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp-65*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 11, p. 4191-4196, 2002.

SAMPAIO, J. L. M.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; TELLES, M. A. S.; DEL GUERCIO, V. M.; JERICO, Z. V. N.; MIYASHIRO, FORTALEZA, C. M. C. B.; PADOVEZE, M. C.; LEÃO, S. C. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. **Clinical Microbiology and Infectious**. v. 12; p. 142-149, 2006a.

SAMPAIO, J. L. M.; VIANA-NIERO, C.; FREITAS, D.; HÖFLING-LIMA, A. L.; LEÃO, S. C. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 55, p. 107-118, 2006b.

SAMPAIO, J. L.; JUNIOR, D. N.; de FREITAS, A. L.; HOFLING-LIMA, MIYASHIRO, K.; ALBERTO, F. L. e LEÃO, S. C. An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 9 p. 3201-3207, setembro 2006c.

SECHI, L. A.; ZANETTI, S.; DUPRE, I.; DELOGU, G.; FADDA, G. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 1, p.128-132, janeiro 1998.

SENNA, S. G.; BATTILANA, J.; COSTA, J. C.; SILVA, M. G.; DUARTE, R. S.; FONSECA, L. S.; SUFFYS, P. N.; BOGO, M. R. Sequencing of *hsp65* Gene for Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Environmental and Clinical Sources in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 11, p. 3822-3825, novembro 2008.

SET, R.; SHASTRI, J. Laboratory aspects of clinically significant rapidly growing *Mycobacteria*, **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 29, n. 4, p. 343-352, outubro-dezembro 2011.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic region of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**. v. 18, n. 22, p. 6503-6508, 1990.

SILVA, C. F.; UEKI, S. Y. M.; GEIGER, D. C. P.; LEÃO, S. C. *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of *Mycobacteria* in clinical laboratory.

Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v. 43, n. 1, p. 25-28, janeiro-fevereiro 2001.

SOUSA, A.C.G.O.; REGO, V.R.; PEREIRA, C.P.; PAIXÃO, A.P.; GUIMARÃES, N.S.; JUNIOR, A. A. B. Micobacteriose cutânea atípica pós-mesoterapia. Atypical cutaneous mycobacteriosis following mesotherapy. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** v. 76, n. 6, p. 711-715, Rio de Janeiro, novembro-dezembro 2001.

TANEJA, N.K.; TYAGI, J.S. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 60, p. 288-293, junho de 2007.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E.C.; BODMER, T. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 31, n. 2, p. 175-178, fevereiro 1993.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on Mycobacterial Taxonomy: the new Mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 16, n. 2, p.319-354, abril 2003.

TORTOLI, E. The new Mycobacteria: an update. **FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES Immunology and Medical Microbiology.** v. 48, p. 159-178, julho 2006.

TORTOLI, E. Standard operating procedure for optimal identification of Mycobacteria using 16S rRNA gene sequences. **The Genomic Standards Consortium,** v. 3, p. 145-152, 2010.

TREECON. Disponível em
<<http://bioinformatics.psb.ugent.be/software/details/Treecon>>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.

USLAN, D. Z.; KOWALSKI, T. J.; WENGENACK, N. L.; VIRK, A.; WILSON, J. W.. Skin and Soft Tissue Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. Comparison of Clinical Features, Treatment, and Susceptibility. **Archives of Dermatology.** v. 142, p. 1287-1292, outubro 2006.

van INGEN, J.; BOEREE, M. J.; DEKHUIJZEN, P.N.R.; van SOOLINGEN, D. Environmental sources of rapid growing nontuberculous Mycobacteria causing disease in humans. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 888-893, 2009.

van INGEN, J.; BOEREE, M.J.; van SOOLINGEN, D.; MOUTON, J.W. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous Mycobacteria. **Drug Resistance Updates**. v. 15, p. 149-161, 2012.

VIANA-NIERO, C.; LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L.; RABELLO, M. C. S.; MARSOLA, L. R.; BRILHANTE, V. C. R.; DURHAM, A. M.; LEÃO, S. C. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 3, p. 850-855, março 2008.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**. v. 23, n. 6, p.1156-1168, 2006.

WALLACE, R. J. Jr.; BROWN, B. A.; GRIFFITH, D. E. Nosocomial outbreaks/pseudooutbreaks caused by nontuberculous Mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**. v. 52, p. 453-590, 1998.

van SOOLINGEN D.; HERMANS, P.W., HAAS, P.E.; SO, D.R.; van EMBDEN, J.D. Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequencedependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p. 2578– 2586, 1991.

ANEXO A – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0432.0.203.000-11

Interessado(a): Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes
Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de outubro de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização molecular e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de isolados de microbactérias de crescimento rápido (MCR) em um laboratório de referência**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B – Ficha de notificação de caso de micobacteriose não tuberculosa após procedimentos médicos invasivos



Agência Nacional de
Vigilância Sanitária - ANVISA

**REDE NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO DE SURTOS
SERVIÇOS DE SAÚDE**

Nº

FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE CASO DE MICOBACTERIOSE NÃO TUBERCULOSA (MCR) APÓS PROCEDIMENTOS MÉDICOS INVASIVOS

Dados Gerais	1 Notificador () Profissional de saúde () CCIH () CECIH () paciente/Informante () Outros _____		2 Data da Notificação	
	3 Município da Notificação		4 Código (IBGE)	
	5 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		6 Código	
Dados do Caso	7 Nome do Paciente		8 Data dos Primeiros Sintomas	
	9 Data de Nascimento	10 (ou) Idade <input type="checkbox"/> D - dias <input type="checkbox"/> M - meses <input type="checkbox"/> A - anos	11 Sexo <input type="checkbox"/> M - Masculino <input type="checkbox"/> F - Feminino <input type="checkbox"/> I - Ignorado	12 Raça/Cor 1 - Branca 2 - Preta 3 - Amarela 4 - Parda 5 - Indígena 9 - Ign
	14 Nome da mãe		15 Doença básica motivo do procedimento	
	16 Doenças pre-existentes () Diabetes () Imunossuprimido () Renal crônico () Outras _____		17 Pagamento do procedimento () SUS () Convênio () Particular	
Dados da instituição do procedimento realizado	18 Nome da instituição que realizou o procedimento		19 Município de localização da instituição	
	20 Logradouro (rua, avenida,...)		21 Número	22 Bairro
	24 Procedimento realizado		25 Via de acesso () Videocirurgia () Vídeo convertida () Convencior	
	27 Nome do Médico Cirurgião		28 Nome do Médico auxiliar	
	30 Utilizou somente instrumentais da instituição? 1-Sim 2-Não 9-Ign <input type="checkbox"/>		31 N.º de cirurgias semelhante a essa, a equipe efetuou no dia?	
	32 N.º de ordem da mesma equipe, essa cirurgia se encaixa no dia?		34 Aconteceu outro caso suspeito de MCR nesse mesmo dia? 1-Sim 2-Não 9-Ign <input type="checkbox"/>	
Dados Complementares do Caso				
Clinica e laboratório	35 Sinais e Sintomas <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Edema (inchaço) <input type="checkbox"/> Fistulização (drenagem) <input type="checkbox"/> Granuloma 1 - Sim <input type="checkbox"/> Hiperemia (vermelhidão) <input type="checkbox"/> Vesículas (bolhas) <input type="checkbox"/> Secreção (serosa - piosanguinolenta) 2 - Não <input type="checkbox"/> Hipertermia (calor) <input type="checkbox"/> Nódulos (tumorações) <input type="checkbox"/> Dificil cicatrização 9 - Ignorado			
	36 Coletada amostra clínica? <input type="checkbox"/> 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		37 Tipo de coleta? <input type="checkbox"/> 1 - Secreção 2 - Biópsia	
	38 Exame realizado <input type="checkbox"/> () Bacterioscopia () PCR 1-Sim 2-Não 9-Ign () Cultura () Histopatológico		41 Se sim, qual MCR? <input type="checkbox"/>	
Tratamento	39 Data da coleta da amostra		40 MCR identificado na amostra 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado	
	36 Tratamento iniciado? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ign		37 Data do inicio tratamento	
Processamento	38 Antibióticos 1 _____ 2 _____ 3 _____ 4 _____		41 Outros materiais de uso único foram reprocessados? 1-Sim 2-Não 9-Ign <input type="checkbox"/>	
	39 Os instrumentos cirúrgicos invasivos utilizados são autoclaváveis? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ign		40 Os trocâteres descartáveis foram reprocessados? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ign	
	42 O reprocessamento de material termo-sensível é realizado no: 1-CME* da própria instituição <input type="checkbox"/> 2-Dentro do bloco cirúrgico da instituição 3-CME terceirizada		43 Qual(is) método(s) utilizado(s) no reprocessamento dos termo sensíveis? 1-Sim 2-Não 9-Ign <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Autoclavação <input type="checkbox"/> Glutaraldeído <input type="checkbox"/> Plasma de Peróxido de hidrogênio <input type="checkbox"/> Óxido de Etileno <input type="checkbox"/> Ácido Peracético <input type="checkbox"/> Outro _____	
Conclusão	44 O instrumental de vídeo é exclusivo da instituição? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ign		45 Número médio do procedimento na instituição por mês	
	46 Este caso foi notificado antes para: () Vigil. Sanitária () CCIH** da instituição () Vigilância epidemiológica () Caso não notificado		47 Evolução <input type="checkbox"/> 1- Cura 3- Melhorado 2- Óbito 4- em Tratamento 9- Ignorado	
Investigador	48 Classificação final do caso <input type="checkbox"/> 1- Confirmado por laboratório 2- Confirmado por clínica 3- Confirmado por vínculo epidemiológico 4- Confirmado pelos critérios (1, 2, 3) 5- Descartado 6- Em andamento		49 Nome	
	50 Função			

Fonte: BRASIL, 2007.

APÊNDICE A – Protocolo para extração de DNA utilizando CTAB

Uma alça do crescimento bacteriano em meio de Löwenstein-Jensen foi suspensa em 400 µL de tampão Tris-EDTA (Tris 10mM, EDTA 1 mM pH 8.0) e incubada por 20 minutos em termobloco a 80°C. Lisozima (*Merck*[®]) foi adicionada para uma concentração final de 2mg/mL e a suspensão foi incubada por 1 hora a 37°C. Foram adicionados 70 µL de SDS (*Amresco*[®]) 10% e 50 µg de proteinase K (*Invitrogen*[®]), agitou-se em vortex por 5 segundos e a mistura foi incubada por 10 minutos a 65°C. Foi adicionado 100 µL de solução de NaCl 3M e 100 µL de solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) 10 mg/mL (*Merck*[®]). Agitou-se a suspensão em vortex e incubou-se por 10 minutos a 65°C. Igual volume de solução de clorofórmio-álcool isoamil (24:1) foi adicionado e a suspensão foi agitada em vortex e então centrifugada 15000g por 5 minutos. DNA foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70%, o sedimento foi seco ao ar ambiente e então hidratado com tampão Tris-EDTA. DNA foi quantificado por espectrofotometria.

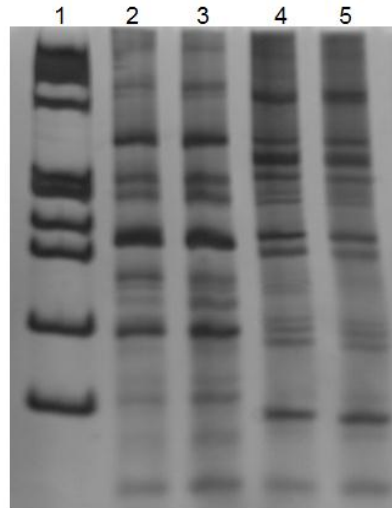
APÊNDICE B – Padronização do método de extração para ERIC-PCR

Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para avaliação de método de extração de DNA de micobactérias de crescimento rápido para uso em ERIC-PCR. Padrões de bandas obtidos, de um mesmo isolado clínico, foram indistinguíveis quando a reação foi realizada com DNA extraído por método de choque térmico ou método CTAB. (1) marcador de peso molecular Φ X174 DNA/*Bsu*RI. (2) DNA de isolado de *M. fortuitum* extraído por método de choque térmico. (3) DNA de isolado de *M. fortuitum* extraído por método CTAB. (4) DNA de isolado de *M. abscessus* extraído por método de choque térmico. (5) DNA de isolado de *M. abscessus* extraído por método CTAB.

APÊNDICE C – Comparação de isolados clínicos de um mesmo paciente, colhidos em momentos distintos, pela técnica de ERIC-PCR

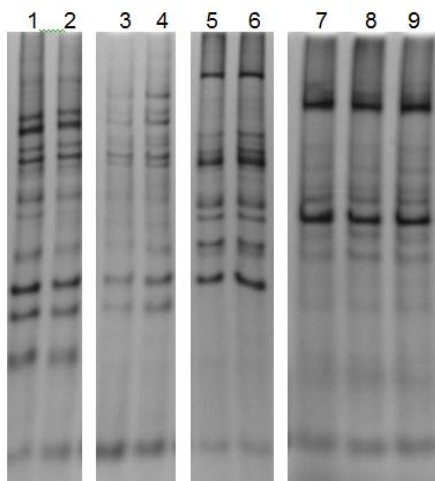


Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% de ERIC-PCR para comparação de perfis de ERIC-PCR obtidos para casos de pacientes com mais de um isolado clínico de MCR. (1 e 2) Isolados de *M. fortuitum*. (3 e 4) Isolados de *M. fortuitum*. (5 e 6) Isolados de *M. fortuitum*. (7, 8 e 9) Isolados de *M. abscessus*.

APÊNDICE D – Protocolos para sequenciamento parcial do gene *rpoB*

Amplificação e purificação

Amplificação do DNA e sequenciamento dos produtos da PCR foi realizado com os iniciadores MycoF (5'-GGCAAGGTCACCCCGAAGGG-3') e MycoR (5'-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3'), como descrito por Adékambi e colaboradores (2003), nas seguintes condições: tampão da reação 1X (20 mM de Tris e 50 mM de KCl), 2.5mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (*Fermentas*[®]), 200 µM de dNTP, 2.5 pmoles de cada iniciador (*Sigma*[®]), 5 µL do sobrenadante da suspensão bacteriana e água ultrapura. Um controle negativo (água ultrapura) foi incluído em cada corrida. Após a desnaturação inicial por 1 minuto a 95°C, foram realizados 35 ciclos de amplificação, cada um de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C e 90 segundos a 72°C. A extensão final foi de 5 minutos a 72°C. Após a verificação dos produtos da PCR em gel de agarose 1% utilizando como padrão molecular 100pb, estes foram purificados com o kit “*Illustratm GFXtm PCR DNA and Gel Band Purification*” (*GE Health care*[®]) e o DNA purificado foi quantificado por espectrofotometria.

Transformação e Clonagem Bacteriana

Os produtos de PCR purificados foram ligados a um vetor de clonagem pGEM[®]-T *Easy* (*Promega*[®]), um plasmídeo linear que possui em cada uma de suas extremidades uma timina livre complementar a adenina inserida pela *Taq* DNA no final de cada produto de amplificação. A reação de ligação continha 2,5 µL de tampão da DNA ligase, 25 ng do plasmídeo, 50 ng do inserto, 1,5U de T4 DNA ligase, e água ultrapura para um volume final de 5 µL. A reação de ligação foi incubada a 4°C por 16 horas.

Para a transformação genética, as células competentes de *Escherichia coli* XL1 *Blue* foram submetidas a choque térmico. Foi adicionado 5 µL da solução de reação de ligação à 50 µL da bactéria. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, depois a 42°C por 90 segundos e em seguida no gelo por 2 minutos. A mistura foi transferida para 950 µL de meio líquido Luria-Bertani e incubada por 1 hora a 37°C sob agitação de 180rpm. Após centrifugação a 2000 rpm por 3 minutos, 100 µL do sedimento foi plaqueado em ágar Luria-Bertani contendo ampicilina/IPTG/X-Gal. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Os clones transformantes (UFCs brancas) foram selecionados. Um controle positivo da ligação e transformação (DNA inserto controle - fornecido pelo kit) e um controle negativo (*E.coli* XL1 *Blue*) foram incluídos em cada corrida.

Extração, Análise de Restrição e Sequenciamento dos Plasmídeos Recombinantes

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos utilizando kit *Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega®)*. Após a extração foram analisados em gel de agarose 2% para a confirmação do tamanho dos fragmentos obtidos.

Para a amplificação do inserto clonado foram utilizados os iniciadores M13 *forward* 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' e M13 *reverse* 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'. O sequenciamento dos plasmídeos recombinantes foi feito pelo método de Sanger com o equipamento *MegaBACE 1000*. As sequências obtidas foram alinhadas e foram comparadas com sequências homólogas de micobactérias de crescimento rápido disponíveis no banco de dados *GenBank* por meio da ferramenta *Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST)*. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA versão 4.1.

APÊNDICE E – Primeiros resultados do sequenciamento do gene *rpoB*

Sequenciamento de parte do gene *rpoB* foi realizado em três isolados de *M. abscessus* subsp. *bolletii* e um isolado que apresentou o perfil PRA-*hsp65* ainda não descrito, sendo selecionado um isolado por paciente.

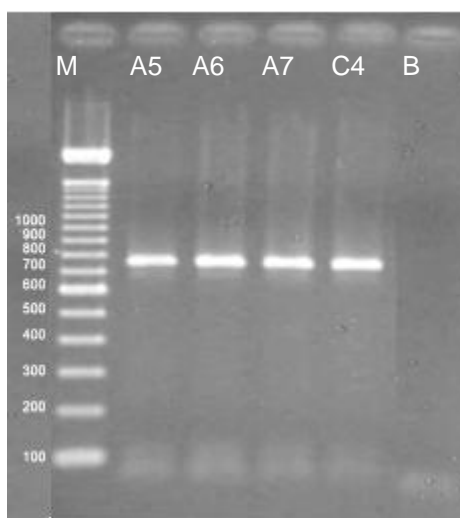


Figura 16 - Amplificação de fragmento de 764 pb do gene *rpoB*. M: Marcador de 100pb; B: controle negativo da reação; A5, A6, A7 e C4: isolados incluídos no estudo.

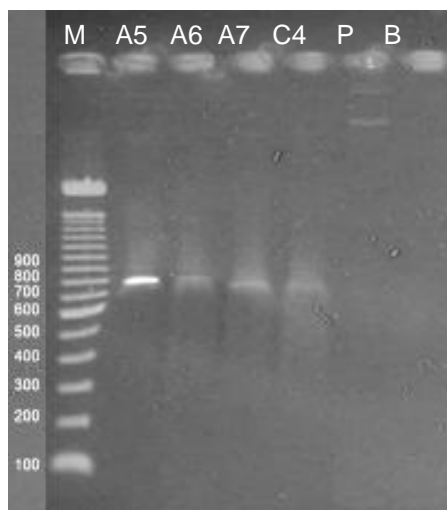


Figura 17 - Amplificação de fragmento de 764 pb do gene *rpoB* a partir dos plasmídeos recombinantes. M: Marcador de 100pb; P: controle negativo do plasmídeo sem o inserto de 764pb; B: controle negativo da reação de PCR; A5, A6, A7 e C4: isolados incluídos no estudo.