

ELIANE PICOLI ALVES BENSI

***ESTUDO BACTERIOLÓGICO RETROSPECTIVO DAS INFECÇÕES
MICOBACTERIANAS EM PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME
DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (aids)***

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da aluna ELLIANE PICOLI ALVES BENSI.
31/07/2002*

Marcelo

*Prof(a). Dr(a). Marcelo de Carvalho Ramos
Orientador*

CAMPINAS

2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTR.
SEÇÃO CIRCULANT

ELIANE PICOLI ALVES BENSI

***ESTUDO BACTERIOLÓGICO RETROSPECTIVO DAS INFECÇÕES
MICOBACTERIANAS EM PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME
DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (aids)***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, área de concentração Ciências
Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO DE CARVALHO RAMOS

CAMPINAS

2002

UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	79442e
V	EX
TOMBO BC/	53354
PROC.	124/08
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	24/04/09
Nº CPD	

BIBID 280702

CM001B1064-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B442e

Bensi, Eliane Picoli Alves

Estudo bacteriológico retrospectivo das infecções micobacterianas em pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) / Eliane Picoli Alves Bensi. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Marcelo de Carvalho Ramos

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Micobactérias. 2. Tuberculose. 3. Aids (doença). I. Marcelo de Carvalho Ramos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Aluno(a): *ELIANE PICOLI ALVES BENSI*

Orientador(a): *Prof.Dr. MARCELO DE CARVALHO RAMOS*

Membros:

Professora Doutora Maria Patelli Juliani Souza Lima

Professora Doutora Sandra Cecília Botelho Costa

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 31/07/2002

DEDICATÓRIA

A meu esposo Donizetti e à minha filha Júlia

A meus pais José e Fátima e minhas irmãs Cristiane e Daniele

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr^o. Marcelo de Carvalho Ramos, meu orientador, pela compreensão, firmeza e tolerância

À Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Barisson Villares, pela cooperação

À Prof^a. Dr^a. Angélica Z. Schreiber, pelo apoio

Aos funcionários do setor de Micobactérias do Laboratório de Microbiologia Wagner Andrade e Marcel Loh pela atenção

As minhas amigas do Laboratório de Microbiologia Marizete , Cidinha e Rosa pelo incentivo

À amiga Ana Beatriz Alkmim Teixeira, pela colaboração

À amiga Ana Lúcia Roscani Calusni, a minha gratidão, pois sem sua ajuda nada disto teria acontecido

A todos,minha gratidão.

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Considerações gerais a respeito da epidemiologia da tuberculose.....	19
1.2. Aspectos Microbiológicos do <i>M. avium</i> e <i>M. tuberculosis</i>	20
1.3. Transmissão.....	23
1.4. Técnicas de Identificação.....	25
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Materiais.....	30
3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Descontaminação.....	30
3.2.2. Isolamento.....	31
3.2.3. Identificação.....	33
3.2.3.1. Teste de inibição pelo NAP.....	33
3.2.3.2. Sondas de DNA (Gen Probe – ACCUPROBE).....	33

3.2.4. Pesquisa de Sensibilidade.....	35
4. RESULTADOS.....	36
5 .DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
8. ANEXOS.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac.	=	Ácido
aids	=	acquired immune deficiency syndrome
BAAR	=	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	=	Bacilo de Calmette-Guérin
°C	=	Graus Celsius
CDC	=	Centers for Disease Control and Prevention (órgão governamental americano)
cels	=	células
CO ²	=	dióxido de carbono
DNA	=	Ácido Dexorribonucléico
g	=	gramas
GI	=	Growth Index (índice de crescimento)
HC	=	Hospital de Clínicas
HCl	=	Ácido Clorídrico
HIV	=	Vírus da Imunodeficiência Humana
I	=	Isoniazida
KH ₂ PO ₄	=	Fosfato de potássio

LCR	=	Líquido Céfal Raquidiano
L.J	=	Löwenstein-Jensen
M	=	Molar
MAC	=	complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MAIS	=	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> e <i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. avium</i>	=	<i>Mycobacterium avium</i>
Mb	=	Mega bases
<i>M. abscessus</i>	=	<i>Mycobacterium abscessus</i>
<i>M. chelonae</i>	=	<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>M. fortuitum</i>	=	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>M. intracellulare</i>	=	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>M. kansasii</i>	=	<i>Mycobacterium kansasii</i>
ml	=	mililitro
<i>M. leprae</i>	=	<i>Mycobacterium leprae</i>
mm ³	=	milímetros cúbicos
MOTT	=	Micobactérias outras que não pertecem ao complexo tuberculosis
<i>M. scrofulaceum</i>	=	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>

<i>M. tb</i>	=	Mycobacterium tuberculosis
<i>M. tuberculosis</i>	=	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaOH	=	Hidróxido de Sódio
NAP	=	p-nitro α -acetil-amino- β -hidroxipropiofenone
Na ₂ PO ₄	=	Fosfato de Sódio
NMT	=	Micobactérias não tuberculosis
PCR	=	Reação em Cadeia da Polimerase
R	=	Rifampicina
RLU	=	Unidades de referenciação de luminescência
RNA	=	Ácido Ribonucléico
rpm	=	Rotações por minuto
subsp.	=	subespécie
TB	=	Tuberculose
UNICAMP	=	Universidade Estadual de Campinas
μ	=	micro
μ Ci	=	micro Curie
μ g	=	micrograma

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Resultados de leituras do Gen-Probe.....	34
TABELA 2 : Distribuição dos pacientes estudados segundo o sexo e a espécie de Micobactérias isolada.....	38
TABELA 3 : Distribuição das culturas positivas segundo o espécimen clínico e a espécie de Micobactérias isolada.....	38
TABELA 4 : Distribuição dos pacientes, segundo o número de linfócitos CD4 e a espécie de Micobactéria isolada.....	39
TABELA 5 : Distribuição das cepas de <i>M. tuberculosis</i> isoladas, segundo a sensibilidade à Rifampicina e Isoniazida.....	39

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Cultura de <i>M. tuberculosis</i>	22
FIGURA 2 : Cultura de <i>M. avium</i>	22
FIGURA 3 : Transmissão através de aerossóis.....	23
FIGURA 4 : Coloração de Zielh-Neelsen.....	31
FIGURA 5 : Meios de cultura, Löwenstein-Jensen e Bactec 12B.....	32



RESUMO

As principais espécies de Micobactérias isoladas de 51 pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (aids), admitidos ao Hospital de Clínicas da UNICAMP no ano de 1996, foram estudadas retrospectivamente, de acordo com o sítio do seu isolamento e seu papel patogênico. Desses isolamentos, 28 (54,9%) dos casos foram de *M. tuberculosis* e 23 (45,1%) do complexo *M. avium*.

No caso da tuberculose, os materiais clínicos em que as culturas deram positivas foram, como esperado, escarro e líquido, na sua maioria, enquanto o *M. avium* foi recuperado com maior frequência do sangue, o que atesta o caráter disseminado da doença.

Os resultados mostram que a infecção pelo *M. avium* em pacientes com aids é freqüente e relacionada estritamente com o grau da imunodeficiência (quantidade de células CD4). No grupo estudado a frequência de isolamento de *M. avium* foi semelhante à do *M. tuberculosis*, contradizendo a opinião de que o primeiro tem importância reduzida em países de elevada prevalência de tuberculose.

Cepas isoladas de *M. tuberculosis* nos anos de 1996, 1997 ,1998 provenientes de 50 pacientes, também portadores de aids foram submetidas à pesquisa de sensibilidade à Isoniazida e Rifampicina. Dessas, 41 (82%) foram sensíveis a ambos os quimioterápicos testados, 5 (10%) foram resistentes à Isoniazida e sensíveis à Rifampicina, 2 (4%) foram sensíveis à Isoniazida e resistentes à Rifampicina e 2 (4%) resistentes a ambos, Rifampicina e Isoniazida.

Palavras chave: Micobactérias, tuberculose, aids (doenças)



ABSTRACT

The main species of mycobacteria isolated in 51 patients with acquired immune deficiency syndrome (aids) admitted to the Clinical Hospital of UNICAMP in 1996, were studied retrospectively by recording the isolation site and sings of pathogenesis. Of these isolates, 28 (54,9%) were *M. tuberculosis* and 23 (45,1%) *M. avium* complex.

Strains of *M. tuberculosis* isolated in 1996,1997,1998 , originating from 50 patients who had aids were tested for susceptibility to Isoniazid and Rifampicin. Of these, 41 (82%) were susceptible to both drugs tested, 5 (10%) were resistant to Isoniazid and susceptible to Rifampicin, 2(4%) were susceptible to Isoniazid ande resistant to Rifampicin, and 2(4%) were resistant to both Rifampicin and Isoniazid.

Key words: Mycobacterias, tuberculosis, aids (disease)



1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS A RESPEITO DA EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE

A tuberculose acompanha o homem há muito tempo. Existem relatos de tuberculose em ossos humanos pré-históricos encontrados na Alemanha e datados de 8.000 antes de Cristo. Apesar da descrição clínica da forma pulmonar poder ser confundida com outras doenças, documentos antigos hindus e chineses descrevem quadros de uma doença pulmonar muito semelhante à TB. (KRITSKI,2000).

Estima-se que cerca de 30% da população mundial, ou 1,7 bilhão de indivíduos estejam infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Nos países em desenvolvimento ocorrem, aproximadamente, 2,8 milhões de mortes por tuberculose e 7,5 milhões de casos novos a cada ano, atingindo todos os grupos etários, com o predomínio de indivíduos economicamente ativos. Nos países desenvolvidos cerca de 40.000 mortes são devidas à tuberculose e mais de 400.000 casos novos são descobertos a cada ano. Nesses países a tuberculose é mais freqüente entre as pessoas idosas, nas minorias étnicas e nos imigrantes (HEIFITS, 1996; VERONESI & FOCACCIA, 1996; BRASIL, 1998).

No Brasil, estima-se que de 35 a 45 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* e que ocorram, aproximadamente, 100 mil casos novos de doença por ano provocando de 4 a 5 mil mortes. (BRASIL,1998).

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é condição reconhecidamente associada a um maior risco de doenças provocadas por micobactérias, causadas, principalmente, pelo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*. Cerca da metade dos indivíduos infectados pelo HIV desenvolvem infecções micobacterianas em alguma época de sua vida (NIGHTINGALE *et al.*, 1992; FALKINHAM, 1996).

A tuberculose, ao contrário de outras doenças oportunistas definidoras da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), pode ocorrer em fases mais iniciais da doença provocada pelo HIV, quando a imunidade celular está ainda preservada, enquanto, tanto as infecções por *M. tuberculosis*, ou por micobactérias, outras que não as do grupo *tuberculosis* (MOTT) podem ocorrer mais tarde, quando o sistema imunológico está severamente danificado.

Os aspectos epidemiológicos e clínicos dessas infecções em pacientes com aids são bem particulares e não usuais. A elevada incidência de doença disseminada devida à infecção pelo *M. avium*, com um número abundante de células bacterianas em tecidos, bem como uma maciça bacteremia, certamente, não tem paralelo com outros grupos de pacientes, mesmo os que têm alguma outra forma de imunossupressão (RAMOS *et al.*, 2000).

A doença pulmonar em indivíduos sem imunossupressão é causada, tanto pelo *M. avium*, quanto o *M. intracellulare* em iguais proporções, porém, em pacientes portadores da aids, quase sempre a espécie envolvida é a *M. avium*, numa percentagem entre 87 a 98% dos isolados e o *M. intracellulare* é mais freqüente entre os não-HIV (INDERLIED, KEMPER, BERMUDEZ, 1993; DEVALLOIS & RASTOGI, 1997).

Em países desenvolvidos, a prevalência e as características dessas doenças na população infectada pelo HIV são bem descritas. Entretanto, dados similares provenientes de países em desenvolvimento, não são encontrados com freqüência devido à ausência de tecnologia apropriada para o diagnóstico e a escassez de materiais para o cultivo e identificação dessas micobactérias.

Nos poucos artigos disponíveis, realizados no Terceiro Mundo acerca dessas infecções, sugere-se que a incidência de infecção pelo MAC é menor em países em desenvolvimento do que nos desenvolvidos. Atribui-se esse fato à exposição mais freqüente e intensa ao *M. tuberculosis*, porém assinala-se que isso pode dever-se ao despreparo de alguns centros em identificar corretamente essas infecções.

1.2. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO *MYCOBACTERIUM AVIUM* E *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

As micobactérias estão posicionadas taxonomicamente na Ordem *Actinomycetales*, Família *Mycobacteriaceae*, sendo o *M. avium* e *M. tuberculosis* espécies do Gênero *Mycobacterium* (MURRAY *et al.*, 1999). O gênero *Mycobacterium* é constituído por bacilos imóveis, não esporulados, não encapsulados, medindo 1-10

micrômetros de comprimento por 0,2-0,6 micrômetros de largura. Possuem alto conteúdo lipídico na sua parede celular tornando-a hidrofóbica e resistente a muitos desinfetantes e corantes utilizados em laboratório, apresentando assim, propriedade morfotintorial álcool-ácido resistente e de coloração Gram positiva. O tamanho do seu genoma é em torno de 4,4Mb, com alto conteúdo de G-C (62-70%).

Dentro deste gênero (*Mycobacterium*), já foram identificadas 74 espécies, com 23 de crescimento lento e 5 de crescimento rápido associadas com doença humana. Apesar da abundância de espécies, mais de 95% de todas as infecções são causados apenas por sete espécies ou grupos: *M. tuberculosis*, *M. leprae*, complexo *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. A principal espécie patogênica para o homem é o *Mycobacterium tuberculosis* (Figura1) (MURRAY, ROSENTHAL, KOBAYASHI,1998).

O *Mycobacterium tuberculosis* foi descoberto em 1882 por Robert Koch. Esse bacilo é hoje um dos integrantes do complexo *M. tuberculosis*, que inclui: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microtii*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canettii* que são fenotípica e genotípicamente semelhantes.(VERONESI, 1996).

O crescimento desses bacilos é lento, as colônias não são pigmentadas ou exibem uma coloração amarelada. Sua população duplica a cada 18 a 48 horas, o que torna a tuberculose uma doença de evolução lenta e crônica na maioria dos casos. São também microrganismos bastante suscetíveis aos agentes físicos e químicos do ambiente, não conseguindo sobreviver fora de organismos vivos a não ser por algumas horas. (VERONESI, 1996; MURRAY et al., 1999).

Em 1950, Runyon propôs uma divisão das micobactérias e classificou-as como: patogênicas para o homem, denominadas típicas, incluindo o complexo *M. tuberculosis* e o *M. leprae*, sendo esse último não cultivável *in vitro*, e as micobactérias não classificadas como bacilos da tuberculose humana ou bovina e que podem eventualmente causar doenças receberam a denominação de atípicas, que posteriormente foram denominadas de micobactérias outras que não pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MOTT) ou micobactérias não *tuberculosis* (NMT) incluindo, principalmente, o complexo *Mycobacterium avium* (MAC) (INDERLIED et al., 1993).

O *M. avium* é uma espécie pertencente ao MAC que compreende, no mínimo, duas espécies: o *Mycobacterium avium* e o *Mycobacterium intracellulare*. Há relatos de uma terceira espécie, o *Mycobacterium scrofulaceum*, denominada complexo MAIS (INDERLIED *et al.*, 1993). Com base nas suas propriedades fenotípicas e genotípicas, foram propostas três subespécies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *Silvaticum* (THOREL, KRICHEVSKY, LÉVY-FRÉBAULT, 1990). Estas são micobactérias de crescimento lento, não-cromogênicas e necessitam de mais de sete dias de incubação para adquirir crescimento maduro à uma temperatura entre 35 a 37°C (RUNYON, 1965). Suas colônias apresentam-se geralmente pequenas, lisas e ligeiramente opacas, sendo uma das colônias maior e irregular (Figura 2).

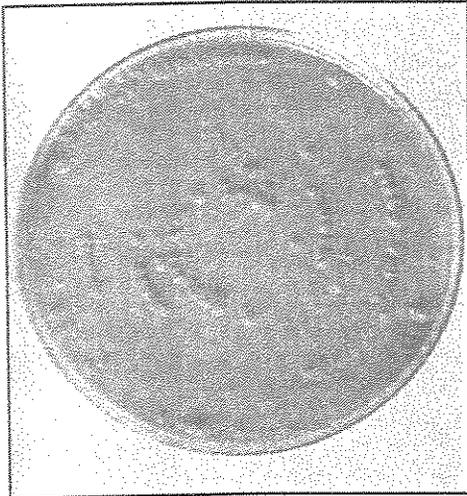


Figura 1. *Mycobacterium tuberculosis*

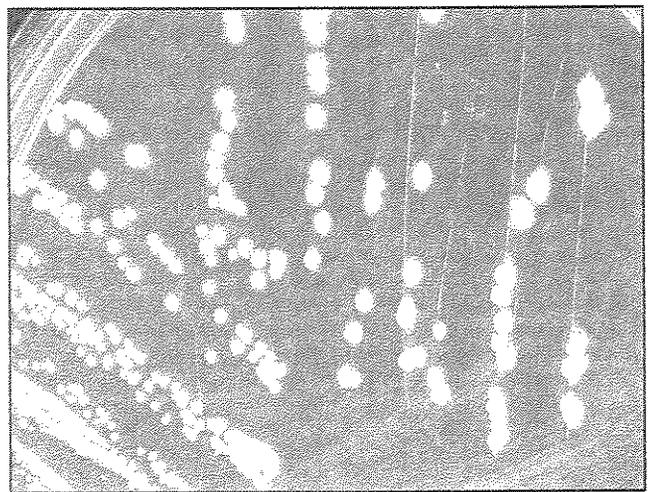


Figura 2. *Mycobacterium avium*

1.3. TRANSMISSÃO

Mycobacterium tuberculosis

*Wells & Crumbs demonstraram que apenas as partículas menores, com bacilos em suspensão no ar, produto de ressecamento de grandes partículas, alcançavam os alvéolos e iniciavam a lesão primária. Outros estudos revelaram que partículas maiores tendem a se depositar no chão, misturando-se com a poeira, enquanto que as menores levitam no ar. Dessas, são contagiantes apenas as que se ressecam alcançando um tamanho de 2 a 10 μ e apresentam características aerodinâmicas semelhantes às dos gases (gotícula-núcleo de Wells). Tais partículas, às vezes com um a dois bacilos viáveis, conseguem chegar aos alvéolos, onde esses germes se implantam. Outras gotículas são, na sua maioria, retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios através do mecanismo muco-ciliar. Os bacilos assim removidos são deglutidos, inativados pelo suco gástrico e eliminados nas fezes. A principal porta de entrada do bacilo é a via respiratória (figura 3). A via digestiva assume papel de importância apenas na tuberculose causada pelo bacilo bovino (*Mycobacterium bovis*). Outras vias de aquisição são excepcionais. (VERONESI, 1996; MURRAY *et al.*, 1999).

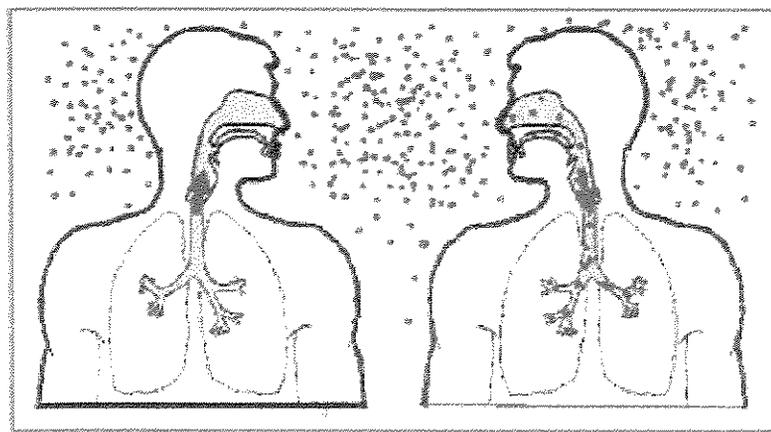


Figura 3. Transmissão através de aerossóis

*Wells & Crumbs (1948) *apud* VERONESI, R. & FOCACCIA, R.- Tratado de Infectologia. São Paulo, Atheneu, p. 914-5, 1996.

Mycobacterium avium

O MAC é um microrganismo encontrado no meio ambiente como solo, água natural, sistema de águas municipais, alimentos e animais. Há relatos de isolamentos em poeira doméstica (REIS *et al.*, 1984; HAVLIR & ELLNER, 2000). Embora o MAC seja um importante agente causador de doença em suínos e aves domésticas (o organismo excretado nas fezes desses animais persiste no solo por longos períodos), alguns estudos sorológicos e epidemiológicos não suportam a hipótese de que animais sejam um importante reservatório para as infecções humanas. Não há evidência suficiente da transmissão inter-humana dos organismos do MAC (PETERS *et al.*, 1995; MURRAY *et al.*, 1998; HAVLIR & ELLNER, 2000).

A identificação de organismos em aerossóis de águas da Costa do Atlântico similares aos isolados de pacientes com doença pulmonar sugere que a inalação desses aerossóis sejam a origem da infecção (PARKER *et al.*, 1983). Assim, é provável que a infecção seja adquirida pela inalação ou ingestão de alimentos ou água contaminada. Desse modo explica-se o fato de que são isolados presentes, inicialmente, em escarro e fezes que posteriormente provocam a doença disseminada. As manifestações clínicas da doença disseminada não são observadas até que haja replicação maciça de bacilos nos órgãos que interfere nas suas funções. HORSBURGH *et al.*, 1994, mostra que a ingestão de queijos duros, bem como a diminuição do número de linfócitos CD4 periféricos são, isoladamente, fatores de risco para a aquisição de doença provocada por *M. avium*.

Além da baixa concentração de células linfóides CD4+ (<100 cels/mm³), outros fatores de risco para a aquisição da infecção por MAC são estudados como: a interrupção de antiretrovirais, pneumonia causada pelo *Pneumocystis carinii* e as anemias severas (BENSON, 1994). Estudos epidemiológicos também têm revelado que essa infecção pode estar associada à broncoscopia, exposição à água de piscina, ou consumo de carnes de peixes e frutos do mar não cozidos. Neste mesmo estudo, através da análise clínica e ambiental de isolados de *M. avium*, a água aquecida do hospital foi considerada como a origem de 14% das infecções em pacientes com doença disseminada por MAC (von REYN *et al.*, 1996).

O fator de risco mais importante para a aquisição da doença em pacientes não infectados pelo HIV é a existência de pneumopatias crônicas, como por exemplo: bronquite crônica ou doenças pulmonares obstrutivas (MURRAY *et al.*, 1998). Em crianças com adenite cervical devido ao MAC parece que a fonte de aquisição é o solo ou água e que esses organismos penetram pela gengiva ou mucosa oral ou que progrida ao sistema linfático através das amígdalas (WOLINSKY, 1995).

Algumas intervenções são necessárias para ocorrer a redução das doenças micobacterianas, como: melhoria das condições sócio-econômicas, tratamento adequado e rápido, quimioprofilaxia e vacinação por BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). A medicação inadequada tem levado à baixas taxas de cura e aumento de resistência às drogas empregadas. Em contrapartida, o tratamento rápido prolonga significativamente a sobrevivência dos pacientes. São necessárias pesquisas para agilizar o diagnóstico e conduzir ao tratamento adequado (PORTER, 1996; OPRAVIL, 1997).

Segundo CHAISSON *et al.*, 1998, a morte de pacientes infectados pelo HIV e com doenças oportunistas está relacionada ao baixo número de células CD4+, ao aumento da carga viral pela interrupção da terapia antiretroviral ou pela hipótese de que antígenos presentes em vacinas podem, também, aumentar a carga viral. Nesse estudo, a média do declínio mensal de células CD4+ em pacientes com doenças oportunistas foi quase o dobro em relação aos pacientes sem doença oportunista.

1.4. TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO

O laboratório de micobacteriologia tem papel importante no controle da tuberculose, fornecendo o resultado rápido da baciloscopia, isolando a micobactéria, identificando-a e fazendo os testes de susceptibilidade à antimicrobianos dos bacilos isolados. A rapidez na divulgação desses resultados deve ser observada, já que se verifica um aumento do número de casos de tuberculose e, principalmente, de surtos envolvendo organismos resistentes, inclusive, a mais de dois dos quimioterápicos usados como primeira opção de tratamento (BRASIL, 1998).

O avanço observado nas técnicas de cultivo e de biologia molecular, tem propiciado grandes mudanças na rotina desses laboratórios. Como exemplos, cita-se o cultivo em meios seletivos, com a adição de produtos que detectam o crescimento não visível do microrganismo, como o BACTEC 460 TB, outros métodos colorimétricos e a utilização de reações de amplificação para a detecção de partes do genoma específicas do *M. tuberculosis* (PCR), feitas diretamente no material clínico (escarro, líquidos, etc). Um outro exemplo é a identificação rápida da micobactéria em nível de espécie com a utilização de sondas dirigidas à seqüências específicas do seu DNA ou RNA (GenProbe-Accuprobe) (VERONESI, 1996). Essas técnicas, entretanto, ainda não substituíram o diagnóstico convencional da tuberculose, feito através da pesquisa direta de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) e a cultura em meio de Lowenstein-Jensen. Os métodos modernos mencionados têm a vantagem de informar rapidamente o clínico o seu resultado.

Em estudo, realizado por Ellner *et al.*, 1988, a combinação do cultivo pelo BACTEC e as identificações utilizando-se sondas de DNA permitiu a caracterização de 89% de 176 isolados de *Mycobacterium tuberculosis* e 89% de 110 isolados de *Mycobacterium avium*. O que mais chamou a atenção dos autores foi a redução de 5 a 7 semanas no tempo necessário para a liberação do resultado final, em comparação com os métodos convencionais de isolamento e séries bioquímicas para identificação (ELLNER *et al.*, 1988; KONEMAN, 1997).



2. OBJETIVOS

São objetivos desse trabalho:

1. Determinar a frequência relativa do isolamento do *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* em indivíduos infectados pelo HIV atendidos no Serviço de Doenças Transmissíveis do HC/UNICAMP.
2. Determinar a sensibilidade à Rifampicina e Isoniazida de amostras de *Mycobacterium tuberculosis* isolados de pacientes infectados pelo HIV.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Durante o ano de 1996, uma grande variedade de materiais originados a partir de suspeitas clínicas em pacientes com o diagnóstico de aids foi cultivada, a saber: lavado bronco alveolar, escarro, líquido pleural, urina, fezes, linfonodo, ascite, lavagem gástrica, líquido sinovial, biópsia pulmonar, biópsia pleural e hepática. Após isolamento, esses organismos foram identificados através de métodos moleculares. As culturas de *Mycobacterium tuberculosis* desses materiais e correspondentes aos anos de 1996, 1997 e 1998 também foram testadas com respeito à sensibilidade à Rifampicina e à Isoniazida.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Descontaminação

Os espécimens foram processados sob uma capela de fluxo laminar nível 3 em um laboratório específico de micobactérias. O laboratório é localizado no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

As amostras provenientes de sítios estéreis foram inoculadas diretamente no meio apropriado, enquanto aquelas obtidas de locais potencialmente contaminados foram tratadas visando a eliminação de microrganismos outros que não micobactérias. O método empregado é o de Petroff modificado, descrito abaixo.

É colocada a amostra clínica em um tubo cônico de tampa de rosca com capacidade para 50 ml. Se a amostra for escarro, coloca-se até 5 ml acima da parte mais purulenta ou sanguinolenta da amostra. Em outros materiais clínicos coloca-se até 10 ml da amostra e adiciona-se o mesmo volume de NaOH 4%, homogeniza-se o material em agitador que, a seguir, é mantido em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos. Completa-se até 50 ml com Tampão Fosfato (0,067M pH 6,8). Mistura-se por inversão e centrifuga-se (3000 rpm) por 15 minutos. Descarta-se o sobrenadante em um frasco contendo hipoclorito à 2% e, finalmente, neutraliza-se com HCl até um pH de aproximadamente 7.

Depois de tratado o material é confeccionada uma lâmina para coloração de Zielh-Neelsen (Figura 4) e semeado o material para o eventual isolamento do microrganismo.

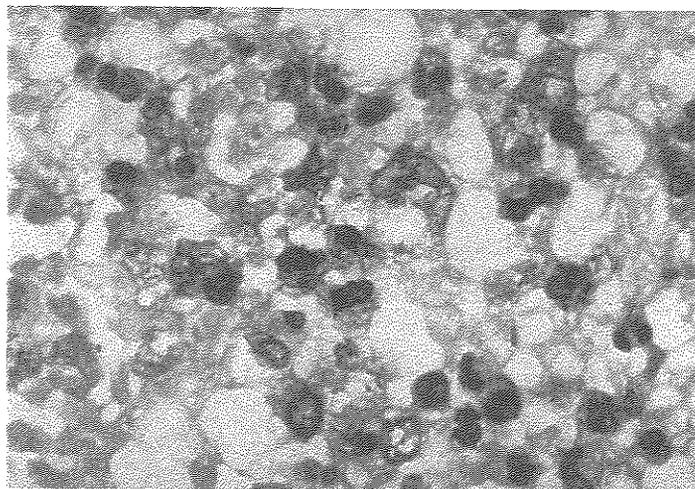


Figura 4. Coloração de Zielh-Neelsen

3.2.2. Isolamento

Foram utilizados: o meio sólido de Lowenstein Jensen e o meio líquido BACTEC 12B para o isolamento das cepas.

No primeiro caso, a amostra descontaminada é semeada diretamente no meio de L.J., incubada à temperatura de 37°C sob atmosfera em CO₂ por uma semana e, depois, em estufa bacteriológica comum por até 90 dias. Esse método tem a vantagem de ser de custo baixo e permitir a observação da morfologia e outros aspectos das colônias que eventualmente crescerem. Entretanto, é demorado, pois o tempo médio de crescimento é de quatro semanas (Figura 5).

O meio BACTEC 12B (caldo Middlebrook - 7H9) é constituído de : hidrolisado de caseína, albumina bovina, catalase, água deionizada, 1_u Ci/ml de ¹⁴C e agente inibidor PANTA(Polimixina B, Anfotericina B, Ac. Nalidixico, Trimetroprim e Azlocilina). Ele permite a observação de crescimento por métodos indiretos em pouco tempo (cerca de 7 a 14 dias), porém trata-se de técnica de custo elevado (Figura 5).

Nesse caso, a amostra tratada é inoculada em frascos herméticos que contêm os substratos mencionados (inclusive o ácido palmítico marcado com ^{14}C). A micobactéria, presente na amostra, utiliza-o e libera como produto de seu metabolismo o $^{14}\text{CO}_2$. A atmosfera do frasco é testada periodicamente por intermédio de uma sonda para a presença do $^{14}\text{CO}_2$. A presença desse isótopo, indica o crescimento da bactéria no meio. O GI (Índice de Crescimento - Growth index) expressa quantitativamente a presença do CO_2 marcado e, portanto, da intensidade do crescimento bacteriano. A cultura será positiva se o frasco apresentar GI maior ou igual a 10 e negativa se, após 6 semanas, tiver leitura GI menor que 10.



Figura 5. Meios de Löwenstein-Jensen e Bactec 12B

3.2.3. Identificação

3.2.3.1. Teste da inibição pelo NAP

O NAP (p-nitro α -acetil-amino- β -hidroxipropiofenone) é um composto intermediário da síntese do cloranfenicol, que é capaz de inibir o crescimento das micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*. O NAP é feito a partir de um frasco 12B (Middlebrook) com GI entre 50 e 100. Antes de proceder, deve-se certificar fazendo um esfregaço pela técnica de Gram, se a cultura não está contaminada com outros microrganismos. Um volume proporcional ao GI é transferido da cultura de isolamento para o frasco contendo NAP. Imediatamente os frascos são adicionados CO₂ (tensão 5 a 10%). O frasco 12B original é conservado e funciona como controle de crescimento. São, então, incubados à temperatura de 37°C os três frascos.

As leituras são feitas diariamente por 2 a 6 dias e os índices de crescimento são comparados e a interpretação é feita da seguinte maneira:

1. Microrganismo do complexo *Tuberculosis*: duas leituras consecutivas com queda no GI da última em relação à primeira após a inoculação.
2. Microrganismo do grupo MOTT: aumentos diários do GI que ultrapassando 400 em um período de 4 dias.

Essa técnica permite a distinção dos microrganismos do Grupo *Tuberculosis* dos demais em, no máximo, sete dias.

3.2.3.2. Sondas de DNA (Gen Probe-ACCUPROBE)

É um teste rápido de DNA probe que utiliza sondas de DNA dirigidas a sítios específicos de microrganismos do gênero *Mycobacterium*.

Esse teste de hibridização de ácidos nucleicos é baseado na capacidade que têm fitas complementares (homólogas) de ácido nucleico de se alinhar especificamente e associar-se para formar complexos estáveis de dupla fita. O Sistema Accuprobe usa sondas

de DNA de fita única, conjugadas com enzimas que têm quimioluminescência que são complementares a uma molécula de RNA mensageiro do microrganismo. A sonda marcada combina-se a ele para formar um híbrido estável DNA:RNA.

Um reagente de seleção permite a separação entre sondas hibridizadas e as não- hibridizadas. Os híbridos DNA:RNA marcados produzem uma reação luminescente, cuja intensidade é medida em luminômetro.

A técnica de forma resumida consiste em : um número correspondente a uma alça de células bacterianas é colocado em tubos apropriados. Para efeito de controle ao conjunto de amostras a serem testadas inclui-se uma cepa de *M. tuberculosis* e uma de *M. avium*.

A esses tubos adiciona-se o reagente de lise e o de hibridização. A amostra é colocada em banho maria à 95 °C com sonicação, o que proporciona a ruptura das células. Parte dessa suspensão é transferida a tubos contendo as sondas e incubados. As sondas hibridizadas são separadas através do reagente de seleção e incubado por 5 minutos a 60° C. Esfria-se à temperatura ambiente por mais 5 minutos, adiciona-se o substrato luminescente e a leitura é feita até uma hora após o término do teste.

Na tabela abaixo encontram-se as leituras correspondentes ao resultado.

Tabela 1. Resultados de leituras do Gen-Probe

	Leitura
Valor de corte	30.000 RLU
Controle negativo	< 10.000 RLU
Controle positivo	> 30.000 RLU

3.2.4. Pesquisa de Sensibilidade

O procedimento tem como base o mesmo princípio utilizado no método convencional, a diferença está na utilização de um meio líquido adicionado de substrato radioativo, e os resultados são obtidos, em média, de 4 a 5 dias.

Esse teste corresponde a uma versão modificada do método de pesquisa de sensibilidade pelo método das proporções. O limite, nesse caso, para a caracterização da resistência é de 1% para todas as drogas tuberculostáticas.

Para determinar essa proporção resistência, o inóculo bacteriano usado no frasco controle é 100 vezes menor que o do frasco contendo a droga. Os frascos contendo a droga em teste e o controle são verificados diariamente após a inoculação. A diferença entre o valor obtido do GI e do GI do dia imediatamente anterior é chamada de ΔGI . O ΔGI é calculado, então, o para os frascos contendo as drogas e o controle. Se o ΔGI da droga é menor que o ΔGI do controle, a micobactéria é sensível à droga. Caso contrário, é resistente. As drogas utilizadas neste trabalho foram: Isoniazida e Rifampicina.



4. RESULTADOS

Dos pacientes estudados (51) em 28 (54,9%) houve o crescimento de *M. tuberculosis* e em 23 (45,1%) de *M. avium* (tabela 2).

Dos materiais analisados, provenientes de 44 pacientes, em 49 houve o crescimento de *M. tuberculosis* e em 39 de *M. avium*. O primeiro foi mais freqüentemente isolado do escarro e líquido céfalo raquidiano (LCR) e o segundo do sangue, indicando a infecção disseminada (tabela 3). O *M. avium* foi também isolado de amostras de tecidos (biópsia pulmonar e hepática e medula óssea). Tomados os três materiais em que houve a maior freqüência de isolamentos, a saber: sangue, líquido e escarro houve uma diferença significativa entre as espécies isoladas e o tipo de material. Como esperado, os *M. avium* originaram-se principalmente de hemoculturas, enquanto os *M. tuberculosis* de escarro e líquido.

Com respeito ao estado imunitário do paciente, observou-se que aqueles portadores de infecção pelo *M. tuberculosis*, na sua maioria, possuíam níveis de células CD4 superiores àqueles apresentados pelos pacientes infectados pelo *M. avium* (tabela 4).

As cepas de *M. tuberculosis* isoladas de 50 pacientes com aids, atendidos nos anos de 1996, 1997, 1998, foram testadas com respeito à sua sensibilidade à Rifampicina e Isoniazida. Dessas 41 foram sensíveis a ambos os antimicrobianos e duas resistentes. Cinco cepas foram sensíveis à Rifampicina e resistentes à Isoniazida e duas resistentes à Rifampicina e sensíveis à Isoniazida (tabela 5).

Não foram isoladas outras espécies de micobactérias, além do *M. tuberculosis* e *M. avium*, no grupo de pacientes estudados.

Tabela 2. Distribuição dos pacientes estudados, segundo o sexo e a espécie de micobactéria isolada.

Sexo	Espécie isolada (%)		Total
	<i>M. tb</i> [‡]	<i>M. avium</i>	
Masculino	17	14	31
Feminino	11	9	20
Total	28 (54,9)	23 (45,1)	51

[‡]*M.tb* – *Mycobacterium tuberculosis*

Tabela 3. Distribuição das culturas positivas, segundo o espécimen clínico e a espécie de micobactéria isolada.

Material	Espécie (%)		Total
	<i>M.tb</i> [‡]	<i>M. avium</i>	
Sangue	5	17	22
Medula Óssea	-	2	2
Biópsia hepática	-	2	2
Biópsia pulmonar	-	1	1
Líquido pleural	4	-	4
Líquor	11	1	12
“Swab” de orofaringe	1	-	1
Lavado gástrico	-	1	1
Pus	4	1	5
Escarro	18	9	27
Urina	5	1	6
Fezes	1	4	5
Total	49 (55,7)	39 (44,3)	88

[‡]*M.tb* – *Mycobacterium tuberculosis*

Tabela 4. Distribuição dos pacientes, segundo o número de linfócitos CD4 e a espécie de micobactéria isolada.

Linfócitos CD4/mm ³	Espécie isolada (%)		Total
	<i>M. tb</i> ^{2*}	<i>M. avium</i>	
Até 50	9	16	25
50-200	12	2	14
Mais que 200	4	1	5
Total	25 (57)	19 (43)	44

^{2*}*M.tb* – *Mycobacterium tuberculosis*

Tabela 5. Distribuição das cepas de *M. tuberculosis* isoladas, segundo a sensibilidade à Rifampicina e Isoniazida.

	Número de cepas	%
Sensível R ^{2*} / Sensível I ^{2*}	41	82
Sensível R/ Resistente I	5	10
Resistente R / Sensível I	2	4
Resistente R / Resistente I	2	4
Total	50	

^{2*}R- Rifampicina; I- Isoniazida



5. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra que as infecções provocadas pelo *M. avium* são freqüentes no Brasil em pacientes com aids e que demandam a serviços com a característica de atendimento terciário. As infecções provocadas pelos organismos do complexo *M. avium* (MAC) já foram relatadas aqui, porém a freqüência relativa entre a doença provocada por esses agentes e o *M. tuberculosis* ainda não foi objeto de análise.

O isolamento do *M. tuberculosis* (55,7%) foi mais observado do que os do complexo MAC (44,3%) no ano de 1996, nos diversos materiais encaminhados a este laboratório de pesquisa. Esses isolamentos do *M. tuberculosis* foram feitos, na sua maioria, em amostras de escarro e líquido céfalo raquidiano, indicando que os pulmões e o sistema nervoso central são os órgãos mais acometidos por esse agente nos pacientes portadores de aids. Ao contrário, no caso dos organismos do complexo *M. avium*, o sangue foi a sua principal fonte de obtenção, confirmando dados de outros autores que apontam as bactérias desse grupo como freqüentes causadoras de infecções disseminadas.

De acordo com Barreto *et al.*, 1993, culturas de medula óssea obtidas de pacientes com aids em investigação foram positivas em 18,4% para organismos do MAC e em 7,2% para *M. tuberculosis* em serviço de natureza terciária, com características semelhantes ao nosso. O *M. avium* é também, entre nós, a espécie do complexo *M. avium* mais encontrada, conforme relato de Saad *et al.*, 1997, quando associada a casos de aids.

Deve-se ressaltar que, não necessariamente, os isolamentos do *M. avium* estão associados à doença clínica bem caracterizada. O valor preditivo de doença, nesses casos, avaliado por Hadad *et al.*, 1995, foi pequeno, quando o agente em questão foi isolado em materiais diversos do sangue e medula óssea de pacientes com aids.

Este material, o isolamento do *M. avium*, a partir de materiais como fezes e mesmo escarro, é sujeito às mesmas considerações anteriores, embora esse não tenha sido o enfoque do estudo. Em geral, o *M. tuberculosis* foi recuperado de 54,9% dos pacientes estudados, enquanto o *M. avium* o foi em 45,1%.

Essa informação dando conta do freqüente isolamento do *M. avium* neste ambiente de estudo é importante, sob o ponto de vista do tratamento e profilaxia das infecções por ele provocadas.

Neste material, revendo os prontuários dos pacientes estudados, observa-se uma conduta terapêutica equivocada na maioria dos pacientes com doença provocada pelo *M. avium*. Quase sempre, a prescrição adotada (tratamento com o esquema tríplice anti *M. tuberculosis*, que utiliza a Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida), logo após a notícia do isolamento de uma micobactéria, ou mesmo a positividade da pesquisa direta do agente pelo método de Ziehl-Neelsen (esfregaço para pesquisa de BAAR) foi incorreta, sendo esse tratamento insistido por tempo demasiadamente longo, mesmo na ausência de melhora clínica, ou manifestações de doença disseminada (dados não registrados). O conhecimento de dados de literatura que davam como certo o conceito da baixa freqüência relativa da infecção pelo *M. avium* em países em desenvolvimento pode ter influenciado essa conduta.

A resistência do *M. tuberculosis* aos quimioterápicos de primeira linha em pacientes com aids é um fato observado em todo o mundo. No Brasil, de 228 pacientes analisados por Pinto *et al.*, 1996, 20,6% tinham resistência a uma ou mais dessas drogas, freqüência semelhante à encontrada neste trabalho (18%). Essa resistência está associada, principalmente, a tratamentos anteriores e alcoolismo. A freqüente institucionalização dos doentes com aids, tanto em hospitais quanto em casas de apoio ou hospitais-dia, favorecendo a sua convivência, torna preocupante a questão da disseminação de cepas resistentes. As normas de isolamento que são requeridas para pacientes internados, nem sempre são observadas, dada a precariedade do atendimento da maioria dos hospitais do Brasil. A transmissão de doença ao pessoal do hospital, como observado em outros países, também dever ser objeto de preocupação.



6. CONCLUSÕES

1. As infecções provocadas pelo *M. avium* são de frequência semelhante às provocadas pelo *M. tuberculosis*. Esses dados podem ser generalizados apenas para populações com características semelhantes às nossas.
2. A resistência do *M. tuberculosis* aos quimioterápicos de primeira linha: Rifampicina e/ou Isoniazida foi observada em 18% dos casos. A multirresistência, segundo definição do CDC-USA (resistência a ambas, Rifampicina e Isoniazida) foi vista em 4% dos casos.
3. Em pacientes com aids, de características semelhante à população estudada, os materiais clínicos, cujo isolamento do *M. avium* é mais frequente, são: sangue aproximadamente 50% e escarro, demonstrando que a doença por ele provocada é, com frequência, disseminada.
4. Os materiais em que houve o isolamento mais frequente do *M. tuberculosis* foram: líquido céfalo raquidiano e escarro.
5. Nos pacientes com severa imunodeficiência (níveis de linfócitos CD4 menores do que 50 mm^3), o *M. avium* foi mais frequentemente isolado do que o *M. tuberculosis*. Ao contrário, naqueles indivíduos com mais que 50 linfócitos $\text{CD4}/\text{mm}^3$ o agente predominante foi o *M. tuberculosis*.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO JÁ, PALACI M, FERRAZOLI L, MARTINS MC, SULEIMAN J, LOURENÇO R, FERREIRA OC Jr, RILEY LW, JOHNSON WD Jr, GALVÃO PA. - Isolation of *Mycobacterium avium* complex from bone marrow aspirates of AIDS patients in Brazil. **J Infect Dis**, 168(3): 777-9,1993.

BENSON, C. A. – Disease due to *Mycobacterim avium* complex in patients with Aids: epidemiology and clinical syndrome. **Cli Infect Dis**, 18(3): S218-22,1994.

BRASIL. **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica**. 4ª. ed. Brasília, DF, 1998. p. 1-9.

CHAISSON, RE.; GALLANT, J.E.; KERULY, J.C.; MOORE, R.D. – Impact of opportunist disease on survival in patients with HIV infection. **AIDS**, 12(1): 29-33, 1998.

DEVALOIS, A. & RASTOGI, N. – Computer-assisted analysis of *Mycobacterium avium* fingerprints using insertion elements IS 1311 in a Caribbean setting. **Res Microbiol**, 148: 703-13,1997.

ELLNER P. D.; KIRHN T. E.; CAMMARATA R.; HOSMER M. – Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. **J Clin Microbiol**, 26(7): 1349-52,1988.

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

HADAD DJ, PALHARES MC, PLACCO AL, DOMINGUES CS, CASTELO FILHO A, FERRAZOLI L, UEKI SY, TELLES MA, MARTINS MC, PALACI M.- *Mycobacterium avium* Complex (MAC) isolated from AIDS patients and the criteria required for its implication in disease. **Rev Inst Med Trop**, 37(5): 375-83, 1995.

HAVLIR, D.V. & ELLNER, J.J. – *Mycobacterium avium* Complex. In: MANDELL,G.L. BENNETT, J.E. & DOLIN, R., ed. – **Principles and Practice of Infections Diseases**. 5ª.ed. New York, Churhill Livingstone, p. 2630-5, 2000.

HEIFETS, L. B. – Clinics in Laboratory Medicine. **Clinical Mycobacteriology**, 16: 513,1996.

HORSBURGH, C. R., Jr., CHIN, D.P., YAJKO, D.M.; HOPEWELL, P.C.; NASSOS, P.S.; ELKIN, E.P.; HADDLEY, W.K.; STONE, E.N.; SIMON, E.M.; GONZALES, P.; OSTROFF, S.; REINGOLD, A.L.; - Enviromental Risk Factors for Acquisition of Mycobacterium avium Complex in persons with Human Immunodeficiency Virus Infection. **J Infect Dis**, 170:362-7,1994.

INDERLIED. C.B.; KEMPER, C.A; BERMUDEZ, E.M. – The *Mycobacterium avium Complex*. **Clin Microbiol Ver** , 6(3): 266-310,1993.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.; SCHRICKENGERGER, P.C.; WINN Jr.; W.C. – **Color atlas and texbook of diagnostic microbiology**. 5^a. ed. Philadelphia, Lippincott, p. 893-938,1997.

KRITSKI, A.L. – **Tuberculose do ambulatório à enfermaria**. 2^a ed. São Paulo, Ateneu. p. 1, 2000.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, D.L.; KOBAYASHI, G.S. – **Microbiologia Médica**. 3^a.ed. Ed. St. Louis, Missouri, Morby Year Book Inc, p.266-73, 1998.

MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.;YOLKEN, R.H. – **Manual of Clinical Microbiology**. 7^a.ed. St. Louis, Missouri Americam society for Micobiology, p.399, 1999.

NIGHTINGALE, S.D.; BYRD, L.T.; SOUTHERN, P.M.; JOCKUSH, J.D. CAL SX.; WYNNE, B.A. - Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. **J Infect Dis**, 165(6): 1082-5, 1992.

OPRAVIL, M. - Epidemiological and clinical aspects of mycobacterial infections. **Infection**, 25(1): 56-9, 1997.

PARKER, B.C.; FORD, M.A.; GRUFT, H.; FALKINHAM, J.O. - Epidemiology of infection by nontuberculosis mycobacteria: IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. *Am Ver Respir Dis*, **128**: 652-6, 1983.

PETERS, M.; MULLER, C.; RUSCH-GERDES, S.; SEIDEL, C.; GOBEL, U.; POHLE, H.D.; RUF, B. - Isolation of atypical mycobacteria from tap water in hospitals and homes: is this a possible source of disseminated MAC infection in AIDS patients? *J Infect*, **1(1)**: 39-44, 1995.

PINTO WP, HADAD DJ, PALHARES MC, FERAZOLI L, TELLES MA, UEKI SY, PLACCO AL, SAUAIA N, PALACI M.- Drug resistance of *M. tuberculosis* isolated from patients with HIV infection seen at an AIDS Reference Center in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop*, **38(1)**:15-21, 1996.

PORTER, J.D. - Mycobacteriosis and HIV infections: the new public health challenge. *J Antimicrob Chemother*, **37**: 113-120, 1996.

RAMOS, M.C.; VILLARES, M.C.B.; JAQUES, M.; ROSCANI, A.L.C.; ROSCANI, G.N.; ALVES, E.P. - Estudo bacteriológico retrospectivo das infecções micobacterianas em pacientes portadores da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). *Braz J Infect Dis*, **4(2)**: 86-90, 2000.

REIS, V.L.L.; SCHMIDT, J.M.; AGUIAR, E.J.; AZULAY, R.D. - Micobactérias atípicas. *Arq Bras Med*, **58(3)**: 160-9, 1984.

RUNYON, E.H. - Pathogenic mycobacteria. *Adv Tuberc Res*, **14**: 235-87, 1965.

SAAD MH, VICENT V, DAWSON DJ, PALACI M, FERRAZOLI L, FONSECA L. DE S.- Analysis of *Mycobacterium Avium* complex serovars isolated from AIDS patients from southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **92(4)**: 471-5, 1997.

THOREL, M.F.; KRICHEVSKY, M.; LÉVY-FRÉBAULT, V. - Numerical taxonomy of mycobactin-dependent Mycobacteria, amended description of *Mycobacterium avium*, and description of *M. avium* subsp. *avium* subsp. nov., *M. avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov. and *M. avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int Syst Bacteriol*, **40**: 254-60, 1990.

VERONESI, R. & FOCACCIA, R. – **Tratado de Infectologia**. São Paulo, Atheneu, p.914-5, 1996.

von REYN, C.F.; ARBEIT, R.D.; TOSTESON, A.N.A.; BARBER, T.W.; WADDELL, R.; SOX, C.H.; BRINDLE, R.J.; GILKS, C.F.; RANKI, A.; BARTHOLOMEW, C.; EDWARDS, J.; FALKINHAM III, J.O.; O'CONNOR, G.T. & THE INTERNATIONAL MAC STUDY GROUPS. - The international epidemiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in Aids. **AIDS**, 10: 1025-32, 1996.

WOLINSKY, E. - Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculosis cases with long term follow-up. **Clin Infect Dis**, 20(4): 954-63, 1995.



8. *ANEXOS*

SOLUÇÕES E REAGENTES

1. Soluções para Coloração de Ziehl-Neelsen

Fucsina

Fucsina básica.....3g
Álcool 95%.....100ml

Ácido fênico 5%

900ml de ácido fênico 5%
Solução de ácido fênico para deixar estocado
950ml de água destilada
50ml de fenol

Azul de metileno 0,3%

Azul de metileno.....3g
Água destilada.....1000ml

Álcool ácido 3%

Álcool etílico.....970ml
Ácido clorídrico concentrado.....30ml

Descontaminação das amostras

Solução NaOH 4%

NaOH pastilhas.....40g
Solução vermelho de fenol.....10ml
Água destilada.....1000ml

Dissolver o hidróxido de sódio
Esterilizar à 121°C por 15 minutos
Estocar à temperatura ambiente.

Solução tampão fosfato pH 6,8

Solução estoque tampão alcalino
Na₂PO₄ (anidro).....9,47g
Água destilada.....1000ml

Solução estoque tampão ácido
KH₂PO₄.....9,07g
Água destilada.....1000ml

Dissolver os sais em um pouco de água e completar volume final.
Autoclavar à 121°C por 15 minutos
Estocar em geladeira.

Solução de trabalho
Colocar volumes iguais das soluções estoque dos tampões
Checar o pH da solução final
Acertar o pH com os próprios tampões.

Meios de cultura utilizados para isolamento

Meio de Lowenstein-Jensen

Meio base (DIFCO)37,5g
Glicerol P.A.....12ml
Água destilada.....600ml
Ovos homogeneizados.....1000

Autoclavar o glicerol e a água destilada. Deixar resfriar até 50°C para adicionar os ovos homogeneizados de forma estéril sem que haja a formação de bolhas. Distribuir em tubos estéreis e colocá-los em inspinsador, inclinados para a coagulação do meio. Deixar sob aquecimento por 45 minutos à 80°C.

Frasco BACTEC 12B (Middlebrook 7H12)

Caldo de Middlebrook 7H9
Hidrolisado de Caseína
Albumina Bovina
Catalase
1_u Ci / ml de ¹⁴C. (4_u Ci / frasco)
Água Deionizada
pH final = 6.8

PANTA Plus (evita crescimento de contaminates)

Polimixina B.....	50 U/ml
Anfotericina B.....	5 ug/ml
Ac. Nalidixico.....	20 ug/ml
Trimetropim.....	5 ug/ml
Azlocilina.....	5 ug/ml

Reconstituing Fluid (solução para reconstituição do PANTA)

Composição: Água

POES = esterato de plioxietileno (substância promotora de crescimento).

Drogas utilizadas

Isoniazida (0.1 ug/ml)

Rifampicina (2.0 ug/ml)

Reconstituir o frasco da droga liofilizada com 5ml de água destilada estéril e agitar até a droga estar completamente dissolvida.