

Culturas mistas de micobactérias: é importante isolar e identificar?

Mixed mycobacterial cultures: is it important to separate and to identify multiple species?

RIALA6/1030

Vânia T. G. INUMARU; Roberta M. BLANCO; Maria Conceição MARTINS; Carmen M.S. GIAMPAGLIA; Suely Y.M. UEKI; Erica CHIMARA; Lucilaine FERRAZOLI; Maria Alice S. TELLES.

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, SP, Setor de Micobactérias, Seção de Bacteriologia, Av. Dr. Arnaldo, nº 351 - 9º andar, Cerqueira César. 01246-902, São Paulo, SP.

Recebido: 06/07/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005

RESUMO

A investigação de culturas mistas de micobactérias é importante pois geralmente estas incluem ao menos uma espécie patogênica ou potencialmente patogênica. Dentre 8.036 culturas recebidas entre 1999 e 2000, pelo Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, foram selecionadas 21 (0,26%) com resultados sugestivos de culturas mistas. Após o isolamento em meio 7H11 as colônias foram repicadas em Löwenstein Jensen e incubadas à 37° C. A identificação dos 32 subcultivos foi feita por métodos fenotípicos e pela análise do perfil de restrição do produto da amplificação de 440 pares de base do gene *hsp65*. Em oito subcultivos foi encontrada a espécie *M. tuberculosis* associada com MNT, em 3 subcultivos foram encontradas 2 espécies de MNT e nos demais foi identificado apenas um tipo de micobactéria. O tempo de crescimento lento das micobactérias inviabiliza o plaqueamento de todas as culturas pois este procedimento acarretaria demora na liberação do resultado final dos testes, além de representar gastos excessivos em áreas endêmicas, geralmente com escassos recursos econômicos. Embora as dificuldades mencionadas, os microbiologistas devem estar atentos quanto à presença de culturas mistas de micobactérias e usar todos os métodos disponíveis para separar e identificar as espécies.

Palavras-Chave. cultura mista, micobactérias, *Mycobacterium tuberculosis*, micobactérias não tuberculosas.

ABSTRACT

Careful examination of occurrence of mixed mycobacterial cultures is important because most of them include at least one pathogenic agent. Among 8,036 mycobacterial cultures samples received between 1999 and 2000 at the Mycobacteria Laboratory of Instituto Adolfo Lutz, 21 (0.26%) classified as mixed cultures were selected for being investigated. For this, the use of 7H11 plate was included for colonies isolation. The isolated colonies were then subcultured into Lowenstein-Jensen media and incubated at 37°C. The isolates were identified by phenotypic tests and by PCR restriction enzyme analysis of *hsp65* gene. The analysis of those 21 mixed cultures showed the occurrence of *M. tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in eight samples, three cultures with two species of NTM, and ten with only one specie of mycobacteria. The results of this study suggest that microbiology technicians should be aware of mixed cultures and apply every practical method available to separate and to identify the involved mycobacteria species.

Key Words. mixed culture, mycobacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, non tuberculous mycobacteria

INTRODUÇÃO

As culturas mistas de micobactérias podem ocorrer após o processamento de um único espécime biológico, coletado de paciente com tuberculose cavitária e co-infectado com outra espécie de micobactéria. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de colonização ocasional por micobactérias ambientais ou mesmo contaminação cruzada dos espécimes biológicos durante os procedimentos de coleta ou técnico-laboratoriais¹⁻⁶.

A investigação da presença de culturas mistas é importante pois quando duas espécies de micobactérias estão presentes em um espécime biológico geralmente uma é patogênica ou potencialmente patogênica e a falha em identificá-la dificulta o diagnóstico do paciente. Contudo esta não é uma tarefa fácil e requer técnicos experientes capazes de reconhecer diferenças sutis na tentativa de separar culturas mistas sugeridas por resultados aberrantes em meios usados para os testes fenotípicos³. Nas culturas provenientes de pacientes infectados pelo HIV, as espécies do complexo *M. avium* e *M. kansasii*, que geralmente causam doença disseminada podem estar associadas com *M. tuberculosis*^{1,4,7,6}.

Diversos estudos internacionais têm relatado o isolamento de culturas mistas nos espécimes biológicos de pacientes com ou sem Aids. Tsukamura et al.⁸, após o estudo de 97 culturas de micobactérias isoladas de pacientes com tuberculose detectaram 11 (11,3%) culturas mistas com as espécies dos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium*. Young et al.⁶, ao estudar 104 culturas de micobactérias isoladas de pacientes com Aids detectaram a presença de seis (5,8%) culturas mistas com as espécies do complexo *M. avium*: cinco com *M. gordonae* e uma com *M. kansasii*. Kiehn e Cammarata⁴ caracterizaram infecção mista em dois pacientes com Aids após o isolamento de duas espécies de micobactérias, *M. tuberculosis* e *M. avium*, do sangue desses pacientes. Bogner et al.¹, analisaram 114 culturas de *M. avium* obtidas após o processamento de materiais biológicos de pacientes com Aids e infecção sistêmica, dentre estas 7 (6,14 %) eram culturas mistas com outra espécie de micobactéria e 1 (0,9 %) incluía *M. genavense* e *M. xenopi*. Em São Paulo, Silva et al.⁹, relataram a associação das espécies *M. tuberculosis* e *M. szulgai* em um paciente com tuberculose pulmonar.

O Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz (IAL) recebe culturas em meio sólido ou líquido, de diversos laboratórios do Estado de São Paulo, para a identificação da espécie e a determinação do perfil de suscetibilidade da espécie *M. tuberculosis* às drogas.

Para direcionamento aos testes adequados, as culturas em meio sólido são avaliadas quanto aos aspectos microscópicos: morfologia dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), formação de corda e macroscópicos: características das colônias, presença de pigmento^{10,11}. Geralmente as culturas em meio líquido são avaliadas apenas quanto ao aspecto microscópico no entanto, a avaliação do tipo de floculação que

se forma ou da presença de pigmento no sedimento pode ser útil.

Foi objetivo desse estudo avaliar a importância do isolamento de colônias e da identificação das espécies presentes em culturas de micobactérias de difícil elucidação, recebidas pelo Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz no período entre 1999 e 2000.

MATERIAL E MÉTODOS

O Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo examinou 8036 culturas entre 1999 e 2000. Dessas, 21 com resultados aberrantes nos testes fenotípicos, foram conservadas à -70°C em miçangas de vidro umedecidas com meio de Sauton adicionado de 10% de glicerol, para posterior elucidação¹².

Essas culturas foram feitas a partir de 18 escarros, dois gânglios e um sangue, colhidos de 19 pacientes. Treze culturas apresentaram aspectos macroscópicos e microscópicos de micobactérias não tuberculosas (MNT) e resultados inconclusivos quando submetidas aos testes fenotípicos. Oito culturas sugeriram a presença de *M. tuberculosis* e MNT por apresentarem crescimento de BAAR em meio de Löwenstein Jensen (LJ), com características morfológicas diferentes daqueles crescidos em meio de LJ adicionado de 500µg/ml de ácido ρ -nitrobenzóico.

Para esse estudo as culturas foram recuperadas a partir da inoculação das miçangas de vidro em meio Löwenstein Jensen, seguida de incubação à 37°C por 30 dias. Após o crescimento foi feita uma suspensão da bactéria em água destilada estéril, na turvação da escala 1 de McFarland. Essa suspensão foi semeada em placas com meio Middlebrook 7H11, com auxílio de uma alça de 10µl de modo a obter colônias isoladas. As placas foram incubadas à 37°C por 20 dias e observadas com auxílio de um estereoscópio para a análise quantitativa e qualitativa das colônias¹³.

As colônias isoladas foram subcultivadas em meio de Löwenstein Jensen e após o crescimento os repiques foram submetidos a 22 testes fenotípicos convencionalmente usados para identificação de espécies do gênero *Mycobacterium*^{8,10,14,15}. A identificação genotípica foi realizada pela análise do perfil de restrição do produto da amplificação de 440 pares de bases do gene *hsp65* (PRA) cuja natureza conservada permite a diferenciação das micobactérias¹⁶. Os oligonucleotídeos iniciadores da reação de amplificação foram Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT) e as enzimas utilizadas na digestão do produto foram *BstEII* e *HaeIII*.

RESULTADOS

Após a semeadura das 21 culturas, em meio de 7H11, onze placas mostraram dois tipos de colônias e dez apenas um

tipo. A Tabela 1 mostra a origem dos 32 subcultivos obtidos. As nove colônias rugosas foram identificadas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* pelos resultados de produção de niacina, redução do nitrato e inativação da catalase a 68°C. As 23 colônias lisas foram submetidas aos testes fenotípicos e os resultados constam da Tabela 2, bem como os resultados de identificação obtidos com a técnica de PRA.

DISCUSSÃO

O gênero *Mycobacterium* tem como característica o crescimento confluyente que dificulta o isolamento e a definição de mais de um tipo morfológico quando o espécime biológico é cultivado em meio sólido e o tempo de crescimento lento que inviabiliza o plaqueamento de todas as culturas.

A observação de 21 culturas mistas não reflete a freqüência real desta ocorrência em nosso laboratório pois essa busca não foi sistemática mas, mostra a importância da investigação detalhada de culturas mistas, já anteriormente relatada na literatura por Gross et al.³.

Entre 11 culturas com duas espécies bacterianas encontradas nesse estudo, oito (73%) incluíam a espécie *M. tuberculosis*. Esses resultados foram concordantes com os de outras publicações que relataram, na maioria das vezes, a presença de ao menos uma espécie de micobactéria patogênica ou potencialmente patogênica nas culturas mistas^{3,4,6,7,9}.

O isolamento de apenas um tipo de colônia nos subcultivos de dez culturas do estudo é sugestivo de que a outra espécie presente na cultura original não foi recuperada.

O subcultivo 20 apresentou resultado fenotípico inconclusivo. Foram realizados 22 testes, 20 apresentaram resultados compatíveis com o padrão de MAC mas, com hidrólise do tween e redução do nitrato sugestivos de *M. kansasii*. A cultura original foi identificada pelo PRA como *M. kansasii* mas o PRA do subcultivo apresentou apenas o perfil

de *M. avium* I. Esses resultados podem ser explicados pela extrema dificuldade em isolar unidades formadoras de colônias, mesmo entre espécies diferentes, por características de crescimento próprias do gênero.

Os subcultivos 6 e 16 originaram-se de culturas de escarros colhidos do mesmo paciente nos anos de 1999 e 2000. A cultura original mostrou perfil de MAC, exceto pela redução do nitrato que sugeriu a presença conjunta de outra espécie. A cultura original foi identificada pelo PRA como *M. tuberculosis* mas o PRA do subcultivo apresentou apenas o perfil *M. avium* I.

Os subcultivos 8 e 17 originaram-se respectivamente de culturas de escarro e sangue colhidos do mesmo paciente nos anos de 1999 e 2000. As culturas originais mostraram perfil fenotípico inconclusivo: perfil de MAC, exceto pela redução do nitrato que sugeriu a presença conjunta de outra espécie. O método de PRA mostrou a presença da espécie *M. tuberculosis*. Nos dois subcultivos os testes fenotípicos identificaram MAC e o método PRA confirmou a presença da espécie *M. avium* II. Como a presença de *M. avium* no sangue pode sugerir a presença de uma doença disseminada a elucidação imediata do diagnóstico teria sido importante para o estabelecimento de terapêutica adequada ao paciente⁷.

Os resultados obtidos, com os subcultivos 6,8,16,17 onde houve evidências da presença de *M. tuberculosis*, mostram a necessidade de um período de incubação prolongado das placas, mesmo após a visualização de colônias lisas, o que possibilitou o desenvolvimento de colônias a partir de espécies de crescimento mais lento.

Os resultados de identificação obtidos com as duas técnicas utilizadas nesse estudo, mostraram a utilidade da técnica de PRA na elucidação de resultados fenotípicos inconclusivos embora permaneça clara a preocupação com a dificuldade de isolamento de microrganismos com características de crescimento muito diferentes que podem aparecer em associação. Microrganismos capazes de

Tabela 1. Caracterização dos subcultivos originados do plaqueamento das 21 culturas recuperadas para elucidação da identificação das espécies do gênero *Mycobacterium*.

Espécime biológico	Culturas N=21					
	Subcultivos com dois tipos de colônias N=11			Subcultivos com um tipo de colônia N=10		
	L.Acromógena	L.Pigmentada	Rugosa	L.Acromógena	L.Pigmentada	Rugosa
Escarro	N=11 (1,2,3,7,9,11,12,13,18,19a/b)*	N=2 (3a,11a)*	N=7 (1a,2a,7a,9a,12a,13a,18a)*	N=6 (6,8,10,15,16,20)*	N=1 (21)*	N=1 (4)*
Gânglio	N=1 (5)*	-	N=1 (5a)*	N=1 (14)*	-	-
Sangue	-	-	-	N=1 (17)*	-	-

L=lisa, N= número, *=identificador dos subcultivos em placas

Tabela 2. Perfil fenotípico e resultado com a técnica de PRA das micobactérias não tuberculosas (MNT) identificadas após subcultivo de 21 culturas com resultado inicial de cultura mista. Instituto Adolfo Lutz 1999-2000.

Nº da Cepa	1,9,18	2,13	5	7,12	11	11a	3	3a	19	19a	6,14, 8,10, 15,16	20	21
Testes fenotípicos													
Crescimento à 26°C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento à 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento à 45°C	V	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Pigmento	A	A	A	A	A	E	A	E	A	A	A	A	E
Ácido pírico 0,2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito de sódio 0,2%	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicilato de Sódio 0,1%	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Cloreto de Sódio 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ácido p-nitro benzóico 500µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrazida do ácido 2 tifenol carboxílico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidroxi lamina 500µg/ml	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Isoniazida 10µg/ml	-**	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Rifampicina 25µg/ml	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Etambutol 5µg/ml	V	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Cicloserina 30 µg/ml	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Ciprofloxacina 5 µg/ml	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
p-aminosalicilato de sódio 2mg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ofloxacina 2,5 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NR
Arilsulfatase 3/15dias	V	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	V	-/+	-/+
Hidrólise do tween	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
β-galactosidase	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Redução do nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Identificação fenotípica	MAC	MAC	MAC	MAC	Mche	Mg	MAC	CLA	I	MAC	MAC	MAC	I
Identificação pelo PRA	MaII	MaI	MAC	MI	Mab	MgI	MaI	Mtri	I	MAC	MaI	MaII	MaI
													MgV

*cepa nº 14(-), ** cepa nº 18 (+), I=inconclusivo - =negativo, += positivo, V=variável, A=acromógena, E=escotocromógena, NR=não realizado, MAC=complexo M. avium, MaI=M. avium I, MaII=M. avium II, MI=M. intracellulare I (cepa 12) e IV (cepa 7), Mche=M. chelonae, Mab=M. abscessus, Mg=M. gordonae, Mtri=M. triviale, PRA=análise do perfil de restrição do produto da amplificação de 440 pares de base do gene hsp65, CLA= micobactéria de crescimento lento acromógena

crescimento mais rápido podem prejudicar a recuperação de outros com características mais lentas por consumo de nutrientes.

O método de PRA foi importante para identificar as espécies *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. abscessus* anteriormente relatadas respectivamente como complexos *M. avium* e *M. chelonae* e definir os padrões das espécies *M. avium* I e II e *M. gordonae* I e V. Foi também importante para a identificação do subcultivo 3a como *M. triviale* anteriormente relatado como micobactéria de crescimento lento escotocromógena.

CONCLUSÃO

O tempo de crescimento lento das micobactérias inviabiliza o plaqueamento de todas as culturas pois este procedimento acarretaria demora na liberação do resultado final dos testes, além de representar gastos excessivos em áreas endêmicas, geralmente com escassos recursos econômicos.

Embora as dificuldades mencionadas, os microbiologistas devem estar atentos quanto à presença de culturas mistas de micobactérias e usar todos os métodos disponíveis para separar e identificar as espécies.

RECOMENDAÇÕES

1. Semear em placas aquelas culturas com características de culturas mistas quando:
 - o exame microscópico dos bacilos álcool-ácido resistentes mostrar mais de um tipo morfológico
 - o exame macroscópico das culturas evidenciar mais de um tipo de colônia
 - os resultados dos testes fenotípicos forem aberrantes
 - o crescimento no meio de LJ for sugestivo de *M. tuberculosis* e no meio de LJ com 500 µg/ml de ácido p-nitrobenzólico for sugestivo de micobactérias não tuberculosas.
2. Quando no crescimento em placas forem observadas colônias de um só aspecto, é importante a reincubação por períodos mais longos, para que haja possibilidade do crescimento de outras cujo desenvolvimento seja mais lento.

REFERÊNCIAS

1. Bogner JR, Rüsç-Gerdes S, Mertenskötter T, Loch O, Emminger C, Baumgarten R, et al. Patterns of *Mycobacterium avium* culture and PCR positivity in immunodeficient HIV-infected patients: Progression from Localized to Systemic Disease. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 579-584.
2. De Smet KAL, Hellyer TJ, Khan AW, Brown IN, Ivanyi J. Genetic and serovar typing of clinical isolates of the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Tubercle Lung Dis* 1996; 77: 71-6.
3. Gross WM, Hawkins JE. Mixed micobacterial cultures. *Clin Microbiol Newsletter* 1990, 12(3): 20-3
4. Kiehn TE, Cammarata R. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 708-11.
5. Tsukamura M, Mizuno S, Murata H. Occurrence of *Mycobacterium tuberculosis* and strains of the *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex together in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Tubercle* 1981; 62: 43-6.
6. Young LS, Inderleid CB, Berlin O George, Gottlieb MS. Mycobacterial infections in AIDS patients with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 1024-33.
7. Suzuki K, Kimoto T, Tsuyugushi K, Matsumoto H, Niimi A, Tanaka E, et al. Modification of results of drug susceptibility tests by coexistence of *Mycobacterium avium* complex with *Mycobacterium tuberculosis* in a sputum sample: case report and experimental considerations. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (9): 2745-7.
8. Tsukamura M. Identification of mycobacteria. *Tubercle* 1967; 48:311-8.
9. Silva EAM, Telles MAS, Fragetti MC Associação de tuberculose e micobacteriose pulmonar: relato de um caso. *J Pneumol* 1989; 15:220-2.
10. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology - A guide for level III Laboratory. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985 (publication n° 86-216546)
11. Monteiro PHT, Martins MC, Ueki SYM, Giampaglia CMS, Telles MAS. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Brasilian J Microbiol* 2003; 34: 171-4.
12. Watanabe AH, Credidio RA, Giampaglia CMS, Martins MC, Ferrazoli L, et al. Viabilidade das cepas de micobactérias conservadas à temperatura ambiente e à -70°C. *Bol Inst Adolfo Lutz* 2003; 13(2): 24-5.
13. Blanco RM, Inumaru VTG, Martins MC, Giampaglia CMS, Ueki SYM, Chimara E, et al. Estratégias para a identificação de espécies do complexo *M. fortuitum*. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002; 61(2): 23-8.
14. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis Bacteriology. Organization and Practice 2nd ed. London, England: Butterworth Heinemann; 1997.
15. 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.
16. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175-8.