

Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica

Módulo VI

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Coleta de amostras	2
Amostras respiratórias	2
Sangue	2
Urina	3
Fezes.....	3
Biópsias ou amostras de tecido.....	3
Lavado gástrico.....	3
Outros materiais: medula óssea, líquido, líquido pleural	4
3. Processamento de amostras	5
Exame microscópico e coloração	5
Métodos para tratamento das amostras para cultura.....	7
4. Cultura para isolamento de micobactérias	10
Meios sólidos	10
Meios Líquidos	10
Controle de Qualidade.....	12
5. Identificação das diferentes espécies de micobactérias	14
Testes bioquímicos tradicionais.....	14
Testes automatizados e moleculares para identificação	20
6. Anexos	24
7. Referências Bibliográficas	27

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente preocupação mundial com a tuberculose, os laboratórios de Microbiologia têm sido cada vez mais exigidos em relação à rapidez do diagnóstico. Um número maior de amostras é processado no laboratório para realizar este diagnóstico, exigindo que medidas de segurança sejam tomadas e que os técnicos tenham um treinamento adequado nessas técnicas.

Uma variedade de técnicas está sendo implantada nos laboratórios para acelerar o diagnóstico, mas as técnicas convencionais ainda ocupam um espaço importante na rotina laboratorial.

Um importante evento mudou um pouco a visão do que era necessário para o diagnóstico em termos laboratoriais, que foi o aparecimento da AIDS. O perfil de sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis* passou a ter um papel extremamente importante para o clínico já que a sensibilidade às drogas tradicionais tinha sofrido algumas mudanças o que ocasionava sérias dificuldades no tratamento. Além do aparecimento de cepas multi-resistentes de *M. tuberculosis*, apareceram as infecções por outras espécies de micobactérias nestes pacientes, levando a quadros graves (como por exemplo *M. avium*).

Diante deste fato os laboratórios necessitam estar sempre atualizados. Nos capítulos adiante citamos alguns dos procedimentos mais utilizados para o diagnóstico das infecções por micobactérias.

Manipulação do material clínico

Uma parte importante que deve ser considerada pelo laboratório quando trabalhando com micobactérias, é a segurança empregada na manipulação do material clínico destas cepas. É grande o número de casos de técnicos infectados devido ao descaso dos laboratórios com a manipulação deste tipo de patógeno. Algumas medidas mínimas devem ser tomadas quando o laboratório vai no intuito de diagnosticar este agente.

Se o laboratório for realizar apenas a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes no material clínico, sem tratamento (laboratório Nível-1), as seguintes medidas devem ser observadas:

- Colocar na amostra clínica a mesma quantidade de hipoclorito de sódio a 5% e deixar 15 minutos a fim de inviabilizar os eventuais bacilos presentes na amostra. Centrifugar a amostra e do sedimento preparar as lâminas.
- Treinar os técnicos e orientar para os riscos da manipulação inadequada do material clínico.
- Utilizar luvas e aventais descartáveis.

Se o laboratório for realizar também a cultura, além da pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes no material clínico direto e após tratamento (Laboratório Nível 2), além das medidas já citadas, o laboratório deve :

- Processar todas as amostras em uma capela biológica classe I ou II que possuem filtros HEPA.
- Utilizar respiradores descartáveis (tipo N95).
- Limitar a entrada de pessoas na área reservada para a manipulação dos materiais.
- Treinamento dos técnicos nas técnicas de cultura e identificação de *M. tuberculosis*.

Se o laboratório for realizar todas as técnicas descritas acima e, além disso, for trabalhar com testes de avaliação da sensibilidade (Laboratório nível 3), deve possuir:

- uma área com ante-sala e uma sala separada onde as amostras são processadas e os testes de sensibilidade são realizados.
- um sistema de exaustão próprio que crie uma pressão negativa nas duas salas.
- uma autoclave deve ser instalada dentro desta área para que todo material seja autoclavado antes de deixar esta área.
- treinamento específico dos técnicos nas técnicas de cultura, identificação e testes de avaliação da sensibilidade das diferentes espécies de micobactérias.

2. COLETA DE AMOSTRAS

AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> - Usar um frasco estéril de boca larga com tampa de rosca. - De preferência, colher as amostras antes da administração de antibióticos, mas não excluir a coleta por causa do uso de antibióticos já que na maioria dos casos o paciente em tratamento para tuberculose não vai suspender a terapia para realizar o exame. - Orientar a coleta do primeiro escarro da manhã. Coletar a amostra após expectoração profunda e evitar colher saliva. - É recomendado um mínimo de 3 amostras de escarro em dias consecutivos. - Entregar instruções por escrito para uma coleta adequada da amostra. - Identificar (nome do paciente, data da coleta) as amostras após a coleta 	<ul style="list-style-type: none"> - Se a amostra não for processada dentro de 1 hora após a coleta, armazenar em geladeira (2 a 8°C) por até 24 horas. - Manter as amostras em geladeira até ter sido examinada por algum método de coloração. - Manter as amostras com exame direto positivo em geladeira para eventuais exames posteriores (no máximo 30 dias) 	<ul style="list-style-type: none"> - Amostras de escarro colhidas durante um período de 24 horas. Estas amostras possuem alta possibilidade de contaminação por outras bactérias e fungos o que prejudica o processamento correto da amostra. - Amostras que não estiverem devidamente identificadas - Amostras coletadas em frascos não estéreis e com conservantes. - Amostras enviadas em "swabs" de coleta 	<ul style="list-style-type: none"> - NALC-NaOH (NALC=N-Acetil-cisteína) - NaOH 4% - ácido oxálico - usado para materiais contaminados com <i>P. aeruginosa</i>.

SANGUE

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none"> - Seguir as orientações utilizadas no seu laboratório para a assepsia antes da coleta das amostras de sangue para cultura. - Coletar uma amostra de sangue e inocular diretamente meios de cultura apropriados ou no tubo isolator. 	<ul style="list-style-type: none"> - Não refrigerar as amostras. - Se utilizado o meio bactec 13^a, manter a amostra em estufa a 37°C. - Se forem utilizados os meios que serão lidos em aparelhos automatizados (bactec myco/f lytic, mb/bact), manter os frascos em temperatura ambiente após a coleta. - Se for utilizado o tubo isolator manter em temperatura ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Amostras colhidas com EDTA. - Amostras coaguladas. 	<ul style="list-style-type: none"> - As amostras não devem ser previamente tratadas, e sim inoculadas diretamente conforme especificações dos fabricantes de cada frasco. - Meios utilizados para detecção de micobactérias em amostras de sangue: Bactec 13A (BD) ¹ Bactec Myco/Lytic (BD) ¹ MB/BacT (Organon T.) ¹ Isolator (Wampole) ²

¹ Utilizar 5 ml de amostra de sangue ² Utilizar 10 ml de amostra de sangue

URINA

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Coletar a 1ª urina da manhã (mínimo 40 ml) após assepsia genital adequada com água e sabão- Coletar em um frasco estéril de boca larga com tampa de rosca.- É recomendado a coleta de 3 amostras em dias consecutivos	<ul style="list-style-type: none">- Se a amostra não for processada dentro de 3 hora após a coleta, armazenar em geladeira (2 a 8°C) por até 24 horas.	<ul style="list-style-type: none">- Urina colhida durante um período de 24 horas. O elevado número de microrganismos contaminantes presentes nestas amostras prejudica a descontaminação da amostra.- Amostras colhidas em frascos não estéreis.- As 3 amostras colhidas no mesmo dia em horários diferentes.	<ul style="list-style-type: none">- Colocar a urina em um tubo cônico estéril com tampa de rosca e centrifugar a 3000 xg por 15 min.- Desprezar o sobrenadante e tratar a amostra com NALC-NaOH ou NaOH 4%, conforme descrito no anexo A.

FEZES *

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Coletar em frascos de boca larga sem conservantes.	<ul style="list-style-type: none">- Manter as amostras em geladeira até o processamento.	<ul style="list-style-type: none">- Amostras congeladas.	<ul style="list-style-type: none">- Suspender 1 g de fezes em 5 ml de middlebrook 7h9.- Agitar vigorosamente e tratar pelo método de NaOH 4%.

* Apenas as amostras com pesquisa positiva deveriam ser processadas para cultura.

BIÓPSIAS OU AMOSTRAS DE TECIDO *

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Enviar a amostra em tubo estéril sem conservante ou fixador, com um pouco de solução salina estéril.	<ul style="list-style-type: none">- Processar a amostra assim que for recebida no laboratório.- Manter o material depois de processado na geladeira.	<ul style="list-style-type: none">- Amostras colhidas em "swabs".- Amostras colhidas em formol.	<ul style="list-style-type: none">- Macerar o material com pistilo estéril dentro do próprio tubo cônico ou em um cadinho estéril adicionando caldo 7H9.- Tratar a amostra pelo método NALC-NaOH ou NaOH 4% e proceder conforme descrito no anexo A.

* Temperaturas diferentes devem ser usadas para incubar os meios inoculados com amostras de pele.

LAVADO GÁSTRICO

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Colher de 5 a 10 ml da amostra em um tubo estéril contendo 100 mg de carbonato de sódio.- Realizar a coleta de manhã em jejum.- Usar salina estéril para a coleta.	<ul style="list-style-type: none">- Manter as amostras em geladeira até serem processadas.- Se na amostra não for adicionado carbonato de sódio esta deve ser processada dentro de 4 horas após a coleta.	<ul style="list-style-type: none">- Amostras colhidas sem carbonato de sódio.	<ul style="list-style-type: none">- Se a amostra for muito mucóide, adicionar 50 a 100 mg de NALC- Centrifugar a 3000 xg por 15 min.- Suspender o sedimento em água destilada estéril e processar pelo método de NALC ou NaOH 4%.

OUTROS MATERIAIS: MEDULA ÓSSEA, LÍQUOR, LÍQUIDO PLEURAL

COLETA	ARMAZENAMENTO	AMOSTRAS REJEITADAS	TRATAMENTO
<ul style="list-style-type: none">- Coletar em tubos estéreis.- Os frascos utilizados para a cultura de sangue também podem ser usados.- Quanto maior o volume processado maior a possibilidade de se ter uma amostra positiva.	<ul style="list-style-type: none">- Manter a amostra na geladeira se não for processada dentro de 24 horas.- Manter as amostras na geladeira após o processamento, por vários dias em caso de haver contaminação da cultura.	<ul style="list-style-type: none">- Amostras enviadas em tubos não estéreis.- No caso de medula óssea, amostras colhidas sem anticoagulante.	<ul style="list-style-type: none">- Normalmente estas amostras não têm bactérias contaminantes, portanto não são tratadas previamente; são inoculadas diretamente nos meios de cultura.- Meios que podem ser usados para a coleta de amostras:<ul style="list-style-type: none">Bactec 13 ABactec Myco/F LyticMB/BacT *ESP Myco *

* Estes meios não podem ser utilizados para amostras de medula óssea

3. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

EXAME MICROSCÓPICO E COLORAÇÃO

- Todos as amostras clínicas, exceto sangue e medula óssea, devem ser examinadas por algum método de coloração, para a presença ou não de bacilos álcool-ácido resistentes.
- Preparar o esfregaço com no máximo 1 a 2 cm de diâmetro.

MÉTODOS DE COLORAÇÃO

Ziehl-Neelsen

Corantes	Procedimento	Resultado
<ul style="list-style-type: none">- <i>Fucsina</i><ul style="list-style-type: none">▪ dissolver 3 g de fucsina básica em 10 ml de etanol 90%-95%▪ adicionar 90 ml de uma solução aquosa de fenol a 5%- <i>Álcool-ácido</i><ul style="list-style-type: none">▪ adicionar 3 ml de HCl concentrado em 97 ml de etanol a 90%-95%.- <i>Azul de Metileno</i><ul style="list-style-type: none">▪ dissolver 0,3 g de cloreto de azul de metileno em 100 ml de água destilada	<ul style="list-style-type: none">- Fixar o esfregaço na lâmina, na chama do bico de bunsen.- Cobrir o esfregaço com a fucsina- Aquecer, sem deixar ferver, 3 a 4 vezes em um período de 5 min.- Lavar com água.- Descorar com o álcool-ácido até remover todo o corante - 2 min.- Cobrir o esfregaço com azul de metileno - 2 min.- Lavar com água.- Deixar a lâmina secar ao ar (se for usado papel de filtro para secar a lâmina, desprezar em lixo apropriado e usar um papel para cada lâmina).- Ler em microscópio óptico comum em objetiva de imersão de 100x.	<ul style="list-style-type: none">- Positivo: bacilos coram em rosa forte, outras bactérias e células coram em azul.- Negativo: não são observados bacilos em 300 campos examinados <p>A interpretação segue descrita na Tabela 1.</p>

Auramina

Corantes	Procedimento	Resultado
<ul style="list-style-type: none">- Auramina fenólica<ul style="list-style-type: none">▪ dissolver 0,1 g de auramina O em 10 ml de etanol 90%-95%▪ adicionar em uma solução de 3g de fenol em 87 ml de água destilada estéril (estocar a solução em frasco escuro)- Álcool-ácido<ul style="list-style-type: none">▪ adicionar 0,5 ml de HCl concentrado em 100 ml de álcool 70%- Permanganato de potássio<ul style="list-style-type: none">▪ dissolver 0,5g de permanganato de potássio em 100 ml de água destilada	<ul style="list-style-type: none">- Fixar a lâmina.- Cobrir o esfregaço com auramina e deixar por 15 min.- Lavar com água.- Descorar com álcool-ácido - 2 min.- Lavar com água.- Cobrir o esfregaço com permanganato de potássio - 2 min. e não mais que 4 min.- Lavar com água- Ler em microscópio de fluorescência com objetiva de 40x.	<ul style="list-style-type: none">- Positivo: bacilos coram em amarelo alaranjado em fundo escuro.- Negativo: não há presença de bacilos em 100 campos observados. <p>A interpretação segue descrita na Tabela 1.</p>

Kinyoun

Indicado para micobactérias, *Nocardia* spp. e outros bacilos Gram positivos ramificados que se coram fracamente pela coloração de Ziehl-Neelsen.

Corantes	Procedimento	Resultado *
- <i>Fucsina</i> <ul style="list-style-type: none">dissolver 4 g de fucsina básica em 20 ml de etanol 90%-95%adicionar 100 ml de uma solução aquosa de fenol a 5%	- Fixar o esfregaço na lâmina.	- Positivo: Bacilos coram em rosa forte, outras bactérias e células coram em azul.
- <i>Álcool-ácido</i> <ul style="list-style-type: none">adicionar 3 ml de HCl concentrado em 97 ml de etanol a 90%-95%.	- Cobrir o esfregaço com a fucsina - 5 min.	- Negativo: não são observados bacilos após a observação de 300 campos.
- <i>Azul de Metileno</i> <ul style="list-style-type: none">dissolver 0,3 g de cloreto de azul de metileno em 100 ml de água destilada	- Lavar com água.	A interpretação segue descrita na Tabela 1.
	- Descorar com álcool-ácido até remover todo o corante - 2 min.	
	- Cobrir o esfregaço com azul de metileno - 2 min.	
	- Lavar com água.	
	- Deixar a lâmina secar no ar (se for usado papel de filtro para secar a lâmina, desprezar em lixo apropriado e usar um papel para cada lâmina).	
	- Ler em microscópio óptico comum em objetiva de imersão de 100x.	

* Um resultado negativo no exame direto do material clínico não exclui a possibilidade de infecção por *M. tuberculosis*. A cultura é necessária para confirmação do diagnóstico.

Interpretação de resultados de pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes

Resultado	Número de microrganismos	
	Auramina objetiva 25x	Ziehl-Neelsen (Kinyoun) objetiva 100x
Negativo	0	0
Duvidoso, repetir a coloração	1-2/30 campos	1-2/300 campos
+ (raros)	1-9/10 campos	1-9/100 campos
++ (alguns)	1-9/campo	1-9 /10 campos
+++ (frequentes)	10-90/ campo	1-9/ campo
++++ (numerosos)	> 90/campo	> 9/campo

A sensibilidade dos métodos está em torno de 22 a 81%. Os métodos não possuem boa especificidade já que outros microrganismos que não micobactérias podem aparecer corados (ex: *Nocardia*, *Rhodococcus*, entre outros).

Se apenas 1 a 2 bacilos são observados em toda a lâmina este resultado não deve ser reportado antes de ser realizado uma outra lâmina. Se o resultado persistir ligar para o médico responsável pelo paciente para discutir o caso.

CONTROLE DE QUALIDADE

Lâminas positivas e negativas devem ser incluídas toda vez que se fizer a coloração e quando novos lotes de corantes são preparados.

- Controle negativo: *Escherichia coli*
- Controle positivo: *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177

MÉTODOS PARA TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA CULTURA.

Algumas amostras podem apresentar flora mista de bactérias e devem ser tratadas para minimizar o crescimento destes microrganismos contaminantes, que crescem mais rápido, impossibilitando o crescimento das micobactérias.

Materiais que devem ou não ser tratados antes de serem semeados nos meios apropriados

Material	Processado	Não processado
Escarro	x	
Lavado bronco-alveolar	x	
Líquor		x
Sangue		x
Pele	x	
Biópsias		x
Lavado gástrico	x	
Urina	x	
Fezes	x	
Medula óssea		x

N-ACETIL-L-CISTEINA/NAOH 2% (NALC-NAOH)

O NALC é um potente agente mucolítico e favorece a utilização de concentrações baixas do descontaminante sem prejudicar a recuperação de micobactérias. A desvantagem é que a solução deve ser preparada diariamente por que ela perde a atividade após 24 horas.

Reagentes	Procedimento
<ul style="list-style-type: none">- N-acetil-L-cisteína- Solução de NaOH/ citrato de sódio: volume 1/1 (autoclavar e estocar em frascos com tampa de rosca)- NaOH 4% (40 g pastilhas de NaOH em 1000mL de água destilada)- Citrato de sódio 0,1M (26 g de citrato de sódio (anidro) em 1000 ml de água destilada).- Tampão fosfato 0,067M, pH 6,8 (pode ser substituído por água)	<ul style="list-style-type: none">- Preparar a quantidade necessária da solução de NALC de acordo com a tabela 3.- Colocar 5 ml da amostra em um tubo cônico estéril com tampa de rosca de 50 ml.- Homogeneizar vigorosamente.- Deixar 15 - 20 minutos à temperatura ambiente.- Adicionar o mesmo volume de tampão fosfato.- Centrifugar a 3.000 xg por 15 minutos.- Desprezar o sobrenadante em frasco apropriado evitando ao máximo espirros do material. Limpar a borda do tubo com hipoclorito.- Ressuspender o sedimento com tampão fosfato; ressuspender com um volume suficiente para inocular os meios que serão utilizados.- Preparar lâminas para coloração.- Desprezar todo o material utilizado em lixo apropriado ou em frascos próprios contendo hipoclorito.

Preparação da solução para tratamento das amostras com N-acetil-L-cisteína

Volume (ml)	NaOH 4% / citrato de sódio	NALC
25 ml	12,5 ml / 12,5 ml	125 mg
50 ml	25 ml / 25 ml	250 mg
100 ml	50 ml/ 50 ml	500 mg
200 ml	100 ml/ 100 ml	1g
500 ml	250 ml/ 250 ml	2,5g
1000 ml	500mL/ 500 ml	5 g

NAOH 4% (PETROFF)

Esta solução tem atividade descontaminante e para ter atividade mucolítica deve ser usada em concentrações altas (4%). Nessa concentração o NaOH é tóxico para algumas micobactérias o que torna o tempo de exposição do material a esta substância crucial para se obter um bom resultado.

Reagentes	Procedimento
<ul style="list-style-type: none">- Solução de 2% ou 4% de NaOH (1N)- Tampão fosfato de 0,067 M , pH 6,8- Solução de HCl- Indicador vermelho de fenol- Água destilada estéril	<ul style="list-style-type: none">- Colocar 5 ml da amostra em um tubo cônico estéril com tampa de rosca de 50 ml.- Colocar o mesmo volume da solução de NaOH.- Homogeneizar vigorosamente.- Deixar 15 - 20 minutos à temperatura ambiente- Adicionar o mesmo volume de tampão fosfato (ou água).- Centrifugar a 3.000 xg por 15 minutos.- Desprezar o sobrenadante em frasco apropriado evitando a formação de aerossóis. Limpar o tubo com uma solução de hipoclorito.- Adicionar uma gota de vermelho de fenol no sedimento e adicionar aos poucos a solução de hcl até o indicador mudar de vermelho para amarelo.- Homogeneizar o sedimento.- Inocular a amostra no meio apropriado.- Preparar lâminas para coloração.- Desprezar todo o material utilizado em lixo apropriado ou em frascos próprios contendo hipoclorito.

ÁCIDO OXÁLICO

É o método de escolha para processar amostras contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa*.

Reagentes	Procedimento
<p><u>5% ácido oxálico</u></p> <p>ácido oxálico 50g água destilada 1000 ml</p> <ul style="list-style-type: none">- Dissolver o ácido em um pouco da água destilada- Completar para 1000 ml- Esterilizar a 121°C por 15 minutos- Estocar a temperatura ambiente	<ul style="list-style-type: none">- Adicionar um volume de 5% de ácido oxálico. equivalente ao da amostra em um tubo cônico de 50 ml.- Homogeneizar vigorosamente por 30 segundos.- Deixar a temperatura ambiente por 30 minutos agitando o tubo ocasionalmente.- Adicionar nacl 0,85% até a marca de 50 ml do frasco.- Inverter o tubo várias vezes para mistura.- Centrifugar por 15 a 20 minutos a 3000xg.

Vermelho de fenol

vermelho de fenol 8 mg
4% NaOH 20 m L
água destilada 1000 ml

- Dissolver o vermelho de fenol em 4% NaOH utilizando um agitador magnético; se necessário aquecer levemente
- Completar com 1000 ml de água destilada
- Estocar a temperatura ambiente

4% NaOH

NaOH 40g
água destilada 1000 ml

- Dissolver o NaOH em um pouco de água
- Manter o frasco resfriado para evitar aquecimento
- Completar para 1000 ml com água destilada. Esterilizar a 121°C por 15 min. Estocar a temperatura ambiente

NaCl 0.85% estéril

- Desprezar o sobrenadante.
- Adicionar ao sedimento algumas gotas de vermelho de fenol.
- Neutralizar o sedimento com 4% NaOH até obter uma cor rosa claro.
- Preparar as lâminas e semear nos meios apropriados.

4. CULTURA PARA ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS

MEIOS SÓLIDOS

LOWENSTEIN-JENSEN

a) Composição: ovos coagulados, verde malaquita, sais, glicerol, farinha de batata

b) Inoculação: 0,5 a 1,0 ml do material clínico

c) Incubação: 37°C em estufa com 5% a 10% de CO₂, na ausência de luz, com exceção de amostras de pele em que o meio deve ser incubado a 30°C, por até 8 semanas. Nas 2 primeiras semanas manter os tubos na posição horizontal com as tampas um pouco desrosqueadas, depois colocar na vertical e apertar as tampas.

d) Leituras: ler duas vezes durante as duas primeiras semanas (fazer a segunda leitura da primeira semana sempre com 7 dias exatos, já que é um parâmetro importante para a identificação posterior) e depois uma vez por semana até completar 8 semanas. Observar o pigmento da colônia.

- Se o meio estiver contaminado com outros microrganismos, desprezar o meio e preparar outra cultura se o material estiver ainda estocado.
- Descontaminar novamente o material antes de inocular no meio.

MIDDLEBROOK 7H10, 7H11

a) Composição: sais, vitaminas, cofatores, ácido oléico, albumina, catalase, glicerol, glicose (7H10), acrescido de hidrolizado de caseína (7H11)

b) Inoculação: semear 0,5 a 1,0mL do sedimento tratado na placa. Utilizar uma alça descartável para espalhar bem todo o material sobre a superfície da placa. Não utilizar a técnica normal de semeadura em placas, semear em todas as direções.

c) Incubação: a 37°C em estufa com 5% a 10% de CO₂ no escuro por até 8 semanas.

d) Leituras: ler duas vezes durante as duas primeiras semanas (fazer a segunda leitura da primeira semana sempre com 7 dias exatos, já que é um parâmetro importante para a identificação posterior) e depois uma vez por semana até completar 8 semanas.

- Os meios sólidos são importantes para observar amostras que possuem mais de um tipo de micobactéria.

MEIOS LÍQUIDOS

MIDDLEBROOK 7H9

a) Composição:

sais, vitaminas, cofatores, albumina, catalase, glicerol

b) Inoculação: inocular a amostra de biópsia ou fragmento de pele diretamente no meio

c) Incubação: incubar a 37°C em estufa contendo 5 a 10% de CO₂. Se forem inoculados fragmentos de pele no meio incubar um tubo a 37°C e outro a 30°C.

d) Leitura: examinar os tubos duas vezes durante as duas primeiras semanas e uma vez nas semanas

seguintes até completar 8 semanas.

BACTEC 12B

Antes de serem inoculados com amostras clínicas ou cepas bacterianas os frascos devem ser colocados no equipamento Bactec 460TB para que sejam inoculados com uma quantidade determinada de CO₂.

a) Composição (Middlebrook 7H12): caldo 7H9, albumina bovina, hidrolizado de caseína, catalase, substrato marcado com ¹⁴C(1μCi/ml).

b) Inoculação: inocular 0,5 ml do sedimento tratado pelo método de NALC, com uma seringa tipo insulina. Adicionar 0,1 ml de uma solução de antibióticos (PANTA, Becton Dickinson) nas amostras que podem apresentar alguma contaminação bacteriana.

c) Incubação: 37°C; amostras de tecidos ou fragmentos de pele devem ser incubados também a 30°C (preparar 2 frascos). Não é necessário incubar no escuro.

d) Leituras: ler 2 vezes nas duas primeiras semanas de incubação e uma vez nas semanas seguintes até completar 6 semanas. Frascos com índices de crescimento (GI) maior que 10 devem ser separadas e testadas diariamente.

- Frascos que apresentarem GI superiores a 10 devem ser considerados como suspeitos de serem positivos, quando o GI chegar a 50 preparar uma lâmina e corar pelo método de Ziehl-Neelsen.
- Algumas vezes pode ser difícil visualizar as micobactérias com um GI tão baixo; aguardar para fazer outra lâmina quando o frasco apresentar um GI maior.
- Algumas vezes o meio 12B não adere bem à lâmina e solta do esfregaço, adicionar uma gota de albumina na lâmina antes de colocar a gota do 12B para fixar o esfregaço.
- Se o frasco apresenta além de bacilos álcool-ácido outras bactérias, descontaminar a amostra diretamente do 12B removendo todo o conteúdo e processando pelo método de 4% de NaOH. Inocular o sedimento tratado novamente em um novo 12B.

BACTEC 13A

a) Composição (Middlebrook 7H13): caldo 7H9, albumina bovina, hidrolizado de caseína, catalase, substrato marcado com ¹⁴C(1μCi/ml), Tween 80, polianetolsulfonato de sódio (SPS).

b) Inoculação: colocar até 5 ml de sangue diretamente no frasco. Adicionar no laboratório 0,5 ml da solução de enriquecimento que vem junto com os frascos Bactec 13A.

c) Incubação: 37°C por até 6 semanas.

d) Leituras: ler os frascos duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar 6 semanas.

- Os frascos 13A não necessitam ser passados no Bactec 460 para colocar CO₂, pois estes já vem preparados com a quantidade certa de CO₂.

MGIT

a) Composição: caldo Middlebrook 7H9, sensor fluorescente embebido em silicone sensível ao oxigênio.

b) Inoculação: 0,5 ml do material tratado, adicionar 0,5 ml de OADC (acompanha o kit) e PANTA (solução de antibióticos, Becton Dickinson).

c) Incubação: 37°C.

d) Leituras: realizar a primeira leitura após 48 horas de incubação. Ler duas vezes nas duas primeiras

semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar 8 semanas. A leitura é feita com uma luz ultravioleta e a fluorescência emitida é comparada com um controle positivo e negativo.

- Amostras de sangue não devem ser colocadas neste meio.
- Existe disponível um equipamento automatizado (MGIT 960) que realiza as leituras automaticamente.

ESP Myco

a) Composição: caldo Middlebrook 7H9 e esponjas de celulose.

b) Inoculação: 0,5 ml da amostra clínica. São adicionados OADC e uma mistura de antibióticos (MycoPVNA).

c) Incubação: Os frascos são incubados no aparelho ESP Difco por um período de 6 semanas.

d) Leituras: O equipamento automatizado vai realizar as leituras continuamente e medir o consumo e produção de gases.

- Este sistema permite o processamento de qualquer amostra clínica inclusive sangue.

MB/BACT

a) Composição: Middlebrook 7H9, caseína pancreática digerida, catalase, albumina bovina.

b) Inoculação: 0,5 ml do material clínico tratado. Uma mistura de antibióticos é adicionada.

c) Incubação: 37°C no equipamento automatizado MB Bact/Alert por 6 semanas.

d) Leituras: os frascos são lidos automaticamente e constantemente pelo equipamento.

BACTEC MYCO LYTIC

a) Composição: caldo Middlebrook 7H9, sensor fluorescente sensível ao oxigênio.

b) Inoculação: 5 ml da amostra.

c) Incubação: 37°C no equipamento Bactec 9420 durante 42 dias

d) Leituras: o equipamento realiza as leituras e o monitoramento contínuo dos frascos.

- Estes frascos são apenas para processamento de amostras de sangue. Para amostras respiratórias o equipamento usado é o Bactec 9000MB e o frasco é o Myco/F.

CONTROLE DE QUALIDADE

Controle positivo: apresenta crescimento abundante no meio

- *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177
- *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950
- *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478
- *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841.
- *Mycobacterium scrofulaceum* ATCC 19981

Controle negativo: não apresenta crescimento no meio

- *Escherichia coli* ATCC 25922

Sugestão de meios de cultura, temperatura de incubação e método de processamento de diferentes amostras para isolamento de micobactérias.

Amostra	Inoculação direta	Tratamento da amostra	Meio para isolamento			Temperatura de incubação	
			Lowen Jensen	7H10/ 7H11	Outro	25 a 30°C	37°C
Sangue Medula óssea	X				Bactec 13A, Isolator, Bactec Myco/F Lytic, MB/BacT		X
Amostras respiratórias		X	X	X	Bactec 12B, ESP Myco/F Lytic, MGIT, MB/BacT		X
Líquidos	X		X	X	Bactec 12B, ESP Myco/F Lytic, MGIT, MBBacT		X
Líquor	X		X	X	Bactec 12B, ESP Myco/F Lytic, MGIT, MB/BacT		X
Tecidos Feridas/Úlceras de pele	X		X	X	Bactec 12B, MGIT, 7H9	X	X
Lavado gástrico		X	X	X	Bactec 12B, MGIT, ESP Myco/F Lytic, MB/BacT		X
Urina		X	X	X	Bactec 12B, ESP Myco/F Lytic, MGIT, MB/BacT		X
Fezes		X	X	X	7H11		X
Linfonodos	X		X	X	Meio suplementado com hemina		X

5. IDENTIFICAÇÃO DAS DIFERENTES ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS

TESTES BIOQUÍMICOS TRADICIONAIS

CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTO

As micobactérias podem ser separadas em grupos de acordo com, o **tempo de crescimento**, a **temperatura** ótima para que esse crescimento ocorra e a **produção de pigmento** quando exposta à luz.

Estas características podem ser observadas com uma cultura nova em Lowenstein Jensen (LJ), meio usado preferencialmente porque o contraste de cor é mais facilmente observado.

Crescimento

Definido como sendo o tempo necessário para colônias serem visualizadas a olho nú, em meio sólido.

- Micobactérias de crescimento rápido: < 7 dias
- Micobactérias de crescimento lento : > 7 dias

Estudos de crescimento devem ser feitos sempre com uma subcultura diluída para se obter um crescimento de colônias isoladas, nunca em culturas primárias, já que o processo de digestão e descontaminação pode ser muito acentuado levando micobactérias de crescimento rápido a crescerem em até 3 semanas.

<p>a) Meios:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Tubos ou Middlebrook 7H9 (caldo).▪ Lowenstein Jensen preparado em tubos com tampa de rosca.	<ul style="list-style-type: none">▪ Com uma pipeta Pasteur estéril transferir 6 gotas do inóculo diluído para 5 tubos de LJ (Lowenstein-Jensen). Distribuir o inóculo por todo o meio.▪ Cobrir 2 tubos com papel de alumínio.
<p>b) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Alças descartáveis estéreis▪ Pipeta Pasteur descartável▪ Papel de alumínio▪ Estufa de CO₂ 37°C▪ Estufa a 30°C e 45°C▪ Homogeneizador▪ Lâmpada 60W	<ul style="list-style-type: none">▪ Incubar, um tubo fechado e um aberto a 25°C (temperatura ambiente), um fechado e um aberto a 37°C. Um tubo deixar aberto a 45°C. Se o material processado for tecido ou material de pele incubar também a 30°C.▪ Manter todos os tubos com as tampas desrosqueadas.
<p>c) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Inocular uma alçada cheia de crescimento em um tubo com caldo 7H9.▪ Homogeneizar vigorosamente por 10 seg.▪ Fazer uma diluição 1:100 deste inóculo.	<p>d) Leituras:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Examinar os tubos após 5 e 7 dias de incubação. Verificar se tem crescimento e classificar conforme descrito na Tabela 5.

Considerar crescimento quando existem colônias bem formadas ou um crescimento confluyente. É importante fazer uma diluição do inóculo, para visualizar colônias isoladas.

Quantidade de crescimento no meio de LJ

Crescimento a 37°C	Quantidade de crescimento		
	1 semana	2 semanas	3 semanas
Rápido	+ a ++		
Intermediário	± a +	++	
Lento	0 a ±	+	++

0 - nenhuma colônia visível no meio

± - algumas poucas colônias muito pequenas ou uma pequena mancha de pigmento visível no meio

+ - várias colônias bem desenvolvidas ou uma fina camada confluyente visível de crescimento no meio, podendo ser visto o meio de LJ embaixo ou entre as colônias

++ - muitas colônias bem desenvolvidas formando uma camada grossa e confluyente de crescimento (colônias tocando umas nas outras ou próximas) sem que se possa ver o meio de LJ embaixo ou entre as colônias.

Pigmento

Variações na produção de pigmento levam a classificar as micobactérias em 3 grupos:

- **fotocromogênicas** - micobactérias que produzem pigmento somente após a exposição à luz.
- **scotocromogênicas** - micobactérias que produzem pigmento tanto no escuro quanto no claro.
- **não fotocromogênicas** - micobactérias que não produzem pigmento em qualquer situação.

a) Procedimento:	b) Resultado:
<ul style="list-style-type: none">▪ Quando houver crescimento no tubo descoberto retirar o papel de alumínio do tubo coberto e verificar se as colônias são pigmentadas.▪ Se não for observado pigmento expor à luz (lâmpada de 60W) por 3 horas (distância do tubo para a lâmpada deve ser de 20 a 25 cm) com a tampa desrosqueada▪ Incubar por mais 3 dias. Manter as tampas desrosqueadas.	<ul style="list-style-type: none">▪ Não pigmentada - cor creme▪ Pigmentada - cor amarelo, laranja claro, laranja <p>(não deve ser observada a intensidade da cor produzida e sim apenas se produz ou não pigmento).</p>

TEMPERATURA

- A temperatura de incubação geral é de 37°C.
- Incubar em diferentes temperaturas quando o material clínico for amostras de pele (25°C a 30°C).
- Algumas micobactérias (*M. xenopi*) crescem melhor quando incubadas 42°C.

TESTE DA CATALASE

A enzima catalase separa o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e o oxigênio aparece na forma de bolhas.

Quase todas as micobactérias produzem catalase, o que vai mudar é a quantidade de catalase produzida ou a perda ou não da capacidade de produzir catalase a 68°C.

Reagentes:10% Tween 80

- Aquecer o Tween 80 e 90 ml de água destilada estéril em banho 50°C.
- Pipetar 10 ml de Tween 80 aquecido nos 90 ml de água destilada estéril aquecida (lavar a pipeta várias vezes para retirar todo o Tween).
- Deixar o frasco no banho até dissolver todo o Tween 80.
- Estocar de 2 a 8°C.

10% Tween 80 / 30% H₂O₂ (solução de uso)

- Misturar partes iguais dos dois reagentes.
- Preparar no momento do uso (1,0 ml/teste).

Não deixar este reagente cair na pele. Em caso de acidente lavar com água corrente.

TESTE SEMI-QUANTITATIVO**a) Meios:**

- 7H9
- Lowenstein Jensen sem inclinação (tubos de 150 mm)

b) Materias e Equipamentos:

- alça descartável
- estufa 37°C
- régua

c) Procedimento:

- Inocular um caldo 7H9 com uma alçada cheia de micobactérias.
- Incubar por 7 dias a 37°C
- Homogeneizar vigorosamente por 10 segundos
- Inocular 0,1 ml do caldo com crescimento em um tubo de LJ preparado sem inclinação.
- Incubar a 37°C por 14 dias com as tampas desrosqueadas.

- Adicionar 1 ml do reagente preparado (Tween 80/H₂O₂) .
- Deixar a temperatura ambiente por 5 minutos e medir a altura das bolhas a partir da superfície do meio de cultura com uma régua.

d) Resultado:

- >45 mm - alta catalase (Ex: *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. simiae*, etc.)
- < 45mm - baixa catalase (Ex: *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. avium*, etc.)

e) Controles de Qualidade:

- Controle negativo: tubo de LJ não inoculado
- Controle Positivo:
 - catalase alta - *M. fortuitum* ATCC 6841
 - catalase baixa - *M. tuberculosis* ATCC 25177

TESTE A 68°C**a) Reagentes:**

- tampão fosfato (0,067M)

b) Materiais e Equipamentos:

- 2 tubos com tampa de rosca
- alça descartável
- banho maria 68°C

c) Procedimento:

- Inocular um tubo de tampa de rosca com 1,0 ml de tampão fosfato (0,067M) com uma alçada cheia de crescimento de micobactérias.

- Transferir 0,5 ml do inóculo para um segundo tubo de tampa de rosca.
- Incubar um tubo em banho maria a 68°C por 20 min e o outro a temperatura ambiente.
- Adicionar 0,5 ml da solução de Tween 80/H₂O₂ nos dois tubos.
- Deixar a temperatura ambiente por 20 minutos antes de ler. (Não agitar os tubos)

d) Controle de Qualidade:

- *M. tuberculosis* ATCC 25177 - forma bolhas a temperatura ambiente mas não a 68°C.
- *M. fortuitum* ATCC 6841- forma bolhas a temperatura ambiente e a 68°C.

TESTE DA URÉIA

Método Wayne

Teste utilizado para identificar as micobactérias que têm a capacidade de hidrolisar a uréia.

<p>a) Reagentes:</p> <p><u>Caldo Uréia</u></p> <ul style="list-style-type: none">Adicionar 10 g de Bacto Uréia ágar base concentrado (Difco) em 90 ml de H₂O destilada estéril.Homogeneizar bem.Colocar assepticamente 3 ml em tubos com tampa de rosca.Estocar de 2 a 8°C. (validade 1 mês)	<p>c) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none">Inocular o caldo uréia com uma alçada cheia de um crescimento de micobactérias.Homogeneizar.Incubar por 3 a 5 dias a 37°C (não passar de 5 dias para fazer a leitura).
<p>b) Materias e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none">alça descartávelestufa 37°C	<p>d) Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none">Positivo: rosa forte ou vermelhoNegativo: sem mudança de cor. Se ficar levemente rosado repetir o teste, se o resultado persistir, reportar como negativo.

Método Murphy-Hawkins

<p>a) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none">água estérilalça descartáveldisco de uréiavermelho de fenolestufa 37°Cvermelho de fenol	<p>c) Resultados:</p> <ul style="list-style-type: none">Positivo: rosa forteNegativo: laranja
<p>b) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none">Colocar um disco de uréia em um tubo contendo 0,5 ml de H₂O estéril.Inocular uma alçada cheia de micobactérias com 2 a 4 semanas de incubação no tubo contendo o disco de uréia.Incubar a 37°C por 3 dias.Pingar 1 gota de vermelho de fenol.	<p>d) Controle de Qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none">Positivo: <i>M. kansasii</i> ATCC 12478Negativo: <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950 ou um tubo apenas com meio

CRESCIMENTO EM ÁGAR MACCONKEY SEM CRISTAL VIOLETA

É um teste utilizado para diferenciar as diferentes espécies de micobactérias de crescimento rápido.

a) Meios:

- placa com meio de Mac Conkey sem cristal violeta
- caldo 7H9

b) Materiais e Equipamentos:

- alça descartável
- pipeta Pastuer descartável
- estufa 37°C
- estufa 30°C

c) Procedimento:

- Inocular em um tubo com 7H9 uma alçada do crescimento bacteriano.
- Incubar a 37°C por 1 semana.
- Inocular 3 a 4 gotas do inóculo do caldo 7H9 no ágar MC.
- Estriar a placa.
- Incubar a 28°- 30°C por 11 dias.

d) Resultado:

- Positivo: colônias nas estrias
- Negativo: sem crescimento

e) Controle de Qualidade:

- Controle Positivo: *M. fortuitum*
- Controle Negativo: *M. chelonae*

TESTE DA ARILSULFATASE

Verificar as micobactérias que em diferentes condições produzem a enzima arilsulfatase.

Teste de 3 dias

a) Meios:

- caldo de arilsulfatase (3 dias)

b) Reagentes:

- Na₂CO₃ 2N
- padrões de leitura

c) Materiais e Equipamentos:

- alça descartável
- vortex
- estufa 35°C
- estufa 45°C
- pipeta Pasteur descartável

d) Procedimento:

- Inocular um caldo de 3 dias de Arilsulfatase com uma alçada cheia de micobactérias de uma cultura de 2 a 4 semanas de crescimento.
- Homogeneizar.

- Incubar por 3 dias a 35 - 37°C para micobactérias de crescimento rápido (sem CO₂) e a 45°C quando a suspeita for de *M. xenopi*.
- Após 3 dias colocar 6 gotas de Na₂CO₃ 2N (não mais) com uma pipeta Pasteur.
- Ler comparando com os padrões.

e) Resultado:

- Positivo: produção imediata da cor pink ou vermelha. (Leitura equivalente a +++ do padrão)
- Negativo : incolor

f) Controle de qualidade:

- Positivo: *M. fortuitum*
- Negativo: caldo sem inocular

Teste de 2 semanas

<p>a) Meios:</p> <ul style="list-style-type: none"> caldo de arilsulfatase (2 semanas) <p>b) Reagentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> Na₂CO₃ 2N padrões de leitura <p>c) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> alça descartável vortex estufa 35°C estufa 45°C pipeta Pasteur descartável <p>d) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none"> Inocular o tubo de arilsulfatase de 2 semanas com uma alçada cheia de micobactérias de uma cultura de 2 a 4 semanas de crescimento. Homogeneizar. 	<ul style="list-style-type: none"> Incubar por 2 semanas a 37°C. Colocar 6 gotas de Na₂CO₃ 2N com uma pipeta Pasteur. Ler comparando com os padrões. <p>e) Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none"> Positivo: produção imediata de cor rosa forte ou vermelha. (Leitura equivalente a ++++ do padrão) Se o resultado for de +++ (borderline) repetir o teste. <p>f) Controle de qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> Positivo: <i>M. triviale</i> Negativo: caldo não inoculado ou caldo inoculado com <i>M. tuberculosis</i>.
--	---

TESTE DA REDUÇÃO DO TELURITO

Teste utilizado para verificar se a micobactéria reduz o telurito.

<p>a) Reagentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> telurito de potássio 0,2% <p>b) Meios:</p> <ul style="list-style-type: none"> caldo 7H9 (preparado em tubo de fundo arredondado) <p>c) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> alça descartável estufa 37°C escala de McFarland (4) pipeta Pasteur descartável vortex <p>d) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none"> Utilizar uma cultura com 3 a 4 semanas de crescimento. Inocular densamente um tubo de fundo arredondado com caldo 7H9. Homogeneizar bem. 	<ul style="list-style-type: none"> Incubar por 1 semana a 37°C. Verificar se tem crescimento suficiente (equivalente à escala 4 de McFarland). <u>Se não cresceu bem, não incubar novamente e fazer um novo tubo.</u> Com uma pipeta Pasteur colocar 2 gotas de telurito de potássio 0,2% . Agitar no Vortex 30 segundos. Incubar 3 dias a 37°C. Ler após 3 dias (não passar o prazo). <p>e) Resultado:</p> <ul style="list-style-type: none"> Positivo: formação de um precipitado preto no fundo do tubo Negativo: não forma precipitado <p>f) Controle de Qualidade:</p> <ul style="list-style-type: none"> Positivo: <i>M. intracellulare</i> Negativo: caldo sem inóculo
--	---

UTILIZAÇÃO DE FERRO

Verificar se a micobactéria é capaz de converter citrato de ferro amoniacal em óxido de ferro.

a) Reagentes:

- citrato férrico amoniacal (solução estéril)

b) Materiais e Equipamentos:

- pipeta Pastuer descartável

c) Procedimento:

- Inocular 2 LJ com uma suspensão de micobactérias.
- Incubar até obter crescimento visível (2 semanas).
- Colocar tantas gotas de citrato férrico amoniacal quantos forem os mililitros de meio em um dos LJ. Ex: para 8 ml de meio LJ, colocar 8 gotas da solução.

- O outro tubo será o controle negativo.
- Reincubar o LJ a temperatura ambiente de 28° - 30°C por até 3 semanas.

d) Resultado:

- Positivo: colônias se tornam escuras-oxidadas
- Negativo: as colônias permanecem com a mesma cor que as do LJ em que não foi colocada a solução.

e) Controle de Qualidade:

- Positivo: *M. fortuitum*
- Negativo: *M. chelonae*

HIDRÓLISE DO TWEEN 80

Esta prova é utilizada verificar a hidrólise enzimática do Tween 80 pelas micobactérias.

a) Reagentes:

- reagente de hidrólise do Tween 80

b) Materiais e Equipamentos:

- alça descartável
- estufa 37°C

c) Procedimento:

- Inocular uma alçada cheia de micobactérias com 2 a 4 semanas de crescimento, em um tubo com o reagente de hidrólise do Tween 80.
- Homogeneizar.
- Incubar a 37°C no escuro com as tampas bem fechadas.
- Ler após 5 e 10 dias de incubação.
- Não agitar os tubos.
- Examinar o líquido e não o sedimento.

d) Resultado:

- Positivo: mudança de cor do meio, de âmbar para pink ou vermelho

e) Controle de Qualidade:

- Positivo: *M. kansasii*
- Negativo: *M. avium*

Se o líquido ficar sem cor repetir o teste, se persistir o resultado reportar como negativo.

TESTES AUTOMATIZADOS E MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO

IDENTIFICAÇÃO PELO BACTEC 460 - NAP

Princípio

NAP (*p*-nitro- α - acetylamino- β -hydroxypropiofenone) é uma substância que inibe o crescimento de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Outras micobactérias que não estão incluídas neste complexo crescem na presença desta substância.

Na presença de *M. tuberculosis* não há produção de CO₂, derivado do crescimento da micobactéria, o que resulta em uma redução na quantidade de ¹⁴CO₂ produzido, originando um resultado negativo quando o frasco é lido no aparelho Bactec 460TB.

Somente culturas em fase de crescimento devem ser usadas para realizar o teste.

<p>a) Meios:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ 1 frasco de Bactec 12B▪ 1 frasco NAP <p>b) Materiais e Equipamentos:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Bactec 460TB▪ seringas tipo tuberculina▪ estufa 37°C	<p>c) Procedimento:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Se for utilizado um crescimento de micobactérias no frasco 12B, seguir conforme descrito no anexo C.▪ Se for utilizado um crescimento de micobactérias de um outro meio líquido ou de um meio sólido, colocar um pouco do crescimento da micobactéria em um frasco 12B. Ler diariamente até atingir um GI de 50 - 100 e proceder conforme descrito no anexo C.
---	--

IDENTIFICAÇÃO POR SONDAS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Princípio

As sondas de DNA utilizam uma fita simples de DNA marcada com um éter de acridina complementar ao rRNA do microrganismo alvo. Após a lise das células da micobactéria, o rRNA é liberado e a sonda marcada se combina com esse rRNA formando um complexo sonda + rRNA.

Uma solução hidrolítica é utilizada para inativar o éster que não ligado ao rRNA. O complexo formado é detectado por quimioluminescência com um luminômetro. A quantidade de luz produzida é proporcional a quantidade de complexos sonda + rRNA presentes na amostra.

As sondas comercialmente disponíveis identificam o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, complexo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae* e *Mycobacterium intracellulare* (GenProbe Inc. San Diego, CA).

<p>a) Materiais e Equipamentos:</p>	<p>2. Se for utilizado crescimento de micobactérias em meio sólido:</p>
--	--

- Luminômetro
- sonicador de banho maria
- banho seco 95°C
- seringa de tuberculina
- pipetas automáticas de 100 µL e 300 µL
- banho 60°C

b) Procedimento

1. Se for utilizado crescimento de micobactérias em frasco 12B:

- Utilizar a cultura quando o crescimento atingir um GI de 999.
- Adicionar 100 µL do reagente 1 e 100 µL do reagente 2 em um tubo de lise.
- Ligar todos os banhos para que possam atingir a temperatura adequada antes de começar o teste.
- Retirar 1 ml do crescimento bacteriano e colocar no tubo de lise.
- Vortexar o tubo vigorosamente por 5 minutos
- Sonicar o tubo por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar o tubo no banho a 95°C por 15 minutos.
- Deixar o tubo esfriar a temperatura ambiente
- Retirar 100µL do lisado e transferir para um tubo com a sonda.
- Incubar 15 minutos a 60°C.
- Pipetar 300 µL do reagente 3 (que vem no kit) no tubo.
- Tampar e vortexar.
- Colocar no banho a 60°C * por 5 minutos.
- Retirar do banho, deixar chegar a temperatura ambiente e colocar no luminômetro para fazer a leitura.

* A temperatura do banho de 60°C é crucial para ocorrer o anelamento da sonda com o rRNA da amostra.

- colocar 100µL do reagente 1 e 100µL do reagente 2 no tubo de lise
- inocular uma alçada cheia do crescimento no tubo de lise.
- proceder como descrito acima no item 1.

3. Se for utilizado crescimento de micobactérias em meio líquido:

- somente fazer o teste quando o caldo apresentar uma boa turvação.
- colocar 100 µL do reagente 1 e 100 µL do reagente 2 no tubo de lise
- colocar 1 ml da amostra no tubo de lise
- proceder como descrito acima no item 1.

Nota: O passo mais importante no processo é a lise das células. Após colocar a amostra no tubo de lise, agitar no vortex vigorosamente por aproximadamente 5 minutos para que o processo seja adequando.

d) Resultado:

- Positivo: > 30,000 RLU (Relative Light Units)
- Negativo: < 30,000 RLU

A sonda para o complexo *M. tuberculosis* não identifica as diferentes espécies de micobactérias pertencentes ao complexo.

IDENTIFICAÇÃO POR MÉTODOS DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA

O termo amplificação significa fazer várias cópias a partir de poucas. Por muito tempo a única técnica em que isso era possível de ser realizado era a cultura, de onde se multiplicava o número de microrganismos presentes na amostra. Esta técnica é muito demorada quando se fala de micobactérias por isso foram desenvolvidas técnicas que amplificam o DNA do microrganismo de forma rápida e específica.

Vários são os métodos para amplificação do DNA de micobactérias que existem no mercado, dentre eles podemos citar; PCR (Polimerase Chain Reaction) e TMA (Transcription-mediated amplification), NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) e SDA (Strand Displacement Amplification).

PCR

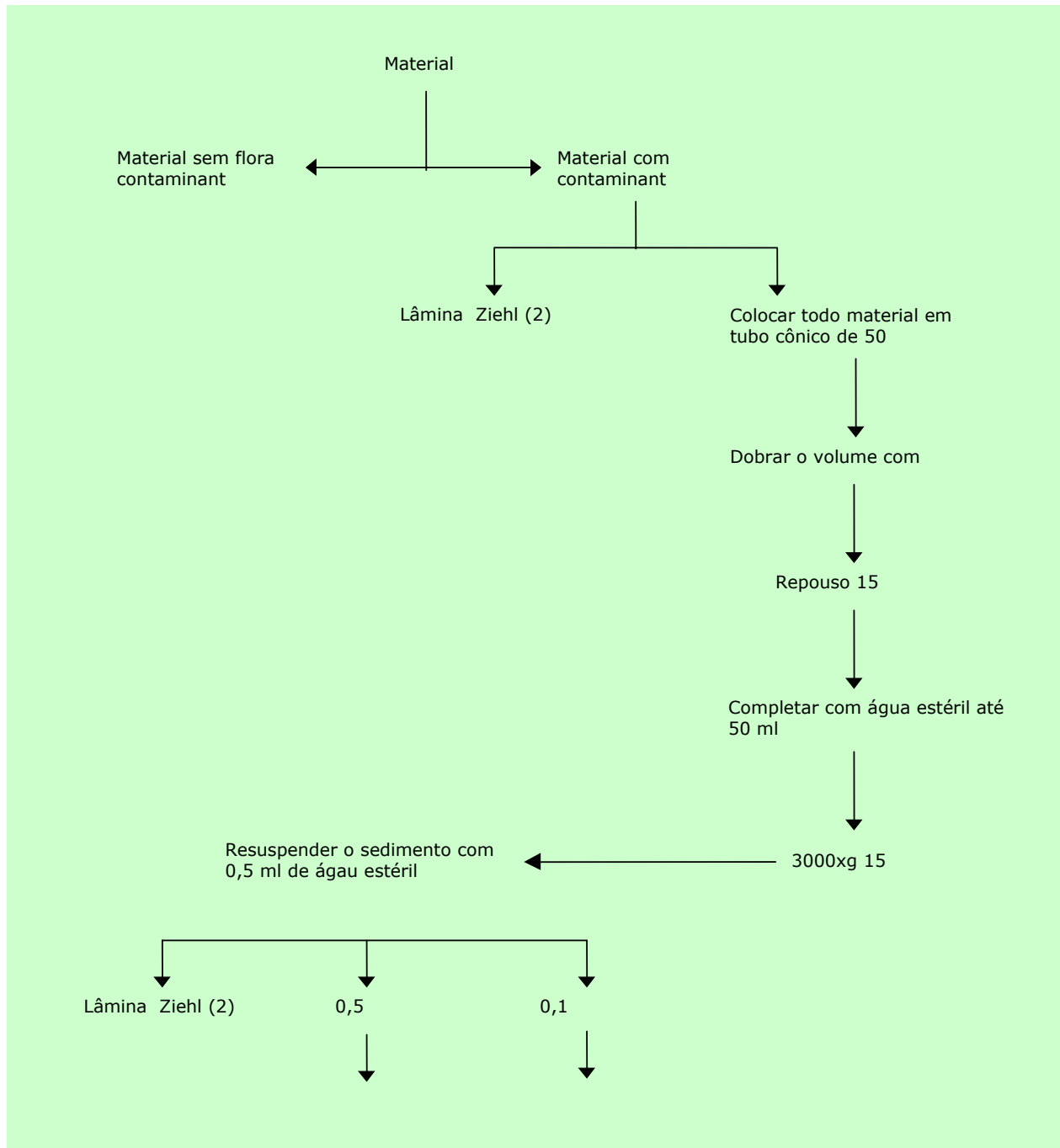
(Amplicor, Roche Diag. Systems)

TMA

Princípio	É um sistema semi-automático de amplificação do DNA "in vitro" por uma série de incubações sucessivas em diferentes temperaturas usando uma enzima estável a temperatura e dependente de DNA (Taq polimerase).	É um sistema semi-automático de amplificação de RNA que utiliza uma única temperatura de amplificação e duas enzimas uma que converte o rRNA em DNA e outra que transcreve o DNA em RNA.
Materiais e Equipamentos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ termociclador ▪ pipetas automáticas ▪ kit AmpliCor 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pipetas automáticas ▪ sonicador ▪ banho 42°C ▪ banho seco 95°C ▪ banho 60°C ▪ luminômetro
Procedimento	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A amostra deve ser digerida e descontaminada utilizando o método de NALC-naoh ▪ As células devem ser lisadas e o DNA extraído ▪ O DNA deve ser purificado e concentrado ▪ A técnica de amplificação é aplicada nesse concentrado ▪ O kit possui as soluções e instruções para realizar os passos de extração e amplificação ▪ A detecção do produto amplificado é feita com sondas específicas para o fragmento do DNA amplificado, marcadas com digoxigenina e biotina no formato de uma reação imunoenzimática colorimétrica. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ As amostras devem ser digeridas e descontaminadas pelo método de NALC-NaOH ▪ As células devem ser lisadas e o DNA extraído ▪ A técnica de amplificação é aplicada no DNA extraído ▪ Kit possui as soluções e instruções para realizar os passos de lise, extração e amplificação do DNA ▪ A detecção do produto amplificado é feita com sondas específicas para o fragmento do DNA amplificado, marcadas com um éster de acridina e a leitura é feita em um luminômetro.

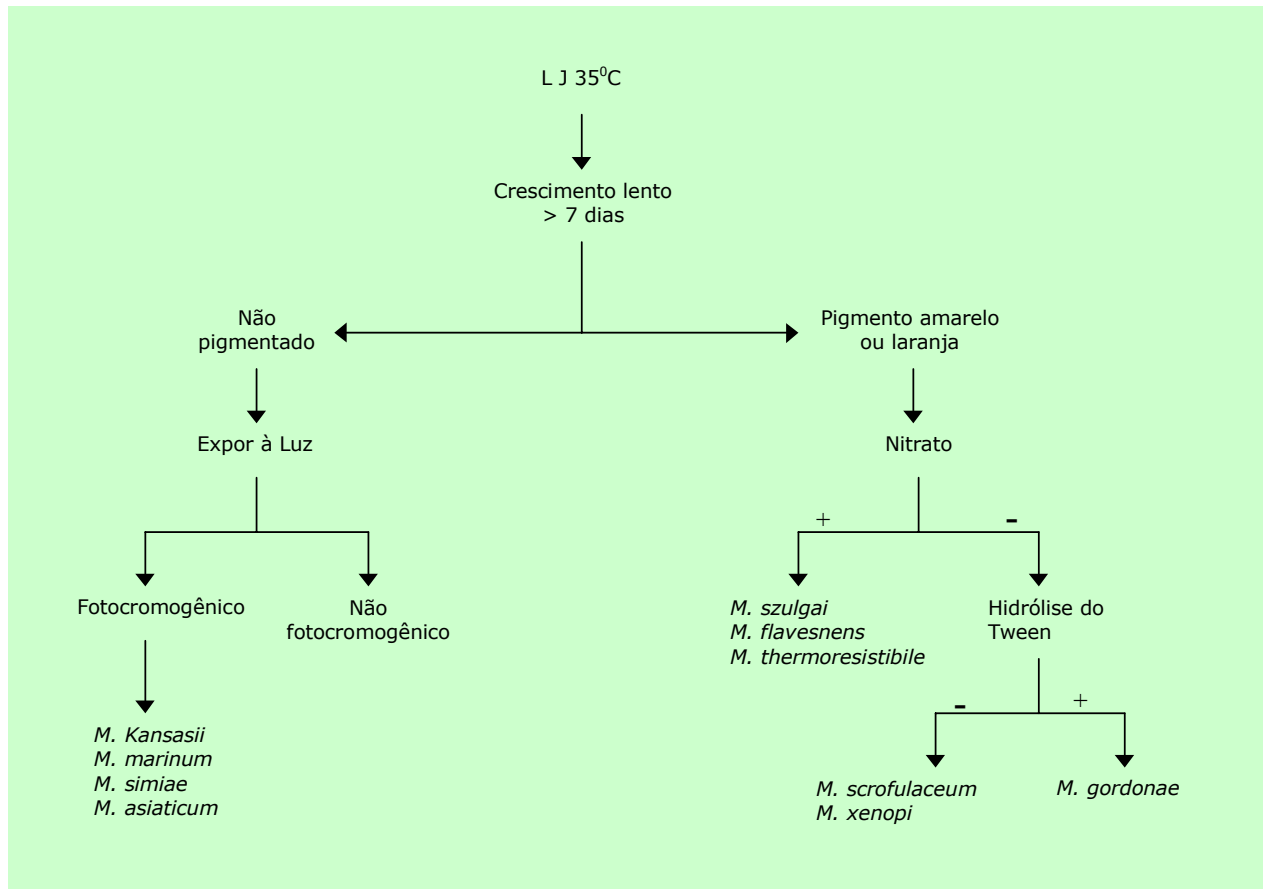
6. ANEXOS

ANEXO A. ESQUEMA DE ISOLAMENTO PRIMÁRIO

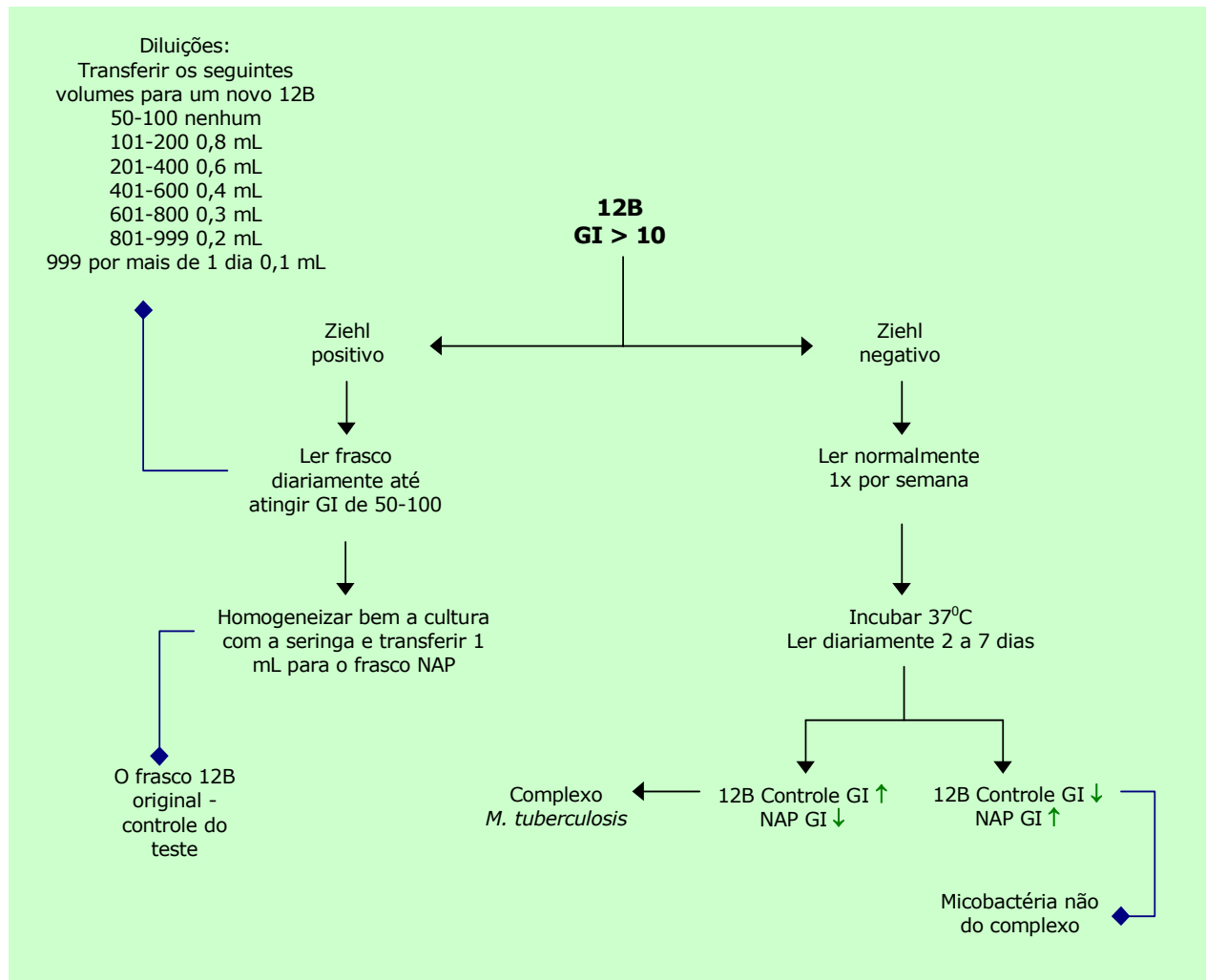


ANEXO B. ESQUEMA DE IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

Crescimento das Micobactéria



ANEXO C. ESQUEMA DO TESTE DE NAP



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Della-Latta, P., Weitzman, I. Mycobacteriology. In: Isenberg, H. D. **Essential Procedures for Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 169-203, 1998.
2. Heifits, L.B. Clinical Mycobacteriology. In: **Clinical in Laboratory Medicine**. W.B. Saunders, Philadelphia, vol 16, no. 3, 1996.
3. Koneman, E.W. Allen, A.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn Jr., W.C. Mycobacteria. In: **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Lippincott, Philadelphia, 5ª ed, 1997.
4. Master, R.N. Mycobacteriology. In: Isenberg, H.D. **Procedures in Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1996.