

MICOBACTÉRIAS

Dilitor Vladimir Araujo
Opromolla Ida Maria
Foschiani Dias Baptista

Introdução

As micobactérias pertencem a ordem *Actinomycetales* e a família *Mycobacteriaceae*, que possui um único gênero, denominado *Mycobacterium* (*fungus bacterium*), nome proposto por Lehmann e Neumann em 1896, em referência à película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos que era similar a produzida por alguns fungos.

Apresentam-se como bacilos retos ou levemente curvados, com 1 - 4mm de comprimento por 0,3 - 0,6mm de largura. Algumas vezes, podem apresentar-se na forma cocobacilar ou filamentosa, variando de espécie para espécie. Por exemplo, as células do *Mycobacterium xenopi* são muitas vezes filamentosas e as do *Mycobacterium avium* são quase que freqüentemente cocóides. São, de maneira geral, bacilos imóveis, não esporulados, aeróbios ou microaerófilos, sendo, sua principal característica, a capacidade de resistir à descoloração quando tratadas com álcool-ácido.

Demonstrada pelo método de Ziehl-Neelsen, a álcool-ácido resistência é baseada no fato de que as micobactérias, quando tratadas pela fucsina fenicada, resistem à descoloração subsequente por uma solução de álcool-ácido, permanecendo coradas em vermelho.

A álcool-ácido resistência é uma propriedade do organismo intacto, como também de sua estrutura química, particularmente de seu conteúdo em ácido micólico. Algumas micobactérias, tais como o bacilo da tuberculose, contêm mais ácido micólico do que as espécies saprofitas e isso pode justificar o fato de eles serem mais fortemente ácido resistentes.

A integridade física da parede celular é também essencial à ácido resistência, pois esta propriedade se perde quando ocorre a desintegração bacteriana, apesar de não haver destruição do ácido micólico, sugerindo que a resistência à descoloração depende de uma membrana semi-permeável da parede da célula bacteriana. Esta membrana permitiria a difusão da fucsina nas células, mas não permitiria a saída da fucsina ácida.

A estrutura química das micobactérias tem sido intensamente estudada e comparada. O conteúdo de lípidos totais é maior nos bacilos da tuberculose humana e mais baixo nos bacilos álcool-ácido resistentes saprofitas, ao passo que o reverso é o caso para o componente polissacarídeo. Os ácidos gordurosos saturados do bacilo da tuberculose humana contêm ácido fitoióico, enquanto aqueles das outras micobactérias contêm ácido tubérculo-esteárico. A hidrólise de ceras do bacilo do tipo humano produz ácido micólico, enquanto o resultado da hidrólise de ceras de outras micobactérias são hidróxido-ácidos análogos, também ácido resistentes e pertencentes às séries do ácido micólico.

Foram registradas diferenças entre as proteínas complexas dos bacilos álcool-ácido resistentes saprofitas e as dos bacilos da tuberculose dos mamíferos e aviário. No mínimo, três componentes

antigênicos foram encontrados nas proteínas isoladas do bacilo tipo humano e a fração protéica, aparentemente responsável pela reação tuberculínica, foi estiolada em um peso molecular de 10.500. É provável que o componente protéico da micobactérias esteja situado profundamente nas células e os componentes polissacarídico e fosfatídico mais superficialmente.

Esforços foram feitos para relacionar as várias frações químicas das micobactérias com os tipos específicos de reações teciduais em animais. Os componentes polissacarídicos e lipídicos promovem a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares e a fração lipídica produziria a reação histiocítica. Os fosfatídeos levam à formação dos tubérculos e de células gigantes, às vezes com caseificação, enquanto a fração cética dos bacilos álcool-ácido resistentes saprofitas está particularmente associada a uma resposta fibroblástica, parecendo que as proteínas podem dar lugar a qualquer das reações acima.

A patogenicidade do bacilo da tuberculose tem sido relacionada a compostos químicos localizados em sua parede celular, um deles seria o **dimicolato de trealose**, um componente lipídico tóxico, conhecido como "fator corda", mas não existem evidências definitivas, pois tem sido encontrado em outras espécies micobacterianas patogênicas e não patogênicas. Outro composto químico seriam os **sulfolípidos** que em culturas de macrófagos foram encontrados inibindo a função microbicida normal pela inibição da fusão do fagossoma-lisossoma. E, finalmente, os micosídeos que seriam responsáveis pela formação da "zona elétron transparente" (ETZ) ou cápsula que protegeria a bactéria contra propriedades microbicidas dos macrófagos dos hospedeiros.

Os micosídeos são compostos por duas classes principais:
1 - Peptidoglicolípidios (micosídeo C): contêm ácido micoserósico, açúcar e aminoácidos e estão amplamente distribuídos por todo o gênero *Mycobacterium*.

2 - Glicolípido fenólico: foram isolados de *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium marinum* e são chamados micosídeos A, B e G respectivamente. Grande quantidade de glicolípido fenólico foi isolado do *Mycobacterium leprae* e parece que o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) seja específico para este organismo.

Panorama Histórico

O bacilo da hanseníase, descrito por Hansen em 1874, foi a primeira bactéria relacionada a uma doença humana. Em 1882, Koch isolou o bacilo da tuberculose dos mamíferos e, nos anos seguintes, os tipos humano e bovinos foram diferenciados. Nos anos de 1889 e 1890, foram descritos tumores viscerais em cobras do gênero "Boa", nas quais foram detectados bacilos álcool-ácido resistentes.

Em 1897, Batallion, Dubard e Terre isolaram, pela primeira vez, bacilos ácido resistentes de animais de sangue frio doentes. Eles relataram a observação de um tumor do tamanho de um ovo de pomba, situado no abdômen de uma carpa e que não era caracteristicamen-

te tuberculoso visto a olho não ou no microscópio. Mas, de qualquer forma, relacionava-se em um ou dois aspectos, com a tuberculose, pois continha células gigantes coradas apropriadamente e estas células continham numerosas bactérias ácido resistentes que pareciam exatamente com o bacilo da tuberculose. Os autores cultivaram estes bacilos e verificaram que suas características biológicas eram diferentes do verdadeiro bacilo da tuberculose, pois os bacilos da carpa cresciam muito mais rápido do que os bacilos da tuberculose nos meios padrão e se desenvolviam em temperaturas que eram desfavoráveis ao bacilo da tuberculose. Em temperatura ambiente, desenvolviam-se muito melhor, mas, com cuidado, as bactérias poderiam ser "treinadas" a desenvolver-se lentamente na temperatura do corpo. Quando isto aconteceu, elas adquiriram algumas propriedades que eram muito peculiares ao bacilo da tuberculose.

Logo depois que o bacilo da tuberculose foi descoberto e os métodos de examinar material infectado tomaram-se comuns, muitos pesquisadores, naturalmente, empenharam-se no trabalho de descobrir onde se encontrava o bacilo da tuberculose, isto é, onde era seu habitat.

Uma série de materiais foram examinados, como por exemplo, a manteiga, leite e até mesmo esterco de gado, e neles foram descobertos bacilos ácido resistentes.

Por volta de 1884, Sigmund Lutsgarten, que estava em Viena e que mais tarde foi para Nova Iorque para tomar o seu lugar como eminente sifilgrafo e dermatologista, espantou o mundo anunciando que tinha descoberto o bacilo da sífilis e que este era do tipo ácido resistente, semelhante ao bacilo da tuberculose, e ocorria nas lesões da sífilis e em mais nenhuma outra condição. No ano seguinte, Alvarez e Tavel provaram que o bacilo de Lutsgarten ocorria em muitas pessoas saudáveis e que não tinha nada a ver com a sífilis, tratava-se de uma forma acido resistente, não patognica, que ficou conhecida com o nome de bacilo do esmgma.

Em 1898, o médico Alfred Moeller relatou ter isolado bacilos ácido resistentes de várias plantas, em particular no capim "rabo de rato" (*timoly grass*), que não se desenvolviam inteiramente como o bacilo da tuberculose, pois cresciam muito mais rápido e desenvolviam-se muito bem em temperatura mais baixa do que àquela do corpo. Quando inoculados em cobaias em quantidades pequenas, não originavam lesões progressivas, contudo, quando injetados em grandes quantidades no abdmen desses animais, eles morriam entre 6 a 8 semanas. Quando estes microrganismos foram cultivados por várias geraes não se tornavam mais patognicos para os animais de laboratório. Na opinião de Moeller, o *Tymothi bacillus* tinha que ser considerado uma forma ácido resistente relacionada ao bacilo da tuberculose, mas com menor patogenicidade, e em condições naturais inócuo para o homem e animais superiores.

Em 1902 e 1903, Fridman relatou ter achado tuberculose espontânea nos pulmões de duas trutas do mar que morreram num aquário em Berlim e achou estes bacilos distintos do bacilo da carpa de Dubard. Eram bacilos ácido resistentes que em tamanho, forma e disposição não podiam ser distinguidos do bacilo da tuberculose. Ele

cultivou-os e verificou que se relacionavam muito com o bacilo da tuberculose, mas devido ao fato de ter se desenvolvido em trutas tinham sofrido alterações importantes.

Em 1904, Rupperecht descreveu uma outra forma de bacilo ácido resistente isolado de um animal de sangue frio. Num sapo encontrou tubérculos e neles bacilos ácido resistentes, mas de uma ácido resistência menos acentuada do que a do bacilo descrito por Dubard e Fridman, por isso considerou-os como variedade diferentes.

Em 1926, Aronson descreveu e nominou o *Mycobacterium marinum* como o causador de uma doença em peixes de água salgada num aquário da Filadélfia. Ele descreveu que as colnias assumiam a cor amarelo limão e, mais tarde, tornavam-se intensamente laranja.

Costa Cruz, em 1938, descreveu e nominou o *Mycobacterium forluitum* e Freeman relatou o caso de 2 mulheres com abscessos superficiais. Foram realizados cultivos nos quais observou-se bacilos ácido resistentes de crescimento rápido.

Em 1943, (*Mycobacterium avium*) foi reconhecido como patógeno humano. No ano de 1948, foi publicado uma série de 4 casos descritos de uma nova doença micobacteriana no homem e o bacilo causador denominado *Mycobacterium ulcerans*. Em 1951, caso de doença disseminada atribuída a um bacilo ácido resistente denominado *Mycobacterium intracellulare*.

Tarshis e Frish, em 1952, denominaram o *Mycobacterium abscessus* e, em 1953 e 1954, Buhler e Pollak publicaram uma avaliação de 2 casos de doenças por " bacilos amarelos" e o denominaram corra) *Mycobacterium transsylvanica*. Ainda em 1954, Linell e Norden descreveram o *Mycobacterium balnei*.

Atualmente, o gnero *Mycobacterium* conta com mais de 60 espécies reconhecidas, dentre as quais, pelo menos 22, estão descritas como agente etiológico de doenças no homem e nos animais.

Classificação das Micobactérias

Em 1980, conheciam-se 41 espécies pertencentes ao gnero *Mycobacterium*; em 1985, esse número se elevou a 54 e, atualmente, o gnero conta com mais de 60 espécies reconhecidas.

Com base em diferenças laboratoriais, Timple e Runyon formularam uma classificação para as micobactérias, de acordo com a velocidade de crescimento e a capacidade em produzir pigmentos em meio de cultura.

As micobactérias foram divididas em quatro grupos: Grupo I: estão includidas as micobactérias de crescimento lento. Produzem colnias com pigmentação de cor amarelada, quando expostas à luz. São, por isso, denominadas "**fotocromgenas**", incluindo-se nesse grupo *M. kansasii*, *M. simiae* e *M. marinum*.

Grupo II: micobactérias de crescimento lento, que também produzem colônias com pigmentação de cor amarelada, porém, independente de exposição à luz. São denominadas "escotocromógenas", sendo representantes desse grupo *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens* *livescens* e *M. xenopi*.

Grupo III: micobactérias de crescimento lento, que podem produzir pequena ou nenhuma pigmentação, mesmo quando expostas à luz intensa. São denominadas acromógenas, sendo representantes desse grupo o complexo *M. avium-intracellulare*, *M. terrae*, *M. triviale* e *M. gastri*.

Grupo IV: micobactérias de crescimento rápido (três a sete dias) que podem apresentar ou não pigmentação, sendo representante desse grupo o complexo *M. fortuitum-chelonae*.

É importante salientar que a classificação de Runyon tem muita utilidade quanto ao aspecto microbiológico, não tendo o mesmo valor quando se leva em consideração aspectos clínicos epidemiológicos, uma vez que se associam, em um mesmo grupo, espécies reconhecidamente patogênicas ao homem e outras não patogênicas.

Atualmente, tem se proposto um esquema de classificação alternativo, baseado no potencial patogênico da espécie.

De acordo com o grau de patogenicidade, as micobactérias são divididas em três grupos:

1 - Estritamente patogênicas ou patógenos estritos: *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. africanum*

2 Potencialmente patogênicas: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. haemophilum*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. malmoense*, *M. asiaticum*, *M. shimoidi*, *M. celatum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *peregrinum*, *abscessum*, *M. szulgai*, *M. marinum*.

3 - Raramente patogênicas: *M. thermoresistibile*, *M. gordonae*, *M. triviale*, *M. gastri*, *M. terrae*, *M. flavescens* e outras.

Diagnóstico laboratorial

4.1 - Exame Microscópico

A baciloscopia é considerada o procedimento mais rápido e fácil permitindo ao laboratório detectar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). É menos sensível que a cultura, pois para que haja visualização de BAAR nos esfregaços realizados a partir de espécimes de origem pulmonar é necessário que se tenha de 5.000 a 10.000 bacilos/ml da amostra.

É também utilizada quando se deseja confirmar a presença de BAAR no crescimento de culturas em meio sólido.

4.2 - Cultura

O diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar e outras micobacterioses depende da detecção e isolamento de BAAR a partir de espécimes clínicos de origem pulmonar e extrapulmonar, podendo ser contaminados (escarro, lavado gástrico, urina) ou estéreis (liquor, sangue, líquido pleural, medula óssea).

O meio mais utilizado para o isolamento de micobactérias é o Lowenstein-Jensen, que é um meio solidificado à base de ovo que contém glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio. Outros meios solidificados à base de ágar, como o 7H10 e 7H11 de Middlebrook, também podem ser utilizados.

Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente, novos métodos de cultura, pois a ênfase no laboratório clínico tem sido o desenvolvimento de sistemas mais rápidos e sensíveis para o isolamento de micobactérias, que no futuro, irão substituir os processos longos e tediosos da cultura em meios sólidos.

A seguir, selecionamos alguns exemplos desses novos sistemas:

1 - Método radiométrico (Bactec): trata-se de um aparelho semi-automatizado que detecta CO₂ radioativo liberado pela utilização de ácido palmítico, presente no meio de cultura (12 A e 12 B) pela micobactéria.

2 - Mycobacteria growth indicator tube (MGIT): sistema manual que detecta o crescimento das micobactérias em dias. Materiais clínicos concentrados são inoculados em um tubo que contém caldo Middlebrook 7H9 com um sensor fluorescente sensível ao oxigênio (ruthenium) para o crescimento micobacteriano.

3 - Sept-check AFB: sistema bifásico, contendo meio sólido (Lowenstein-Jensen) e um meio líquido (Middlebrook 7H9). Este sistema combina as vantagens oferecidas pelo meio sólido, que é a capacidade de observar colônias com relação a sua morfologia e a produção de pigmento, com o aumento de isolamento esperado com o meio em caldo.

4.3 - Identificação das Micobactérias

As micobactérias são identificadas por suas características morfológicas, velocidade de crescimento em meios de cultura apropriados, capacidade de crescimento em meios de cultura contendo inibidores, morfologia colonial, pigmentação e reações bioquímicas e enzimáticas. A seguir, serão descritos testes para identificação das micobactérias

4.3.1 - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

- Produção de niacina
- Redução de nitrato
- Susceptibilidade ao ácido p-nitrobenzóico (PNB)
- Resistência à hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico (TCH)

4.3.2 - Micobactérias outras que não o *M. tuberculosis* (MOTT) características culturais: tempo de crescimento, relações térmicas e pigmentação.

- inibição do crescimento frente às drogas: cicloserina, etambutol, rifampicina, p-ami nosalicilato de sódio, hidroxalamina, ciprofloxacina, cloreto de sódio, salicilato de sódio e outras.
- características bioquímicas e enzimáticas: redução do nitrato, hidrólise do Tween 80, atividade ureásica, atividade catalásica, captação de ferro, arilsulfatase 3 e 15 dias, b-galactosidase e outras.

4.3.3-Técnicas de biologia molecular em micobacteriologia

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e biotecnologia tem alterado profundamente a medicina moderna. Nos últimos anos, a análise de nucleotídeos específicos tem se mostrado de grande valia no diagnóstico de doenças genéticas, infecciosas, neoplásicas e causadas por bactérias.

As culturas de micobactérias podem ser identificadas com sondas de DNA específicas para cada espécie. As sondas são baseadas no princípio de complementaridade das fitas de DNA, que se ligam para formar uma dupla fita. A amplificação de ácido nucléico *in vitro*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), também, tornou-se uma das mais potentes e versáteis técnicas utilizadas em pesquisa na atualidade.

A técnica de PCR é um método baseado na amplificação enzimática de um fragmento de DNA pela extensão de dois oligonucleotídeos (*primers*), que hibridizam com fita complementares de uma seqüência molde (alvo). É um método bastante rápido em vista dos outros, pois utiliza no máximo 10 horas para identificação.

Micobactérias que não crescem em meios artificiais

Mycobacterium leprae

Agente causador da hanseníase e ainda não cultivado *in vitro*, tornando-se um grande desafio aos microbiologistas. Nos tecidos humanos, apresentam-se como bacilos retos ou levemente encurvados de 2 a 8 mm de comprimento. Podem apresentar-se isolados, mas, quando muito numerosos, têm a tendência a disporem-se em feixes paralelos ou a formarem grandes aglomerações, denominadas globias.

Mycobacterium lepraemurium

Descrita por Stefanskv em 1903, esta micobactéria provoca a lepra merina. É uma infecção que ocorre em roedores e foi descrita em alguns países da Europa, nos Estados Unidos e no Japão. É muito contagiosa e o rato transmite a doença pela mordedura e pode assumir uma forma ganglionar ou uma forma chamada músculo- cutânea, sendo muito estudada com o intuito de se extrapolar os resultados conseguidos para a hanseníase humana. Apesar de estar incluída neste grupo, hoje em dia, têm sido descritos meios de cultivo para esta micobactéria.

Micobactéria que causa uma " pseudo " tuberculose cutânea em gado

Apresenta muita semelhança com a tuberculose, ocorrendo nos Estados Unidos e na Europa Ocidental, inclusive na Inglaterra. As lesões constituem-se de um nódulo único ou, às vezes, vinte ou mais nódulos no mesmo animal, envolvendo o derma, mas na maioria das vezes eles ocorrem subcutaneamente. Frequentemente as lesões localizam-se nas faces laterais das coxas; no abdome e nas faces laterais das articulações tarsais; e, menos frequentemente, localizam-se no pescoço e ombros.

O agente causador; provavelmente, entra pela pele, depois de um traumatismo e, se as condições forem favoráveis, desenvolve-se lentamente uma reação granulomatosa progressiva. A lesão pode, com frequência, amolecer e ulcerar; podendo progredir para cura. O caráter tuberculóide das lesões, a presença de bacilos álcool-ácido resistentes e o fato de que os animais afetados com frequência reagem à tuberculina, sugerem uma infecção semelhante às infecções produzidas pelo bacilo da tuberculose. Apesar das micobactérias serem observadas frequentemente nas lesões, o seu cultivo não foi conseguido.

Micobactéria causadora da "lepra bubalorum"

É uma doença granulomatosa da pele do búfalo d'água. Foram observados casos na Indonésia, e descritos pela primeira vez em 1926 por Kok e Roseli. O aspecto mais notável da doença é a ocorrência de numerosos nódulos duros na pele, de tamanhos variáveis, com tendência a ulcerarem. Os lugares de predileção são as pernas, a face lateral e ventral do tórax e abdômen, o nariz e mucosa nasal. O curso da doença é crônico e as lesões podem regredir.

As características bacteriológicas são o aparecimento de grande número de bacilos ácido resistentes nas lesões da pele que se dispõem em grupos formando glóbulos.

Micobactéria causadora de infecção no pombo torca (*wood pigeon*) .

Foi descrita na Dinamarca, em 1946, uma infecção micobacteriana no pombo torca *Columba palumbos*. Doença que tem predileção pelo fígado e baço dessa ave e a reação tissular vista nesses órgãos assemelha-se àquela observada na tuberculose das aves. É um processo destrutivo e o aspecto mais notável é o grande número de bacilos ácido resistentes dentro das células epitelióides e células gigantes. Apesar de todas as tentativas, não se conseguiu o seu cultivo.

Considerações finais

Até recentemente, o interesse na micobacteriologia era estável. Com o aumento nas taxas de tuberculose e outras micobacterioses, este interesse foi revitalizado. A meta é que dentro de

Custos aceitáveis, os avanços Continuem a adicionar mais velocidade e precisão na detecção, identificação e nos testes de susceptibilidade das espécies micobacterianas.

BIBLIOGRAFIA

- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. *Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. 2.ed., Rio de Janeiro, 1994.
- DAVID, H. et al. *Manual de Micobacteriologia em Saúde Pública: princípios e métodos*. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 1994. 85p.
- EISENSTADT, J., HALL, G.S. Microbiology and classification of mycobacteria. *Clin. Dermatol.*, v.13, n.3, p.97-206, 1995.
- FELDMAN, W.H. Non-leprous and Non-tuberculous Mycobacterial Infections. In: COCHRANE, R.G. *Leprosy in Theory and Practice*. Bristol: John Wright, 1964.
- GRANGE, J.M. The Mycobacteria. In: TOPLEY and WILSON. *Principles of bacteriology, virology and immunity*. London, 1990. p.741-101.
- KRAUSE, A.K. The non-pathogenic acid-fast Bacilli - Their discovery and occurrence. *Int. J. Leprosy*, v.34, p.179-183, 1966.
- PORTAELS, F. Epidemiology of Mycobacterial Diseases. *Clin. Dermatol.*, v.13, n.3, p. 207-222, 1995.
- RIDDELL, R.W. The acid-fast bacteria. In: COCHRANE, K.G. *Leprosy in Theory and Practice*. Bristol: John Wright, 1964.
- SATO, D.N. Mycobacterium. In: SIM, C.H.P.M. *Bacteriologia – um texto ilustrado*. Rio de Janeiro: Eventos, 1999. p.285-315.
- TIMERMAN, A. Micobactérias não-tuberculosas e doenças associadas. In: VERONEZZI, R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 9ed. Rio de Janeiro, 1996.
- TSUKAMURA, M. *Identification of mycobacteria*. Mycobacteriosis Research Laboratory. S.l.p. National Chubu Hospital., 1984.
- WOLINSKY, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.*, v.119, n.1, p. 107-159, 1979.
- WOLINSKY, E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin. infect. Dis.*, v.15, n.1, p.1-10, 1992.
- WOODS, G. L., WASHINGTON, J. A Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev. infect. Dis.*, v. 9, n.2, p.275-294, 1987.