

Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*.

Strategies for identification of the *Mycobacterium fortuitum* complex species

Roberta M. BLANCO¹
Vânia T. G. INUMARU¹
Maria Conceição MARTINS^{1*}
Carmen M.S. GIAMPAGLIA¹
Suely Y.M. UEKI¹
Erica CHIMARA¹
Júlia T.U. YOSHIDA¹
Maria Alice S. TELLES¹

RIALA6/923

Blanco, R. M. et al. Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*.
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 61(2):91-96, 2002

RESUMO. As micobactérias de crescimento rápido anteriormente classificadas como complexo *Mycobacterium fortuitum* foram recentemente designadas *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*. A identificação dessas micobactérias é importante para estabelecer a terapêutica adequada, visto que possuem diferentes padrões de resistência às drogas. Dentre 3.441 culturas de micobactérias recebidas em 1999 no Setor de micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, foram selecionadas 13 cepas, classificadas como complexo *M. fortuitum*. O estudo incluiu o isolamento das colônias para certificar-se da pureza das culturas, a adição de testes com carboidratos e citrato de sódio que separam as quatro espécies citadas e o uso da técnica de PCR restriction analysis do gene *hsp65* (PRA) para elucidação de resultados duvidosos dos testes fenotípicos. Na análise das 13 culturas, observou-se que oito apresentaram dois tipos de colônias (lisa e rugosa) e as cinco restantes apenas um tipo. As identificações feitas com a técnica de PRA e com os testes fenotípicos foram concordantes na maioria das cepas. Os resultados desse estudo sugerem que a identificação de micobactérias devido a sua complexidade deva ser centralizada em laboratórios de referência e implementada com testes específicos para cada espécie, que possibilitem a elucidação rápida do diagnóstico.

PALAVRAS-CHAVE. *Mycobacterium fortuitum*, Identificação fenotípica, PCR.

¹ Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

* Endereço para correspondência – Setor de Micobactérias/Seção de Bacteriologia,
Av. Dr Arnaldo nº 351- 9º andar, Cerqueira César, cep 01246-902, São Paulo-SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

As infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido geralmente estão associadas às espécies anteriormente designadas complexo *M. fortuitum*, que incluíam *M. fortuitum*, subespécies *M. fortuitum* e *M. peregrinum* e *M. chelonae* subespécies *M. chelonae* e *M. abscessus*¹⁵. Essa designação foi usada até meados da década de 1980, pela maioria dos laboratórios clínicos para informar o resultado das culturas. Em 1981, Silcox et al.¹² descreveram provas para a identificação das espécies *M. fortuitum* e *M. chelonae* incluindo as subespécies, pois observaram que nos Estados Unidos um número elevado dessas micobactérias estava sendo notificado ao Center for Disease Control and Prevention. Em 1992, Kusunoki e Ezaki⁶ propuseram que *M. peregrinum* e *M. abscessus* fossem nomeadas novas espécies por possuírem características individuais que as diferenciavam de *M. fortuitum* e *M. chelonae*. Na nomenclatura bacteriana atual constam as espécies *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*³, definidas com base em testes genotípicos que permitem a caracterização precisa do micorganismo^{2,6,10,13}. A identificação das espécies é importante para a conduta terapêutica adequada, pois cepas isoladas de casos relacionados com doença apresentam diferenças no padrão de susceptibilidade às drogas^{4,12,17}.

Essas micobactérias são ambientais mas patógenos oportunistas^{1,4,15}, é comum a sua presença no solo, na água (rios, lagos e água tratada) e portanto podem ser contaminantes de equipamentos médicos, broncoscópicos, soluções para assepsia e materiais usados em cirurgia^{9,11,16}.

As doenças causadas por essas espécies incluem as formas pulmonares, disseminadas, endocardite, feridas cirúrgicas e traumáticas, doenças de pele e de tecidos^{4,16}.

No Brasil, um relato de caso de ceratite por *M. chelonae* após cirurgia para correção de miopia¹¹, um resumo sobre infecções cutâneas por *M. abscessus* e *M. fortuitum* após aplicações em mesoterapia ou cirurgia plástica⁹ e um artigo de LEÃO⁷ sobre o risco crescente de infecções por essas espécies de micobactérias, em pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos, indicam a necessidade de respaldo laboratorial para o diagnóstico desses casos.

No Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz (IAL) São Paulo, os testes fenotípicos usados até a presente data identificavam *M. fortuitum* e *M. chelonae* e quando não era possível a definição dessas espécie, informava-se como complexo *M. fortuitum*.

O objetivo deste estudo foi reavaliar as cepas de 1.999 classificadas como complexo *M. fortuitum*, identificar as espécies acima citadas adicionando novos testes fenotípicos e usar a técnica de PCR restriction analysis do gene *hsp65* (PRA) para elucidação de resultados duvidosos.

MATERIAL E MÉTODOS

Dentre 3.441 culturas de micobactérias recebidas em 1999 no Setor de Micobactérias do IAL foram identificadas 32 *M.*

fortuitum, 23 *M. chelonae* e 13 classificadas como complexo *M. fortuitum* que foram selecionadas para estudo. Para a identificação foram usadas 25 provas fenotípicas citadas na literatura internacional^{1,5,8,14,15}. O *M. fortuitum* é nitrato positivo, ofloxacina negativo e galactosidade negativo e o *M. chelonae* é nitrato negativo, ofloxacina positivo e galactosidase positivo. As cepas classificadas como complexo *M. fortuitum* tinham o perfil variável com referência a essas provas não sendo possível a definição da espécie.

As culturas conservadas em meio Löwenstein Jensen (LJ) foram repicadas no mesmo meio e após o crescimento ressuspendidas em água destilada estéril na turvação da escala 1 de MacFarland e diluídas 1/1000. Foi feita a semeadura com alça, em placas com meio Middlebrook 7H11 para isolar as colônias e certificar-se da pureza das culturas que foram observadas com o auxílio de um estereoscópio para anotação das suas características. Em meio sólido as colônias dessas espécies podem ser lisas ou rugosas, algumas apresentando características bem definidas^{5,15}. Os diferentes tipos de colônia foram submetidos aos testes fenotípicos que constam na tabela 1. Os meios com açúcares (manitol, frutose e succinato) e citrato de sódio foram usados nesse estudo para auxiliar na diferenciação das quatro espécies^{1,5,8,14,15}.

As culturas com resultados discordantes nos testes com carboidratos e citrato de sódio foram submetidas à técnica de PCR-restriction enzyme analysis do gene *hsp65* (PRA)^{2,13}.

RESULTADOS

Na análise das 13 culturas observou-se oito com dois tipos de colônia (lisa e rugosa) e cinco com apenas um tipo. As culturas com dois tipos (16 isolamentos) foram identificadas com os testes fenotípicos como *M. fortuitum* (três) e *M. peregrinum* (cinco). As cinco culturas com um tipo de colônia foram identificadas como: duas *M. peregrinum* (rugosa), uma *M. fortuitum* (lisa), uma *M. chelonae* (lisa) e uma micobactéria de crescimento lento acromógena (lisa).

Alguns testes fenotípicos mais indicados para a identificação dessas espécies constam da tabela 1. Nesta observa-se os resultados esperados para cada espécie, os das culturas originais classificadas como complexo *M. fortuitum* (conforme registro do Setor) e os obtidos nos repiques após separação das colônias. Ocorreu mudança no resultado de uma ou mais provas em relação aos resultados da cultura original, apenas a cepa três e respectivo repique apresentaram o mesmo perfil. O teste que apresentou maior variação foi NaCl 5% e os menos variáveis foram Ácido pícrico e Ofloxacina. Dentre os repiques das cepas com dois tipos de colônia, observou-se em cada tipo de colônia variação de resultados em três testes, repique 4 (NaCl 5% e Arilsulfatase) e repique 5 (Ácido pícrico).

Nas provas com carboidratos e citrato de sódio observou-se variação de resultados nos dois repiques das cepas 3, 4 e 7 e perfis de resultados não específicos para essas espécies nos repiques das cepas 10 e 13. Esses oito isolamentos foram

Tabela 1 – Resultados da identificação fenotípica propostos na literatura para definição das espécies e o observado das 13 cepas (original e repiques) – Instituto Adolfo Lutz 1999

Cepas	Provas fenotípicas											Resultado
	A.pírico	NaNO ₂	NaCl 37°C	Ofloxacina	Aril 3 dias	Galactato	Nitrito	Succinato	Manitol	Frutose	Citrato de Sódio	
Padrão 1	-	-	-	+	+ ^V	+	-	-	-	-	+	M.che
Padrão 2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	M.abs
Padrão 3	+ ^V	+	+	-	+ ^V	-	+	+	-	+	-	M.fo
Padrão 4	+	Nc	+	-	+	-	+	+	+	+	-	M.pe
Cepa 1	+	+	-	-	+	-	-	N	N	N	N	C.M. fo
Repique 1	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	M.pe
Cepa 2	+	-	+	-	+	+	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 2	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	M.fo
Cepa 3	+	+	+	-	+	+	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 3	+	+	+	-	+	+	+	V	+	+	-	M.pe
Cepa 4	+	+	-	-	-	-	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 4	+	+	V	-	V	-	+	+	V	+	-	M.pe
Cepa 5	+	+	+	-	-	+	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 5	V	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	M.fo
Cepa 6	+	+	+	-	+	-	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 6	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	M.fo
Cepa 7	-	+	+	-	+	+	+	N	N	N	N	C.M. fo
Repique 7	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	V	M.pe
Cepa 8	+	+	+	-	-	+	+	N	N	N	N	C.M. fo
Repique8	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	M.pe
Cepa 9	+	+	+	+	+	+	+	N	N	N	N	C.M. fo
Repique 9	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	M.pe
Cepa 10	-	+	-	+	+	-	+	N	N	N	N	C.M. fo
Repique 10	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	CLA
Cepa 11	+	+	+	-	+	+	+	N	N	N	N	C.M.fo
Repique 11	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	M.fo

M.Che-*M. chelonae*, M. abs- *M. abscessus*, M.fo- *M. fortuitum*, M. pe- *M. peregrinum*, C.M.Fo- complexo *M. fortuitum*

Aril 3d- arilsulfatase 3 dias, galacto- â galactosidase cepas de 1 a 8 – dois repiques (1 colônia rugosa, 1 colônia lisa)

cepas 9 a 13 – 1 repique (apenas um tipo de colônia)

V- resultado variável nos repiques (1 positivo, 1 negativo), N- não realizado Nc- não consta

Tabela 2 – Culturas submetidas a técnica de PRA para confirmação da espécie

Cultura	Número de isolamentos	Identificação fenotípica	Identificação pelo PRA
Repique 3	2	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fortuitum I</i>
Repique 4	2	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum II</i>
Repique 7	2	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. peregrinum II</i>
Repique 10	1	Micobactéria de crescimento lento acromógena	<i>M. nonchromogenicum II</i>
Repique 13	1	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae I</i>

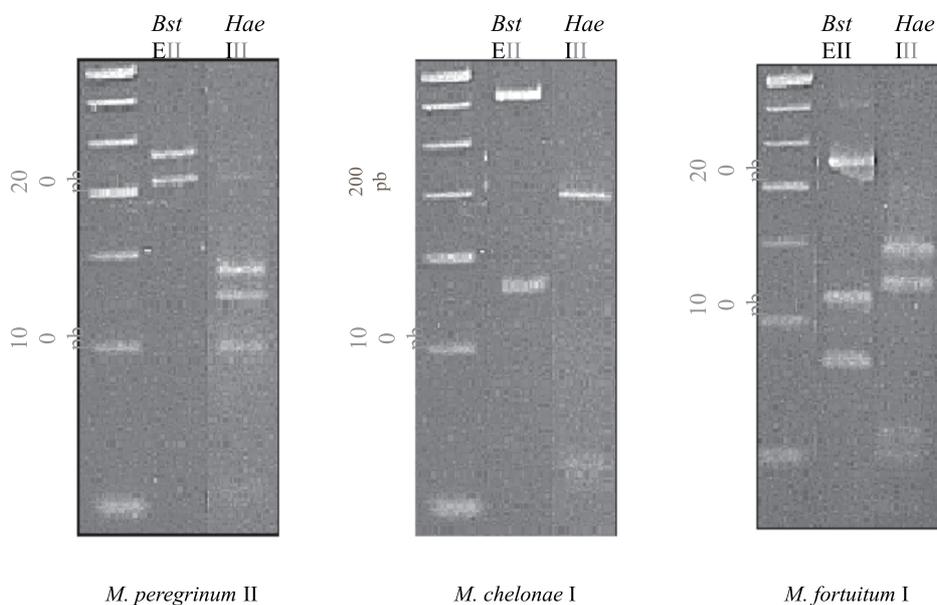


Figura 1. Padrões de PCR- restriction enzyme analysis obtidos na identificação das cepas do complexo *M. fortuitum*

submetidos ao PRA para elucidação dos resultados duvidosos. (tabela 2).

Os padrões de PRA para identificação das espécies *M. fortuitum I*, *M. chelonae I* e *M. peregrinum II* constam da figura 1.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nossos resultados, conforme citam Yakrus et al¹⁷, mostram a dificuldade para diferenciar essas espécies de micobactérias apenas com testes fenotípicos e ressaltam a necessidade de que nos laboratórios de referência estejam disponíveis outros métodos para auxiliar nessa identificação.

A adição dos testes de utilização de açúcares e citrato de sódio possibilitou a diferenciação entre *M. fortuitum* e *M. peregrinum* que não era possível com os demais testes sugerindo que, de imediato, pode ser útil a utilização desses testes para a identificação de micobactérias de crescimento rápido.

Constatamos diferenças de resultados em alguns testes que podem ter sido induzidas por alterações nos meios de cultura, nas temperaturas de incubação ou nas suspensões bacterianas. Além das variações ocorridas devido a fatores inerentes aos procedimentos, sempre que são propostos testes fenotípicos para identificação de uma espécie nem todos os organismos pertencentes a ela expressam o mesmo resultado. Devido ao exposto podem ocorrer interpretações errôneas dos resultados de identificação ou não ser possível a diferenciação dessas espécies que têm perfis fenotípicos muito próximos.

Nesse estudo com as cepas do complexo *M. fortuitum* observou-se uma que após o repique foi classificada com os testes fenotípicos como micobactéria de crescimento lento acromógena (identificação não conclusiva) e pelo PRA foi identificada como *M. nonchromogenicum* e uma (dois repiques) identificada como *M. peregrinum* pelo fenotípico e como *M. fortuitum* pelo PRA. Ringuet et al¹⁰. em estudos de

sequenciamento com o gene *hsp65*, descreveram três cepas de *M. peregrinum* com características intermediárias entre essa espécie e *M. fortuitum* o que pode explicar a diferença observada nos resultados dos testes fenotípicos e PRA.

A comparação dos resultados dos testes fenotípicos e PRA não foi o objetivo desse estudo, mas existem relatos de que essa técnica é útil para elucidar resultados duvidosos e estabelecer as espécies de micobactérias. Devallois et al.² usando o PRA para o estudo de micobactérias já caracterizadas por outras técnicas, relataram a discriminação de algumas espécies que não foram diferenciadas em estudos anteriores e propuseram dois padrões para *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. abscessus* e três para *M. peregrinum*.

Nas 13 cepas estudadas foram observados os padrões *M. fortuitum* I, *M. peregrinum* II e *M. chelonae* I o que sugere a utilidade desta técnica em estudos de frequência para fins epidemiológicos.

Conforme citado na literatura internacional, existem desvantagens na identificação pelos métodos fenotípicos das quais salienta-se a diversidade de testes necessários para definição da espécie (muitas vezes não conclusiva) e o tempo necessário para leitura das provas e conclusão do exame^{2,10,17}.

Os resultados desse estudo sugerem que a identificação de micobactérias devido a sua complexidade deva ser centralizada em laboratórios de referência e implementada com testes mais específicos para cada espécie e que possibilitem a elucidação rápida do diagnóstico.

RIALA6/923

Blanco, R. M. et al. Strategies for identification of the *Mycobacterium fortuitum* complex species. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):91-96, 2002

ABSTRACT. The rapidly growing mycobacteria, previously classified as *Mycobacterium fortuitum* complex, has recently been designated *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* and *M. abscessus*. The identification of these mycobacteria is important for establishing the proper treatment, because they have different patterns to drugs. Among 3,441 cultures of mycobacteria received in 1999 by the Mycobacteria Laboratory of the Adolfo Lutz Institute, 13 cultures classified as *M. fortuitum* complex were selected to be studied. The study included isolation of colonies in order to ensure the purity of the cultures, the addition of tests with carbohydrate and citrate, which differentiate the four previously mentioned species and the use of the PCR restriction analysis of *hsp65* (PRA) for the analysis of dubious results in conventional tests. In the analysis of the 13 cultures, it was observed that eight showed two types of colonies (smooth and rough) and the remaining five showed only one type. The identification by PRA technique and by conventional tests agreed to the majority of the strains. The results of this study suggest that the identification of mycobacteria, due to its complexity, should be centralized in Reference Laboratories and implemented with specific tests for each specie in order to give a rapid diagnosis.

KEY-WORDS. *Mycobacterium fortuitum*, fenotipic identification, PCR.

REFERÊNCIAS

1. Collins, C.H.; Grange, J.M.; Yates, M.D. **Tuberculosis bacteriology: organization and practice**. 2nd London; Butterworth-Heinemann: 1997; 139p.
2. 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. **J.Clin.Microbiol.** 35:2969-2973, 1997.
3. Euzéby, JP. List of bacterial names with standing in nomenclature [on line] Available from; URL:<http://www-sv.cict.fr/bacteriol/>. [1999 Oct]
4. Falkinham, III; O, J. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin Microbiol Rev.** 9(2):177-215, 1999.
5. Kent, P.T.; Kubica, G.P. Public Health Mycobacteriology. **A guide for the level III laboratory**. Atlanta; 1985, 207p.
6. Kusunoki, S.; Ezaki, T. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. reg., and elevation of *Mycobacterium* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol**; 42 (2): 240-245, 1992.
7. Leão, S. C. Infecções por micobactérias de crescimento rápido são mais frequentes. **Sala satélite: MD Millennium Diagnósticos – Consultoria** [<http://www.saudeatotal.com/microbiologia/micobact.htm>]. 13 de maio de 2002.
8. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da tuberculose**. 2^a. ed. Rio de Janeiro; 1994, 115p.
9. Osugui, S. K. et al. **Infecções cutâneas causadas por micobactérias de crescimento rápido**. in: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia-Simpósio de Micobactérias; 2001 out 21-25; Foz do Iguaçu, PR (Resumo S-066).

10. Ringuet, H. et al. hsp65 Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.** 37: 852-857, 1999.
11. Seabra, F.P. et al. Ceratite pelo *Mycobacterium chelonae* após laser in situ ceratomileusis (lasik) estudo microbiológico e histopatológico: relato de um caso-P018. **Resumo dos painéis do XXXI Congresso de Oftalmologia**. [<http://www.abonet.com.Br/abo/644s/painel01.htm>]. 13 de maio de 2002.
12. Silcox, V.A.; Good, R.C.; Floyd, M.M. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. **J. Clin. Microbiol.** 14 (6): 686-691, 1981.
13. Telenti, A. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polym erase chain reaction and restriction analysis. **J Clin Microbiol.** 31(2): 175-178, 1993.
14. Tsukamura, M.; Ichikawa, S. Numerical classification of rapidly growing nonphotochromogenic mycobacteria. **Microbiol Immunol.** 30 (9): 863-882, 1986.
15. Wayne, L.G.; Kubica, G.P. Genus *Mycobacterium*. Lehmann and Neumann 1896. In Sneath, P.H.A. et al. editors. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: the Willians &Wilkins; p. 1435-57,1986
16. Winthrop, KL et. al. An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon **New England J. Med.** 346:1266-371, 2002.
17. Yakrus, M.A. et al. Comparison of methods for identification of *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae* isolates. **J. Clin Microbiol** 39:4103-4110, 2001

Recebido em 10/06/2002; Aprovado em 01/10/2002