

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Bruna Peres Sabagh

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O ENRIQUECIMENTO ADC E O SORO FETAL
BOVINO COM GLICOSE EM MEIOS DE CULTURA EMPREGADOS NO ENSAIO
DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DE DESINFETANTES**

Rio de Janeiro

2011

Bruna Peres Sabagh

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O ENRIQUECIMENTO ADC E O SORO FETAL
BOVINO COM GLICOSE EM MEIOS DE CULTURA EMPREGADOS NO ENSAIO
DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DE DESINFETANTES

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Vigilância
Sanitária do Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz
como requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadores: Maria Helena Simões Villas Bôas

Rafael Silva Duarte

Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki

(in memorian)

Rio de Janeiro

2011

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Sabagh, Bruna Peres

Estudo Comparativo entre o enriquecimento ADC e o Soro Fetal Bovino com Glicose em meios de cultura empregados no Ensaio da Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes/Bruna Peres Sabagh.- Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

132 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Orientadores: Maria Helena Simões Villas Bôas; Rafael Silva Duarte; Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki (*in memoriam*)

1. Atividade Micobactericida. 2. Enriquecimentos. 3. Micobactérias. 4. Desinfetantes

Bruna Peres Sabagh

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O ENRIQUECIMENTO ADC E O SORO FETAL BOVINO COM GLICOSE EM MEIOS DE CULTURA EMPREGADOS NO ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DE DESINFETANTES

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadores: Maria Helena Simões Villas Bôas
Rafael Silva Duarte
Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki
(*in memorian*)

Aprovado em 19/04/2011

Verônica Vianna Vieira (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes (Doutor)

Fundação Oswaldo Cruz

Leila de Souza Fonseca (Doutor)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rafael Silva Duarte (Doutor)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ao meu marido Mauricio, as minhas irmãs Fernanda e Flavia
e a amiga Neide Hiromi T. Miyazaki “in memoriam”, saudades...

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas especiais contribuíram para realização e finalização deste trabalho:

- À Dra. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki, pelo grande incentivo, carinho e amizade que foram muito importantes para elaboração deste trabalho, mas que infelizmente partiu e deixou muitas saudades e lembranças queridas que ficarão sempre em minha memória.
- À minha orientadora Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas, por ter assumido a minha orientação, por sempre ter me incentivado, me apoiado e me compreendido nas horas mais difíceis, isto foi muito importante para a finalização deste trabalho. Obrigada pela amizade, por ter me aturado e confiado em mim.
- Ao meu orientador Dr. Rafael Silva Duarte, sempre disposto a ajudar e a transmitir seus conhecimentos para a realização deste trabalho.
- À minha querida madrinha Aline da Silva Soares Souto pela grande amizade. Obrigada por todo companheirismo, ajuda, conversas e risadas que foram muito importantes para a realização deste trabalho.
- A todos os amigos do Setor de Saneantes, em especial as amigas Alessandra de Oliveira Abreu, Daniella Cristina Rodrigues, Marta de Campos Neves e ao amigo Rodrigo Rollin, sempre solícitos e ajudando em pequenas coisas que fizeram toda a diferença. Além disto, pelas risadas e companheirismo que tornaram o trabalho mais prazeroso.
- À Verônica Viana Vieira pela colaboração como pesquisadora e revisora deste trabalho.
- Aos funcionários da Coordenação de Pós-Graduação sempre prestativos quando precisei. Não se esquecendo do amigo Isac Macedo também, apesar de não estar mais na CPG.
- Aos funcionários da Central de Esterilização e do Setor de Meios de Cultura, pela disponibilidade e presteza sempre que solicitados, e em especial à amiga Cátia Cristina S. do Nascimento, sempre sorridente e disposta a ajudar a qualquer hora e, isso foi fundamental para realização deste trabalho.

- Ao meu amigo e padrinho Sérgio, pela disponibilidade e atenção na orientação da análise estatística dos dados deste trabalho.
- Aos amigos Leonardo, Adriana e Sônia do Setor de Saneantes e Cosméticos do Departamento de Química, que realizaram a análise do teor dos produtos utilizados neste trabalho.
- Ao meu querido marido Mauricio, pelo amor, companheirismo, carinho, amizade, confiança e incentivo em todos os momentos.
- Às minhas queridas irmãs, pelo constante incentivo, amor e torcida para que este sonho se tornasse realidade. Em especial para minha irmã Fernanda Sabagh, que me aturou muito e sempre confiou em mim.
- À minha sogra, minhas cunhadas e minha amiga Márcia, pelo amor, carinho e amizade e que, indiretamente contribuíram para finalização deste trabalho.
- Aos meus pais, que apesar de estarem longe sempre se mostraram muito orgulhosos. Muitas saudades de você, papai...

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo.

Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”

Chico Xavier

RESUMO

Relatos científicos descrevendo o surgimento de infecções por micobactérias de crescimento rápido (MCR) em vários países e a notificação nos últimos cinco anos em vários estados no Brasil de infecções hospitalares por MCRs levaram à publicação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) da Resolução nº 51, de 21 de outubro de 2009, na qual é exigida dos fabricantes a comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos contra, não somente a cepa de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, como também para *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594. Isso agravou o problema já existente no Setor de Saneantes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz da aquisição do enriquecimento *Middlebrook ADC Enrichment*, utilizado em grande volume na confecção de dois dos três meios de cultura, meio de Kirchners (K) e meio Middlebrook 7H9 (7H9), utilizados no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes preconizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), já que esse produto, além de muito caro, é fabricado somente pela Difco/BD/BBL e possui a validade de apenas oito meses a partir da data de fabricação, o que implica em um prazo curto para o seu emprego após cumprir todo o trâmite de importação. Esses fatores contribuíram para que este estudo fosse desenvolvido utilizando-se tanto o enriquecimento comercial ADC, quanto outro enriquecimento de valor mais acessível preparada em laboratório conforme Fonseca, Silva e Gontijo Filho (1985), constituído de soro fetal bovino e glicose (SFBG), a fim de dar subsídios para o desenvolvimento tecnológico de métodos na área de desinfetantes micobactericidas, de forma a não depender só do produto fabricado pela Difco/BD/BBL. Assim, o objetivo principal deste estudo foi comparar as diferentes curvas de crescimento de algumas micobactérias, *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062, *M. massiliense* INCQS nº 00594, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841 e *M. abscessus* ATCC 19977, utilizando o enriquecimento ADC e o SFBG nos meios de cultura K e 7H9, e avaliar a qualidade de dois desinfetantes à base de glutaraldeído (A e B) e a suscetibilidade das MCR de referência frente a esses desinfetantes, aplicando os dois enriquecimentos. Através da análise estatística realizada com o teste de Kruskal-Wallis na avaliação da taxa de crescimento dos microrganismos, verificou-se que não houve diferença significativa na utilização dos dois enriquecimentos. No ensaio para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes, os dois produtos foram ineficazes para *M. bovis*, *M. massiliense*, *M. abscessus* e *M. fortuitum*. Já *M. chelonae* foi eliminado somente pelo desinfetante B. Porém, estudos complementares são necessários para a finalização dos ensaios com a cepa de *M. bovis* BGC Moreau, e a realização de estudos de validação intra-laboratorial e inter-laboratorial relacionados à possível substituição do enriquecimento ADC pelo SFBG nos ensaios para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes.

Palavras-chave: Atividade Micobactericida, Enriquecimentos; Micobactérias; Desinfetantes

ABSTRACT

Recent scientific reports describing the emergence of rapidly growing mycobacteria (RGM) in many countries and notification of nosocomial infections caused by RGM in many states of Brazil in the last five years led to the publication of the resolution number 51, of October 21 2009, by Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). In this document it is stated that all the manufacturers must provide evidences of efficacy of disinfectants products for semicritical articles against the strain *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, and also *Mycobacterium massiliense* INCQS 00594. It has increased the existing problem in the disinfectant sector of *Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde* from Fundação Oswaldo Cruz related to the acquisition of *Middlebrook ADC* Enrichment, which is used in large volumes for confectioning of two culture medium, Kirchners medium (K) and Middlebrook 7H9 medium (7H9), used in Confirmative *in vitro* Test for Determining Mycobactericidal Activity of Disinfectants recommended by *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). This product is sold in high prices and is manufactured by Difco/BD/BBL. Further, its expiration date consists of only eight months from manufacturing date, what results in a short-term for using after all import procedures. These factors have contributed for the development of this study for comparison of the commercial ADC enrichment and another low-cost enrichment prepared in laboratory according to Fonseca, Silva e Gontijo Filho (1985), consisting of bovine fetal serum and glucose (SFBG), in order to provide easiness improvement of studies and methods in mycobactericidal disinfectants area, not depending on only the product manufactured by Difco/BD/BBL. So, the aim of this study was to compare the different growth curves of some mycobacteria, *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062, *M. massiliense* INCQS nº 00594, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841 e *M. abscessus* ATCC 19977, using ADC enrichment and SFBG in culture medium K e 7H9, and evaluate the quality of two glutaraldehyde-based disinfectants (A and B) and the susceptibility of reference NTM against these disinfectants, applying both enrichments. Through statistical analysis made with Kruskal-Wallis test in the evaluation of growth rate of microorganisms, it was observed that there was no interference in RGM growth by any of the enrichment used. In the evaluation assay for mycobactericidal activity of disinfectants, the two products were ineffective for *M. bovis*, *M. massiliense*, *M. abscessus* e *M. fortuitum*. *M. chelonae* was eliminated only by disinfectant B. Nevertheless, a complementary study is needed for obtaining final results with the strain *M. bovis* BGC Moreau, and intra-laboratorial and inter-laboratorial validation studies related to the possibility of substitution of ADC enrichment by SFBG in assays for the evaluation of mycobactericide activity of disinfectants.

Key-words: Mycobactericidal Activity; Enrichment; Mycobacteria; Disinfectants

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Lâmina corada pela Técnica de Ziehl-Neelsen de <i>Mycobacterium avium</i>	23
FIGURA 2	Esquema da parede celular das micobactérias.....	26
FIGURA 3	Distribuição de casos de infecção por MCR no Brasil no período de 2003 a 2008.....	29
FIGURA 4	Estrutura molecular do Glutaraldeído.....	33
FIGURA 5	Representação esquemática do procedimento de crescimento para as micobactérias de crescimento rápido.....	44
FIGURA 6	Representação esquemática da diluição das micobactérias para a obtenção da curva de crescimento através da contagem de colônias e leituras por espectrofotometria.....	46
FIGURA 7	Esquema da inoculação das diluições de cada meio de cultura em triplicata em placa de Petri contendo ágar Müller Hinton.....	47
FIGURA 8	Etapa inicial da preparação do inóculo de <i>M. bovis</i> realizada a partir da cultura estoque.....	48
FIGURA 9	Transferência dos cilindros contaminados na suspensão T20% para placa de Petri contendo duas folhas de papel de filtro.....	49
FIGURA 10	Esquema da transferência dos cilindros entre tubos utilizados no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes - POP INCQS nº 65.3210.004.....	50

FIGURA 11	Crescimento de <i>M. abscessus</i> em Ágar Müller Hinton. Esta micobactéria havia sido previamente crescida no meio 7H9 com SFBG.....	57
FIGURA 12	Curva de crescimento de <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977 nos meios K com SFBG e K com ADC.....	59
FIGURA 13	Curva de crescimento de <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC.....	60
FIGURA 14	Curva de crescimento de <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841 nos meios K com SFBG e K com ADC.....	63
FIGURA 15	Curva de crescimento de <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC.....	64
FIGURA 16	Curva de crescimento de <i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752 nos meios K com SFBG e K com ADC.....	67
FIGURA 17	Curva de crescimento de <i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC.....	68
FIGURA 18	Curva de crescimento de <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594 nos meios K com SFBG e K com ADC.....	71
FIGURA 19	Curva de crescimento de <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC.....	72
FIGURA 20	Curva de transmitância de <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977 nos meios K com SFBG e K com ADC.....	76

FIGURA 21	Curva de transmitância de <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC.....76
FIGURA 22	Curva de transmitância de <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841 nos meios K com SFBG e K com ADC.....78
FIGURA 23	Curva de transmitância de <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC.....78
FIGURA 24	Curva de transmitância de <i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752 nos meios K com SFBG e K com ADC.....90
FIGURA 25	Curva de transmitância de <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC.....90
FIGURA 26	Curva de transmitância de <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS n° 00594 nos meios K com SFBG e K com ADC.....82
FIGURA 27	Curva de transmitância de <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS n° 00594 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC.....82
FIGURA 28	Curva de Crescimento das micobactérias de crescimento rápido de referência no meio PB.....85
FIGURA 29	Atividade micobactericida do Desinfetante A frente aos microrganismos <i>M. bovis</i> e <i>M. massiliense</i> utilizando os meios de cultura com o enriquecimento ADC.....89
FIGURA 30	Atividade micobactericida do Desinfetante A frente aos microrganismos <i>M. bovis</i> e <i>M. massiliense</i> utilizando os meios de cultura com o enriquecimento SFBG.....89

FIGURA 31	Atividade micobactericida do Desinfetante B frente aos microrganismos <i>M. bovis</i> e <i>M. massiliense</i> utilizando os meios de cultura com o enriquecimento ADC.....	92
FIGURA 32	Atividade micobactericida do Desinfetante B frente aos microrganismos <i>M. bovis</i> e <i>M. massiliense</i> utilizando os meios de cultura com o enriquecimento SFBG.....	92
FIGURA 33	Avaliação da suscetibilidade das MCRs de referência frente ao desinfetante A utilizando os meios de cultura com o enriquecimento ADC.....	95
FIGURA 34	Avaliação da suscetibilidade as MCRs de referência frente ao desinfetante A utilizando os meios de cultura com o enriquecimento SFBG.....	95
FIGURA 35	Avaliação da suscetibilidade das MCRs de referência frente ao desinfetante B utilizando os meios de cultura com o enriquecimento ADC.....	98
FIGURA 36	Avaliação da suscetibilidade das MCRs de referência frente ao desinfetante B utilizando os meios de cultura com o enriquecimento SFBG.....	98

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1** Resultado da análise estatística da comparação do crescimento das Micobactérias de Crescimento Rápido de referência em meio de Kirchners.....83
- QUADRO 2** Resultado da análise estatística da comparação do crescimento das Micobactérias de Crescimento Rápido de referência em meio Middlebrook 7H9.....83
- QUADRO 3** Avaliação da atividade micobactericida do desinfetante A utilizando a cepa de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594.....88
- QUADRO 4** Avaliação da resistência dos microrganismos *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594 frente às diluições do fenol no ensaio com o desinfetante A.....88
- QUADRO 5** Avaliação da atividade micobactericida do desinfetante B utilizando a cepa de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594.....91
- QUADRO 6** Avaliação da resistência dos microrganismos *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594 frente às diluições do fenol no ensaio com o desinfetante B.....91
- QUADRO 7** Avaliação da suscetibilidade de *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 e *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 utilizando o desinfetante A.....94

QUADRO 8	Avaliação da resistência dos microrganismos <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977, <i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752 e <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841 frente às diluições do fenol no ensaio com o desinfetante A.....94
QUADRO 9	Avaliação da suscetibilidade de <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977, <i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752 e <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841 utilizando o desinfetante B.....97
QUADRO 10	Avaliação da resistência dos microrganismos <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977, <i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752 e <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841 frente às diluições do fenol no ensaio com o desinfetante B.....97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Micobactérias atípicas de acordo com a classificação de Runyon.....	25
TABELA 2	Resultados do número de unidades formadoras de colônias/mL para <i>Mycobacterium abscessus</i> obtidos através da contagem de colônias.....	58
TABELA 3	Resultado da análise estatística da comparação do crescimento de <i>M. abscessus</i> em meio de Kirchners e meio Middlebrook 7H9.....	61
TABELA 4	Resultados do número de unidades formadoras de colônias/mL para <i>Mycobacterium fortuitum</i> obtidos através da contagem de colônias.....	62
TABELA 5	Resultado da análise estatística da comparação do crescimento de <i>M. fortuitum</i> em meio de Kirchners e meio Middlebrook 7H9.....	65
TABELA 6	Resultado do número de unidades formadoras de colônias/mL para <i>Mycobacterium chelonae</i> obtidos através da contagem de colônias.....	66
TABELA 7	Resultado da análise estatística da comparação do crescimento de <i>M. chelonae</i> em meio de Kirchners e meio Middlebrook 7H9.....	69
TABELA 8	Resultados do número de unidades formadoras de colônias/mL para <i>Mycobacterium massiliense</i> obtidos através da contagem de colônias.....	70

TABELA 9	Resultado da análise estatística da comparação do crescimento de <i>M. massiliense</i> em meio de Kirchners e meio Middlebrook 7H9.....	73
TABELA 10	Resultados obtidos através da leitura da densidade ótica em transmitância (T%) a 650nm para <i>Mycobacterium abscessus</i>	75
TABELA 11	Resultados obtidos através da leitura da densidade ótica em transmitância (T%) a 650nm para <i>Mycobacterium fortuitum</i>	77
TABELA 12	Resultados obtidos através da leitura da densidade ótica em transmitância (T%) a 650nm para <i>Mycobacterium chelonae</i>	79
TABELA 13	Resultados obtidos através da leitura da densidade ótica em transmitância (T%) a 650nm para <i>Mycobacterium massiliense</i>	81
TABELA 14	Resultado da análise estatística da comparação do crescimento das micobactérias <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> e <i>M. massiliense</i> em meio PB.....	86

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
7H9	Meio Middlebrook 7H9
7H10	Meio Middlebrook 7H10
7H11	Meio Middlebrook 7H11
ADC	Albumina-dextrose-catalase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilos lcool-cido Resistentes
BACTEC 460	Sistema automatizado radiométrico BACTEC 460
BACTEC MGIT 960	Sistema automatizado não radiométrico BACTEC MGIT 960
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CEN	Comitê Europeu de Normatização
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DEVEP	Departamento de Vigilância Epidemiológica
DNA	cido desoxiribonucleico
DO	Densidade tica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
K	Meio de Kirchners
LJ	Meio Lwestein-Jensen
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MB/BacT	Sistema automatizado radiométrico MB/BacT
MCL	Micobactérias de Crescimento Lento
MCR	Micobactéria de Crescimento Rápido
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MGIT	<i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
mL	Mililitro

mm	Milímetros
MNT	Micobactérias Não causadoras de Tuberculose
MOTT	Outras bactérias que não o bacilo da tuberculose
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetros
OADC	Ácido oleico-albumina-dextrose-catalase
PB	Meio Proskauer- Beck Modificado
pH	Potencial de hidrogênio
POP	Procedimento Operacional Padrão
ppm	Partes por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
SFBG	Soro Fetal Bovino com Glicose
SFE	Soro Fetal Equino
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T%	Transmitância em porcentagem
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UV	Ultra-Violeta
Vis	Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. INFECÇÃO HOSPITALAR.....	21
1.2. MICOBACTÉRIAS.....	22
1.3. DESINFETANTES E SUAS LEGISLAÇÕES VIGENTES.....	30
1.4. PRINCÍPIO ATIVO GLUTARALDEÍDO.....	33
1.5. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DESINFETANTES.....	34
1.6. JUSTIFICATIVA.....	36
2. OBJETIVOS	38
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	38
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. MICRORGANISMOS.....	40
3.1.1. Manutenção da cepa de <i>M. bovis</i> BCG Moreau INCQS nº 00062.....	40
3.1.2. Manutenção de <i>M. massiliense</i> INCQS nº 00594.....	41
3.1.3. Manutenção das micobactérias de crescimento rápido de referência.....	41
3.2. PRODUTOS DESINFETANTES.....	42
3.3. ENRIQUECIMENTOS DOS MEIOS DE CULTURA.....	42
3.4. OBTENÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO DAS MICOBACTÉRIAS.....	42
3.4.1. Micobactérias de crescimento rápido de referência.....	42
3.4.2. Cepa <i>M. bovis</i> cepa BCG Moreau INCQS nº 00062.....	45
3.5. VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DOS PRODUTOS DESINFETANTES.....	47
3.5.1. Controles de Esterilidade.....	51
3.5.1.1. <i>Esterilidade dos Meios de Cultura</i>	51
3.5.1.2. <i>Esterilidade da Água Purificada</i>	51
3.5.1.3. <i>Esterilidade dos Lotes de Pipetas</i>	51
3.5.1.4. <i>Esterilidade do Cilindro de Porcelana</i>	52
3.5.1.5. <i>Esterilidade do Soro de Cavalos</i>	52
3.5.1.6. <i>Esterilidade da Solução de Cloreto de Sódio a 0,85% com 0,1% de Polissorbato</i>	52
3.5.2. Controles Positivos.....	53

3.5.3. Controle de Resistência do Microrganismo.....	53
3.5.4. Leitura dos Resultados.....	54
3.5.5. Interpretação dos Resultados.....	54
3.6. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DAS MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO DE REFERÊNCIA UTILIZANDO DIFERENTES ENRIQUECIMENTOS.....	54
4. RESULTADOS.....	56
4.1. CURVA DE CRESCIMENTO DAS MICOBACTÉRIAS.....	56
4.1.1. <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977.....	56
4.1.2. <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841.....	61
4.1.3. <i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752.....	65
4.1.4. <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594.....	69
4.1.5. Cepa <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau INCQS nº 00062.....	73
4.2. LEITURA POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	73
4.2.1. <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977, <i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841, <i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752, e <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº00594.....	73
4.2.2. Análise estatística dos resultados da leitura por espectrofotometria das MCRs de referência.....	83
4.3. OBSERVAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NO MEIO DE CULTURA ISENTO DE ENRIQUECIMENTO – PB.....	84
4.4. VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DOS DESINFETANTES.....	86
4.4.1. Desinfetante A.....	86
4.4.2. Desinfetante B.....	90
4.5. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DAS MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO DE REFERÊNCIA UTILIZANDO OS DIFERENTES ENRIQUECIMENTOS.....	93
4.5.1. Desinfetante A.....	93
4.5.2. Desinfetante B.....	96
5. DISCUSSÃO.....	99
6. CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS.....	110
ANEXO A – Meios de Cultura.....	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÃO HOSPITALAR

Uma das maiores preocupações na área da saúde está relacionada ao problema de infecção hospitalar que é definida como infecções adquiridas no hospital ou em qualquer outra instituição de assistência à saúde que não estavam presentes ou em incubação na época da admissão do paciente no hospital. Esse termo inclui infecções que são adquiridas no hospital e se manifestam durante a internação ou mesmo após a alta. Também abrange as infecções relacionadas a procedimentos realizados ambulatoriamente, durante cuidados domiciliares e as infecções ocupacionais adquiridas pelos profissionais de saúde (PITTET et al., 2006, WHO, 2005).

As doenças infecciosas são amplamente distribuídas em todo o mundo, causando desde infecções brandas até infecções mais graves que podem levar a morte. No ambiente hospitalar, estas infecções representam uma das grandes preocupações para os pacientes e os profissionais de saúde (KAMPF; HOLLINGSWORTH, 2003, SAIDA et al., 2009). É comum a ocorrência de infecções hospitalares, incluindo surtos, sendo especialmente preocupantes para pacientes que sofreram alguma intervenção cirúrgica ou que possuem algum tipo de imunocomprometimento, causado por transplante de órgãos, quimioterapia ou doenças infecciosas (MEYER; KLARENBECK; MEYER, 2010). Em média, 7 a 10% dos pacientes hospitalizados adquirem infecção após internação. Uma parte substancial destas infecções resulta de contaminação cruzada (BUCHER, 2000). Dessa forma, é fundamental prevenir essas infecções e a transmissão nosocomial para outros indivíduos.

Estudos epidemiológicos revelam que tais infecções são decorrentes de procedimentos e técnicas praticados de forma inadequada pelos profissionais de saúde (GOLDMANN, 1992, EMORI; GAYNES, 1993) como a desinfecção inadequada dos instrumentos hospitalares (KAYABAS et al., 2008), de mobiliários presentes nestes locais, e da antisepsia da pele das pessoas presentes nestes ambientes (PENNA; MAZZOLA; MARTINS, 2001), sendo a transmissão de microrganismos pelas mãos dos profissionais de saúde considerada uma das

principais causas de infecção hospitalar (BUCHER, 2000). Sendo assim, as técnicas de assepsia também representam procedimentos essenciais, pois uma vez quebradas ou não utilizadas poderão resultar no surgimento de infecções (HOPPER; MOSS, 2010).

E assim, tem-se dado maior atenção às medidas preventivas com o objetivo de reduzir a exposição do hospedeiro suscetível aos microrganismos (BOLDIN; BONTEN; DIEKMANN, 2007), através do uso de anti-sépticos sobre tecidos vivos, e de outros tipos de agentes antimicrobianos para a desinfecção de artigos médicos, do mobiliário e das superfícies em hospitais, já que muitos microrganismos tendem a aderir às superfícies levando inclusive à formação de biofilmes (ALI; KHAMBATY; DIACHENKO, 2005). A desinfecção por esses agentes pode ser de caráter físico ou químico ou às vezes a combinação dos dois (RUSSEL, 1991, NOGUCHI et al., 1999).

1.2 MICOBACTÉRIAS

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, da família Mycobacteriaceae e estão dentro do domínio Bacteria, filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, subclasse Actinobacteridae, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae (EUZÉBY, 2011). O nome *Mycobacterium (fungus bacterium)*, foi 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 (ARAÚJO; MARIA; BAPTISTA, 2008). O gênero *Mycobacterium* atualmente está constituído por 149 espécies e 11 subespécies, descrita na lista de espécies bacterianas com nomes aprovados (EUZÉBY, 2011).

Esses microrganismos se apresentam como bacilos ligeiramente curvos, de 1 a 10 µm de comprimento, 0,2 a 0,6 µm de largura, aeróbios estritos, imóveis, não esporulados e não encapsulados (FONTANA, 2008). Possuem algumas características, tais como a resistência a drogas que está relacionada com sua parede celular, a qual, devido às propriedades biológicas, garante às micobactérias a classificação como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), isso decorre do fato de que em procedimentos de coloração, a fucsina impregna a célula micobacteriana, e

esta não é decolorada por uma solução constituída de álcool e ácido clorídrico. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005) (**FIGURA 1**).

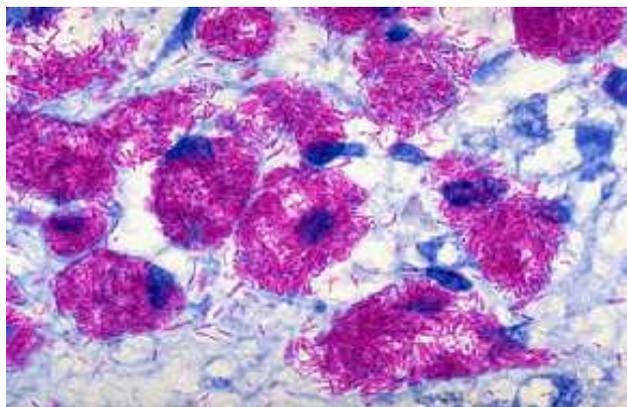


FIGURA 1. Lâmina corada pela Técnica de Ziehl-Neelsen de *Mycobacterium avium*. Disponível em: <<http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/m130/m130info.html>> Acesso em janeiro de 2011.

No passado, todas as espécies de micobactérias que não causavam tuberculose foram denominadas como micobactéria “atípicas” ou como “outras bactérias que não o bacilo da tuberculose” (MOTT, do inglês: *mycobacteria other than tubercle bacilli*). A nomenclatura atual, adotada pela *American Thoracic Society* (ATS) descreve esses microrganismos como Micobactérias Não causadoras de Tuberculose (MNT) (JORDAN et al., 2007). Além de serem conhecidas como atípicas, MOTT e MNT, a essas espécies de micobactérias foram dados outros nomes diferentes, como ambientais e oportunistas (KATOCH, 2004).

As micobactérias são classificadas em dois grupos de acordo com a taxa de crescimento em meio sólido: micobactérias de crescimento lento (MCL) – tempo de geração acima de 16 horas (crescimento visível em período acima de 7 dias) e micobactérias de crescimento rápido (MCR) – tempo de geração de 3 a 4 horas (crescimento visível em período abaixo de 7 dias). As MCL incluem a maioria das micobactérias patogênicas como o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e o complexo *Mycobacterium avium* (MAC). Esses dois grupos se diferenciam não só quanto à taxa de crescimento como também de acordo com a morfologia da colônia,

virulência e sensibilidade a antibióticos e biocidas (PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004, BRITO, 2008, PITOMBO; LUPI; DUARTE, 2009).

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) são saprófitas, encontradas em vários reservatórios ambientais como água, solo, em forma de aerossóis, em protozoários, em animais e em seres humanos (HOWARD; BYRD, 2000, PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004), abrangem as espécies pertencentes ao complexo *Mycobacterium fortuitum*, complexo *Mycobacterium chelonae-abscessus*, complexo *Mycobacterium smegmatis*, e *Mycobacterium massiliense*. Esta última espécie teve seu nome validado em 2006, tendo sido separada do complexo *M. chelonae-abscessus* (SHINNICK; GOOD, 1994, DAWSON, 2000, HOWARD; BYRD; 2000, ADÉKAMBI et al., 2004, EUZÈBY, 2011).

Em 1954, Timpe e Runyon criaram, para as micobactérias que denominaram atípicas, uma classificação em quatro grupos, refinada por Runyon em 1959. Ele classificou as micobactérias de acordo com sua velocidade de crescimento e sua capacidade de produzir, ou não, pigmentos em determinadas condições (LEVINSON; JAWETZ, 2005), sendo três grupos de micobactérias de crescimento lento e um grupo de crescimento rápido (**TABELA 1**).

As fotocromogênicas (Grupo I), chamadas assim por serem capazes de produzir pigmento amarelo ou laranja quando células em crescimento são expostas à luz e de crescimento lento, incluem *M. kansasii*, *M. simiae* e *M. marinum*. As escotocromogênicas (Grupo II), semelhantes às anteriores produzem colônias com pigmento amarelo brilhante, tanto quando cultivadas sob luz e no escuro. Este grupo inclui *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens* e *M. xenopi*. As acromogênicas ou não-fotocromogênicas (Grupo III) incluem algumas espécies que produzem pequena quantidade de pigmento amarelo pálido, cuja cor não é intensificada pela exposição à luz, incluem os complexos *M. avium-intracellulare*. As MCR (Grupo IV) produzem colônias em culturas geralmente em três a cinco dias. Incluem espécies que exibem pigmentação amarela e duas não pigmentadas (LEVINSON; JAWETZ, 2005), tais como o *Mycobacterium fortuitum* (BROWN-ELLIOT; WALLACE JR, 2005, FONTANA, 2008).

TABELA 1. Micobactérias atípicas de acordo com a classificação de Runyon.

Grupo	Velocidade de Crescimento	Produção de Pigmento		Espécies Típicas
		No Claro	No Escuro	
I	Lento	Sim	Não	<i>M. Kansasii</i> , <i>M. marinum</i>
II	Lento	Sim	Sim	<i>M. scrofulaceum</i>
III	Lento	Não	Não	Complexo <i>M. avium</i>
IV	Rápido	Sim ou Não	Sim ou Não	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i>

Fonte: Adaptado de Levinson & Jawetz, 2005.

As micobactérias são diferentes das demais bactérias quando são observadas propriedades relacionadas à quantidade e aos tipos de lipídeos complexos, ou seja, ácidos graxos de cadeia longa (ácidos micólicos), presentes na parede celular. Os ácidos micólicos formam ligações covalentes com polissacarídeos que compõem a parede celular, denominado arabinogalactana que, por sua vez, ligam-se ao peptidoglicano por meio de pontes fosfodiéster (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Como pode ser verificada na **FIGURA 2** a parede celular das micobactérias contém uma camada de peptidoglicano (4), que é a camada mais interna da parede e que confere rigidez; composto por ácido N-glicolilmurâmico em vez de ácido N-acetilmurâmico, encontrado na maioria das outras bactérias. Os ácidos micólicos (2) representam cerca de 60% da parede celular micobacteriana e constituem-se de lipídeos que consistem basicamente de ácidos graxos de cadeia longa incomuns, com 60 a 90 átomos de carbono. Eles formam ligações covalentes com polissacarídeos de cadeia ramificada que compõem a parede celular, denominado arabinogalactana (3) que, por sua vez, ligam-se ao glicopeptídeo por meio de pontes fosfodiéster. O complexo glicopeptídeo-ácido micólico-arabinogalactana forma o esqueleto da parede das micobactérias (8). Projetando-se através das camadas da parede glicopeptídica, arabinogalactana e ácido micólico, são encontrados também fosfolipídeos substituídos (7) e lipopolissacarídeos (6), que estão unidos à camada mais externa da célula micobacteriana. Essa camada mais externa é composta de diferentes lipídeos, incluindo os glicolipídios, sulfolipídios, fenolglicolipídios, peptidoglicolipídios e os lipoarabinomana (ASSIS, 2007, BRITO, 2008).

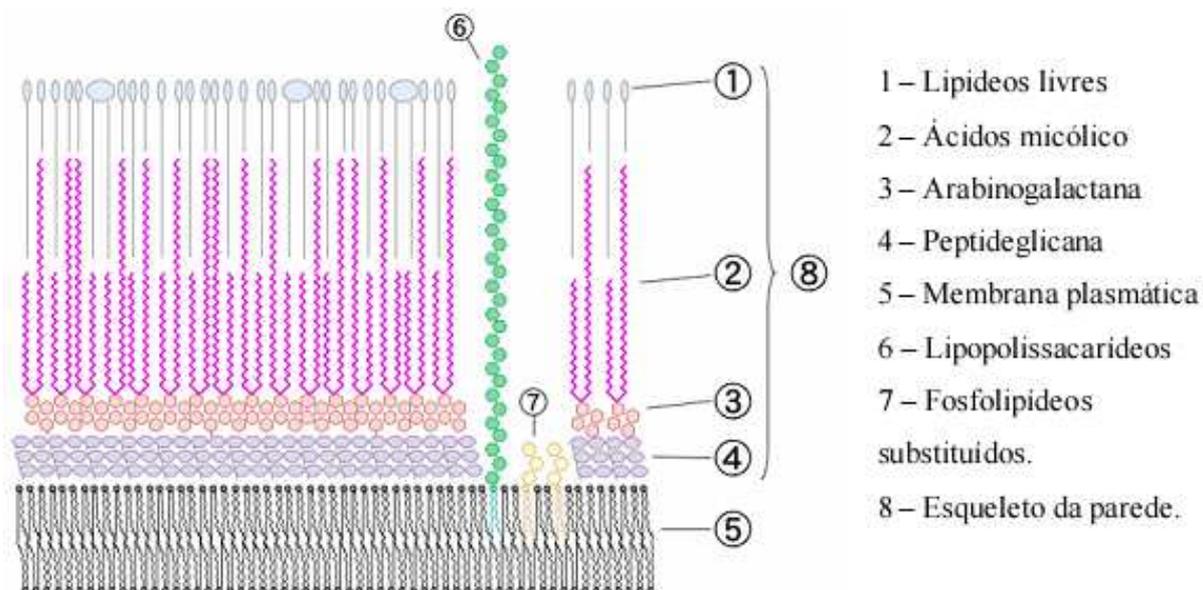


FIGURA 2. Esquema da parede celular das micobactérias

Disponível em: <commons.wikimedia.org/wiki/File:Mycobacterial_cell_wall_diagram.png>

Acesso em agosto de 2009

A complexidade da parede micobacteriana, o seu grande conteúdo lipídico e a camada tripla da parede celular conferem às micobactérias maior resistência aos desinfetantes, às temperaturas elevadas e à luz ultravioleta quando comparadas às outras bactérias patogênicas (FONTANA, 2008). Os ácidos micólicos formam uma cobertura que permite a micobactéria ser resistente à dessecação, podendo sobreviver por períodos prolongados em condições extremas (BRITO, 2008). Além disso, são capazes de formar biofilme que além de suportar o crescimento micobacteriano, protege o organismo dificultando a desinfecção (LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009). Isso dificulta sua eliminação e prevenção, facilitando a transmissão dentro do ambiente hospitalar (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

O gênero *Mycobacterium* inclui microrganismos de importância clínica como *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose e *Mycobacterium leprae*, agente causador da hanseníase. O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) compreende as espécies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canneti*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedi* (COROS; DE CONNO; DERBYSHIRE, 2008). O complexo *Mycobacterium avium* (MAC) inclui diversas espécies de micobactérias entre elas *M. avium* e *M. intracellulare*, microrganismos estes frequentemente relacionados às complicações da AIDS (RAMOS et al., 2000).

Entre as principais espécies de MCR relacionadas às doenças no homem encontram-se *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* (TIMERMAN, 2005), porém essas infecções geralmente estão associadas à pessoas com fatores predisponentes ou imunocomprometidas, já que são microrganismos que geralmente apresentam baixa virulência (WAGNER; YOUNG, 2004, CHO et al., 2010) .

Na literatura, nas últimas décadas, foram publicados vários relatos científicos nacionais e internacionais de infecções causadas por MNT após traumas, cirurgias cardíacas, cirurgias plásticas na face, mamoplastia, cirurgias dermatológicas, lipoaspiração, implante de silicone na mama, implante de próteses articulares, acupuntura, mesoterapia, atendimento por pedicure, injeção de silicone, injeções subcutâneas, e intramusculares de antibióticos, esteróides e medicamentos alternativos. Surto de úlceras na pele, infecção pulmonar, bacteremia associada a cateter e/ou diálise, pseudosurtos associados a broncoscopia e a laparoscopia, e ceratite após cirurgia a laser (LASIK, do inglês: *Laser-Assisted in Situ Keratomileusis*) (WALLACE JR; BROWN; GRIFFITH, 1998, BROWN-ELLIOT; GRIFFITH; WALLACE, 2002, FREITAS et al., 2003, TIWARI et al., 2003, USLAN et al., 2006, EID et al., 2007, KIM et al., 2007, CARBONNE et al., 2009), acometendo tecidos e órgãos do corpo causando osteomielite, artrite, linfadenite, otite média crônica, infecções da córnea, doenças pulmonares, entre outros. (FALKINHAM, 1996, HOWARD; BYRD, 2000, PHYLLIPS; VON REYN, 2001, SHIN et al., 2007).

O tratamento das doenças por MCR pode se tornar difícil não somente por apresentarem resistência à maioria das drogas de primeira linha como também exibirem diferentes perfis de sensibilidade aos antibióticos disponíveis, além do fato do tratamento envolver meses de antibioticoterapia e até a remoção do tecido infectado (HOWARD; BYRD, 2000).

Em estabelecimentos de saúde as MCR têm sido encontradas em água encanada, máquinas de gelo, equipamentos dentários, broncoscópios, injetores, em água de rinsagem para máquinas de hemodiálise, provavelmente devido à hidrofobicidade das paredes das células micobacterianas, e em desinfetantes (HOWARD; BYRD, 2000).

No Brasil, de 2003 até abril de 2008, foram notificados mais de 2000 casos de infecção por MCR em 14 estados, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (**FIGURA 3**), distribuídos predominantemente em hospitais privados no país (ANVISA, 2008). As infecções foram caracterizadas por hiperemia local e formação de abscessos com aspecto inflamatório e secreções purulentas, além de não responderem à terapia antimicrobiana comum (VIANNA-NIERO et al., 2008). Esses casos de infecção por MCR foram, sobretudo em pacientes submetidos a procedimentos invasivos, sendo um aspecto comum entre esses casos à utilização de instrumentais ou artigos médicos desinfetados com produtos à base de glutaraldeído, que na prática clínica constitui uma das medidas para prevenir a disseminação dos microrganismos em estabelecimentos associados à saúde (RUSSEL, 1991, NOGUCHI et al., 1999).

Segundo Shin e colaboradores (2007), como não há evidência de transmissão de MNT de pessoa para pessoa, é sugerida a proposição de que os seres humanos são infectados a partir de fontes ambientais as quais podem incluir aerossóis, solo, alimentos, equipamentos e água (SHIN et al., 2007). Vários tipos de MNTs foram identificados em gelo e água de abastecimento público e existem vários relatos de que MNTs podem sobreviver, manter e crescer em sistemas de água potável (VON REYN et al., 1993, VON REYN et al., 1994, FALKINHAM, 1996, COVERT et al., 1999).



FIGURA 3. Distribuição de casos de infecção por MCR no Brasil no período de 2003 a 2008. Cinza – estados com incidência; Branco – estados sem incidência. Fonte: ANVISA, 2008.

Alguns estudos relatam a persistência desses microrganismos em ambientes hospitalares pelo fato de não serem destruídos por desinfetantes e tolerarem variações de pH e temperaturas. Assim, as MNT podem ser encontradas em equipamentos médicos inadequadamente desinfetados contribuindo para a ocorrência de infecções hospitalares (SHIN et al., 2007).

Segundo o Departamento de Vigilância Epidemiológica, da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (DEVEP/SVS/MS), através da Nota Técnica nº 2/ 2007, (ANVISA, 2007a), a hipótese de causa mais provável para o surto é a de contaminação dos materiais e instrumentos, decorrente de falhas em uma das etapas de seu reprocessamento utilizadas em videocirurgias.

Devido os relatos sobre a possível resistência a glutaraldeído por micobactéria de crescimento rápido disseminada em território brasileiro, a ANVISA publicou em 23 de outubro de 2008 a Resolução RDC nº 75, que dispõe sobre a necessidade de comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente a *Mycobacterium massiliense* e *Mycobacterium abscessus* (BRASIL, 2008) por parte dos fabricantes, além da cepa de *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062, que já é recomendada pelo método e que os laudos devem seguir

a metodologia estabelecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Porém, em 21 de outubro de 2009, a ANVISA publicou a Resolução RDC nº 51, revogando a RDC nº 75/2008, e estabeleceu novos critérios de comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente a *Mycobacterium massiliense*, seguindo a metodologia do INCQS e não mais exigindo como obrigatória a comprovação da eficácia de *Mycobacterium abscessus* (BRASIL, 2009).

1.3 DESINFETANTES E SUAS LEGISLAÇÕES VIGENTES

Os desinfetantes pertencem à classe denominada saneante com ação antimicrobiana (BRASIL, 2007). Esses produtos podem apresentar em suas formulações diferentes princípios ativos, tais como aldeídos, compostos fenólicos, álcoois, quaternários de amônio, entre outros, e, para serem comercializados, devem ter a eficácia antimicrobiana comprovada quando da solicitação do registro ou da revalidação do mesmo junto a ANVISA.

Estão submetidos ao regime de Vigilância Sanitária através das seguintes legislações: Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976 (BRASIL, 1976), regulamentada pelo Decreto nº 79094, de 05 de janeiro de 1977 (BRASIL, 1977a); Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977 (BRASIL, 1977b) e a Lei nº 9782, de 26 de janeiro 1999 (BRASIL, 1999).

A Lei nº 6360/76 (BRASIL, 1976) dispõe sobre a vigilância a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos; o Decreto nº 79094/77 (BRASIL, 1977a) regulamenta a Lei nº 6360/76; a Lei nº 6437/77 (BRASIL, 1977b) configura as infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas e, a Lei nº 9782/99 (BRASIL, 1999) define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas.

Vigilância Sanitária é a área da Saúde Pública que trata das diversas formas de riscos à saúde, com ênfase no uso e consumo de novos materiais, produtos e

tecnologias encontradas cada vez mais atualmente. Com essa visão encontra-se vigente a Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990, a Lei Orgânica da Saúde, que regulamenta o Sistema Único de Saúde – SUS e define em seu artigo 6º, § 1º, I, que Vigilância Sanitária é o conjunto de ações capaz de prevenir, diminuir ou eliminar riscos à saúde, e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde abrangendo o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionam com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo (BRASIL, 1990). Destaca-se, assim, dentre as competências do SUS, a vigilância de serviços, dos ambientes, dos processos de trabalho e de produtos (ROZENFELD, 2000), como os desinfetantes.

Os desinfetantes atendiam ao disposto em legislações específicas, cumprindo assim as normas para registro dos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana constantes na Portaria da extinta Divisão Nacional de Produtos Saneantes Domissanitários - DISAD nº 15, de 23 de agosto de 1988 (BRASIL, 1988) e na Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007 (BRASIL, 2007) que revogou alguns itens da Portaria DISAD nº15/88 como, por exemplo, as definições e as classificações dos produtos. Porém, em 16 de agosto de 2010, a ANVISA publicou a Resolução RDC nº 35 (BRASIL, 2010) que revoga todos os ditames da Portaria DISAD nº15/88.

Devido a este fato, os desinfetantes passaram a atender ao disposto nas atuais legislações específicas, cumprindo assim as normas para registro dos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana constantes na Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007 (BRASIL, 2007) e na Resolução RDC nº 35, de 16 de agosto de 2010 (BRASIL, 2010). Ambas as resoluções ampliam o escopo de metodologias utilizadas para fins de comprovação de eficácia, podendo ser utilizadas as metodologias da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e do Comitê Europeu de Normatização (CEN).

A Resolução RDC nº 14/2007 foi publicada devido à necessidade de compatibilizar os regulamentos nacionais com os instrumentos harmonizados no MERCOSUL e tem como objetivo definir, classificar e regulamentar as condições para registro e rotulagem dos produtos com ação antimicrobiana a serem comercializados no Brasil (BRASIL, 2007).

Essa resolução técnica compreende os produtos com ação antimicrobiana que se encontram classificados de acordo com o âmbito de aplicação em uso geral, que são definidos como produtos para uso domiciliar e em ambientes públicos; uso hospitalar, que são definidos como produtos para uso exclusivo em hospitais e estabelecimentos relacionados com atendimento à saúde; uso em indústria alimentícia e afins, que são os produtos destinados a serem utilizados em locais dedicados à produção/elaboração, fracionamento ou manipulação de alimentos e os de uso específico, que são definidos como aqueles destinados a um fim específico, segundo as indicações de rótulo (BRASIL, 2007).

Assim como a Resolução RDC nº 14/2007, a Resolução RDC nº 35/2010, que revogou a Portaria DISAD nº 15 de 23 de agosto de 1988 (BRASIL, 1988), foi publicada devido também à necessidade de compatibilizar os regulamentos nacionais com os instrumentos harmonizados no MERCOSUL e tem como objetivo definir, classificar e regulamentar as condições para o registro e rotulagem para os produtos com ação antimicrobiana de uso em assistência à saúde para artigos críticos e semicríticos a serem comercializados. Segundo esta resolução os desinfetantes são classificados de acordo com o nível de desinfecção em desinfetante de nível intermediário, desinfetante de alto nível e esterilizante (BRASIL, 2010).

É importante enfatizar que os desinfetantes hospitalares para superfícies constam da RDC nº 14/07 (BRASIL, 2007), porém os de sinfetantes hospitalares para artigos semicríticos (desinfetante de alto nível), críticos e os esterilizantes estão normatizados pela Resolução RDC nº 35/2010 (BRASIL, 2010).

Segundo a RDC nº 14/07 um desinfetante é definido como “um produto que mata todos os microrganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas em objetos e superfícies inanimadas” (BRASIL, 2007) e, segundo a Resolução RDC nº 35/2010 um desi nfetante hospitalar de alto nível é definido como “produto que destrói todos os microrganismos em um período de tempo comprovado, exceto um número elevado de esporos bacterianos”. São considerados artigos semicríticos aqueles que entram em contato com a pele não íntegra ou com a mucosa do paciente (BRASIL, 2010).

1.4 PRINCÍPIO ATIVO GLUTARALDEÍDO

Um dos princípios ativos mais utilizados como desinfetante hospitalar para artigos semicríticos é o glutaraldeído. O glutaraldeído é um dialdeído saturado (**FIGURA 4**) e sua atividade biocida é devida a ligação cruzada com proteínas da superfície celular e da inibição da síntese de DNA, RNA e outras macromoléculas presentes no microrganismo (McDONNELL, 2007).

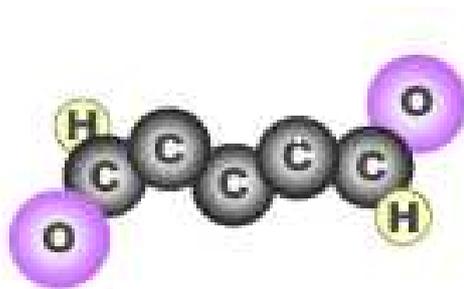


FIGURA 4. Estrutura molecular do Glutaraldeído.

Disponível em: <www.medlab.com.br/docs/denize_demarzo_cidex.pdf>
Acesso em agosto de 2009.

É um desinfetante com amplo espectro de ação (RODRIGUES et al., 1997), agindo sobre bactérias na forma vegetativa, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos e esporos bacterianos (SCOTT; GORMAN, 2001), além de agir na presença de matéria orgânica. Sua atividade ocorre melhor em pH alcalino, entre 7,5 e 8,5, e quando alcalinizado os grupos amino na superfície das células são convertidas em aminas de forma livre, que logo reagem com o glutaraldeído, conduzindo a um efeito bactericida mais rápido (BLOCK, 2001, MCDONNELL, 2007).

O glutaraldeído tem sido utilizado para a esterilização química de materiais médicos e cirúrgicos que não podem ser esterilizados pelo calor ou irradiação (BLOCK, 2001). A solução a 2% é amplamente utilizada para a desinfecção de instrumentos, como endoscópios, instrumentos odontológicos, equipamentos de borracha ou plástico (ANVISA, 2007b), pois não é corrosivo para metais, materiais

de borracha, lentes e cimento de materiais óticos (RUTALA, 1996a). Ele é comercializado sob forma de solução ácida que é ativada através de agentes alcalinizantes e após sua ativação seu prazo de validade varia entre 14 e 28 dias conforme cada fabricante.

Estudos mostraram que a concentração mínima de glutaraldeído eficaz para ser utilizada como desinfetante de alto nível é de 1% (COLLINS; MONTALBINE, 1976). O limite máximo aceitável de exposição da solução no ar é de 0,2 ppm (ANVISA, 2007b), acima deste limite torna-se irritante para a mucosa ocular e o trato respiratório. Epistaxe, dermatites de contato, asma e rinite são observadas em indivíduos expostos ao glutaraldeído (OTERO, 1993, RUTALA, 1995). Porém em um estudo realizado por Souto (2011), onde foi verificada a atividade micobactericida através de um método envolvendo carreadores, de desinfetantes à base de glutaraldeído a 2% frente a cinco cepas de micobactérias (uma MCL e quatro MCR), os resultados indicam a ineficácia de todos os desinfetantes testados (SOUTO, 2011).

1.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DESINFETANTES

O sucesso dos processos de desinfecção e esterilização química depende fundamentalmente da escolha do procedimento, da escolha do produto, da observação dos fatores interferentes e da aplicação correta do produto. A atividade antimicrobiana dos agentes químicos é influenciada por uma variedade de fatores relativos à natureza, estrutura e condições dos microrganismos, aos componentes químicos e físicos do ambiente externo (RUTALA, 1996b, RUSSEL, 2003), e o seu conhecimento é imprescindível para uma adequada aplicação dos processos de desinfecção e esterilização. O número de microrganismos, bem como sua localização, acessibilidade e natureza são exemplos desses fatores.

A atividade antimicrobiana é diretamente relacionada ao número de microrganismos presentes. Quanto maior a carga microbiana maior o tempo de exposição necessário para destruí-la (FAVERO; BOND, 2001). Assim, uma limpeza prévia meticulosa visando reduzir o número de microrganismos, é de grande interesse para o processo de desinfecção (RUTALA, 1987). A localização e a

acessibilidade aos microrganismos devem ser consideradas uma vez que somente as superfícies em contato direto com o produto serão desinfetadas. Equipamentos contendo múltiplas peças devem ser desmontados e imersos completamente no desinfetante, impedindo a formação de bolhas (RUTALA, 1996a).

Os organismos variam consideravelmente quanto à susceptibilidade aos agentes químicos em função da sua constituição, fator importante que determina o espectro de ação dos desinfetantes conforme as classificações existentes na Resolução RDC nº14/07 (BRASIL, 2007) e na Resolução RDC nº 35/2010 (BRASIL, 2010).

Um dos métodos utilizados para a comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos é o Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, descrito no POP INCQS nº65.3210.004, (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a), método esse adotado no Brasil e proveniente da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (TOMASINO, 2007), nele é recomendada a utilização da cepa vacinal de micobactéria, cepa *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) BCG Moreau e pela RDC nº 51/2009, a cepa do surto, *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594 como microrganismos teste.

Esse método indica ainda a utilização do *Middlebrook ADC Enrichment* (ADC) (Difco/ BD/ BBL), constituído de cloreto de sódio, albumina bovina, dextrose e catalase, que corresponde à substância de enriquecimento adicionada a dois dos meios de cultura utilizados na técnica, o Meio Middlebrook 7H9 (7H9) e o Meio de Kirchners (K), meios de cultura convencionais usados para cultivo de micobactérias (BRITTLE et al., 2009, BHATTACHARYA et al., 2009). Esse enriquecimento é fabricado somente pela Difco/ BD/ BBL e possui a validade de apenas oito meses a partir da data de fabricação, o que implica num prazo curto para o seu emprego após cumpridos todos os trâmites de importação para o Brasil. Além disso, trata-se de uma substância com custo alto, e a aquisição de grande volume no Brasil, é ainda dificultada pelo fato do representante possuir exclusividade para a sua comercialização.

Fonseca, Silva e Gontijo Filho (1985) realizaram um estudo onde compararam o crescimento de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, entre elas a cepa de *M. bovis* cepa BCG Moreau, que é a utilizada no ensaio para a avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes para artigos semicríticos, utilizando o

enriquecimento ADC, e outro de menor custo financeiro por ser formulado no próprio laboratório, constituído de soro fetal bovino e glicose (SFBG) e, verificaram que os resultados obtidos não se apresentaram diferentes para os dois enriquecimentos testados como observado através das curvas de crescimento dos microrganismos usados no estudo.

O soro fetal bovino é comumente utilizado como um suplemento padrão e essencial aos meios de cultura celular por fornecer um amplo espectro de macromoléculas, proteínas transportadoras de lipídeos e elementos traços, fatores de ligação e extensão das células, nutrientes de baixo peso molecular, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento, que são responsáveis pela proliferação e manutenção celular (GSTRAUNTHALER, 2003, VAN DER VALK et al., 2004).

Em 2000, Heifets e Sanchez, realizaram uma pesquisa sobre um novo meio de cultura sólido para teste de sensibilidade de *M. tuberculosis* a pirazinamida. Este meio tem um pH ácido de 6,0, para fornecer condições ideais para a atividade da pirazinamida, em vez do habitual de 6,8 utilizado nos meios de ágar. Também difere do meio convencional, o ágar Middlebrook 7H10/7H11, onde o soro fetal bovino (SFB) e o soro fetal eqüino (SFE) são usados em substituição ao enriquecimento ácido oléico-albumina-dextrose-catalase (OADC) para suportar um bom crescimento de *M. tuberculosis* no baixo pH de 6,0. O crescimento no novo meio de cultura com os enriquecimentos à base de SFB e SFE em pH 6,8 foram iguais e às vezes superiores ao cultivo em OADC e, já em pH 6,0 os enriquecimentos à base de soro apresentaram crescimentos superiores.

1.6 JUSTIFICATIVA

Os relatos científicos descrevendo o aparecimento de infecções por micobactérias de crescimento rápido (MCR) em vários países e a notificação nos últimos cinco anos em vários estados no Brasil de infecções hospitalares por MCR levaram à publicação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) da Resolução nº75, de 23 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), posteriormente alterada pela RDC nº51, de 21 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009), na qual é exigida dos fabricantes a comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos

semicríticos contra não somente a cepa de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, como também para *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594. Isso agravou o problema já existente da aquisição do enriquecimento *Middlebrook ADC Enrichment*, utilizado em grande volume na confecção de dois dos três meios de cultura, meio de Kirchners (K) e meio Middlebrook 7H9 (7H9), utilizados no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a) preconizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), já que esse produto além do alto preço é produzido somente por um único fabricante e possui a validade de apenas oito meses a partir da data de fabricação, o que implica em um prazo curto para o seu emprego após cumprir todo o trâmite de importação. Esses fatores contribuíram para que este estudo fosse desenvolvido utilizando-se tanto o enriquecimento comercial ADC, quanto outro enriquecimento de valor mais acessível preparada em laboratório conforme Fonseca, Silva e Gontijo Filho (1985), constituído de soro fetal bovino e glicose (SFBG), a fim de dar subsídios para o desenvolvimento tecnológico de métodos na área de saneantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Realizar a comparação da taxa de crescimento das micobactérias utilizando o enriquecimento comercial *Middlebrook ADC Enrichment* (ADC) e o enriquecimento formulado em laboratório contendo soro fetal bovino adicionado de glicose (SFBG), nos meios de cultura empregados no ensaio para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes frente aos microrganismos exigidos pela legislação vigente a fim de verificar possíveis diferenças nos resultados dos ensaios. Além disso, devido à elevação do número de casos de infecções hospitalares por MCR, as quais apresentam indícios científicos de tolerância à ação de desinfetantes à base de glutaraldeído, e à Resolução RDC nº 51/ 09, publicada pela ANVISA, torna-se necessário avaliar também os dois tipos de enriquecimento, testando o desinfetante frente a diferentes cepas de referência de MCR para verificar seu comportamento em relação aos enriquecimentos empregados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a curva de crescimento de MCR de referências utilizando o meio Proskauer-Beck modificado (PB) e as curvas de crescimento utilizando os meios Middlebrook 7H9 (7H9) e Meio de Kirchners (K) contendo em cada um deles o enriquecimento ADC ou o enriquecimento SFBG. A obtenção das curvas de crescimento foi realizada através da contagem de colônias e da leitura simultânea da densidade ótica;
- Obter a curva de crescimento da cepa de *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062 no meio PB e as curvas de crescimento utilizando os meios 7H9 e K contendo os enriquecimentos ADC e SFBG através da contagem de colônias e da leitura simultânea da densidade ótica;

- Avaliar a qualidade de dois desinfetantes à base de glutaraldeído a 2% utilizando os microrganismos recomendados – cepa *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062 e *M. massiliense* INCQS nº 00594, conforme o POP INCQS nº 65.3210.004 utilizando os enriquecimentos ADC e SFBG;

- Verificar a suscetibilidade das cepas de referência de MCR - *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841 - frente a dois desinfetantes contendo glutaraldeído a 2% conforme o POP INCQS nº 65.3210.004, utilizando os enriquecimentos ADC e SFBG.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas as cepas *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, microorganismo de referência de crescimento lento preconizado no Método para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (TOMASINO, 2007) e *M. massiliense* INCQS nº 00594, que foi incluída na metodologia estabelecida pelo INCQS, e exigida oficialmente, para avaliar a qualidade dos desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos de acordo com a recente publicação da RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009). As cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *M. chelonae* ATCC 35572, *M. fortuitum* ATCC 6841 e *M. abscessus* ATCC 19977 também foram utilizadas.

3.1.1 Manutenção da cepa de *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062

O microorganismo liofilizado em ampola foi reconstituído seguindo-se as recomendações da ATCC (ATCC, 2008) e da AOAC (TOMASINO, 2007). Primeiramente, o líofilo foi reconstituído com aproximadamente 0,5 mL de meio Middlebrook 7H9 (ANEXO A). Posteriormente, foram transferidas alíquotas de aproximadamente 0,2 mL para três tubos com Ágar Middlebrook 7H9 inclinado (ANEXO A), que foram incubados por 20 dias a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ e as culturas foram estocadas em geladeira a $2-5^\circ \text{C}$ por um mês. A cultura estoque foi renovada através de repiques mensais em três tubos de Ágar Middlebrook 7H9 e também a cada seis meses através da abertura de uma nova ampola, contendo o microorganismo liofilizado.

3.1.2 Manutenção de *M. massiliense* INCQS nº 00594

O microrganismo liofilizado em ampola foi reconstituído seguindo as recomendações do POP INCQS nº 653210.004 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a). Primeiramente, o líófilo foi reconstituído com aproximadamente 0,5 mL de meio Middlebrook 7H9. Posteriormente foram transferidas alíquotas de aproximadamente 0,2 mL para três tubos contendo meio Löwestein-Jensen (ANEXO A), que foram incubados por 5 a 7 dias a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ e as culturas foram estocadas em geladeira a $2-5^\circ \text{C}$ por um mês. A cultura estoque foi renovada através de repiques mensais em três tubos de meio Löwestein-Jensen e também a cada seis meses através da abertura de uma nova ampola contendo o microrganismo liofilizado.

3.1.3 Manutenção das micobactérias de crescimento rápido de referência

As cepas de MCR de referência de *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752 e *M. fortuitum* ATCC 6841 foram cedidas pelo Laboratório de Micobactérias do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Essas cepas foram mantidas em meio Löwestein-Jensen através de repiques mensais, sendo essa realizada a partir da inoculação de uma alçada do microrganismo estoque em um tubo contendo 1mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbató onde foram acrescentadas pérolas de vidro. O conteúdo deste tudo foi homogeneizado em agitador de tubos e alíquotas de 0,2 mL dessa suspensão foram transferidas para três tubo contendo meio Löwestein-Jensen, incubados por 7 dias a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ e as culturas estocadas em geladeira a $2-5^\circ \text{C}$.

A manutenção desses microrganismos em glicerol foi realizada a partir da transferência de uma alçada do microrganismo estoque para um tubo contendo pérolas de vidro, que foi levado à agitação por 15 segundos em agitador de tubos. Uma alíquota de 4 mL de tampão fosfato glicerol a 15% pH 7,4 (ANEXO A) foi adicionada ao tubo e levado novamente a agitação. A suspensão permaneceu em

repouso durante 10 minutos e depois foram transferidas alíquotas de 1,2 mL para criotubos que foram estocados em freezer a -20°C e -70°C.

3.2 PRODUTOS DESINFETANTES

Foi utilizado um desinfetante à base de glutaraldeído a 2% ativado imediatamente antes do ensaio, obedecendo à recomendação de uso do fabricante. Esse produto foi identificado neste trabalho como desinfetante A.

Foi utilizado também um outro produto à base de glutaraldeído a 2% comercializado pronto para uso, sem necessidade de ativação. Esse produto foi identificado neste trabalho como desinfetante B.

A avaliação do teor dos produtos foi realizada pelo Setor de Saneantes e Cosméticos do Departamento de Química do INCQS, de acordo com o POP INCQS nº 65.3110.026 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009b).

3.3 ENRIQUECIMENTOS DOS MEIOS DE CULTURA

Tanto o produto comercial denominado *Middlebrook ADC Enrichment* (ADC) (ANEXO A) fabricado pela Difco/BD/BBL, como o enriquecimento preparado em laboratório constituído de soro fetal bovino e de glicose a 0,2 % (SFBG) (ANEXO A), foram adicionados aos meios de cultura Middlebrook 7H9 (7H9) e Kirchners (K) (ANEXO A). Todos os meios de cultura empregados na realização deste estudo foram obtidos comercialmente de seus fornecedores na forma desidratada.

3.4 OBTENÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO DAS MICOBACTÉRIAS

3.4.1 Micobactérias de crescimento rápido de referência

A partir de cada cultura estoque de *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752 e *M. fortuitum* ATCC 6841 em meio Löwestein-Jensen foram preparados cinco tubos de pré-inóculos contendo 10 mL dos seguintes meios de cultura: PB (ANEXO A), K com ADC, K com SFBG, 7H9 com ADC e 7H9 com SFBG. Os pré-inóculos foram incubados por 3 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, uma alíquota de 0,1 mL da suspensão bacteriana foi inoculada assepticamente em 10 tubos contendo 10 mL dos respectivos meios líquidos citados anteriormente, essa inoculação foi realizada em triplicata perfazendo um total de 30 tubos inoculados por meio de cultura. As culturas foram incubadas por 1 a 10 dias (**FIGURA 5**). Após cada período de incubação, o conteúdo do tubo era homogeneizado em agitador de tubos até a completa homogeneização visual (FONSECA; DA SILVA; GONTIJO FILHO, 1985), sendo a contagem realizada através da contagem de colônias, onde a partir dos tubos de meio de cultura homogeneizados, foram retiradas alíquotas de 100 μL de cada tubo de meio de cultura, realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} com 900 μL de água purificada em microtubos (**FIGURA 6**). Após as diluições, foram retiradas alíquotas de 10 μL de cada diluição referente ao respectivo meio de cultura em triplicata (PB, K e 7H9 com ADC e com SFBG) e semeadas em duas placas contendo Ágar Müeller Hinton (ANEXO A) (**FIGURA 7**). As placas foram incubadas por 5 a 7 dias a $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram lidas apenas as diluições que apresentavam contagem de colônias na faixa de 0 a 30 UFC/ 10 μL (CHEN; NACE; IRWIN, 2003).

A partir das culturas incubadas por 1 a 10 dias, após homogeneização, foram retiradas alíquotas de 3 mL de cada tubo que foram analisadas por espectrofotometria para determinação da densidade ótica (DO) em transmitância a 650nm utilizando o espectrofotômetro Shimadzu UV - 1601.

A curva de crescimento foi obtida a partir de dois experimentos independentes, sendo que no primeiro, foi semeada apenas uma placa de ágar

Müeller Hinton dos microrganismos *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. chelonae*.

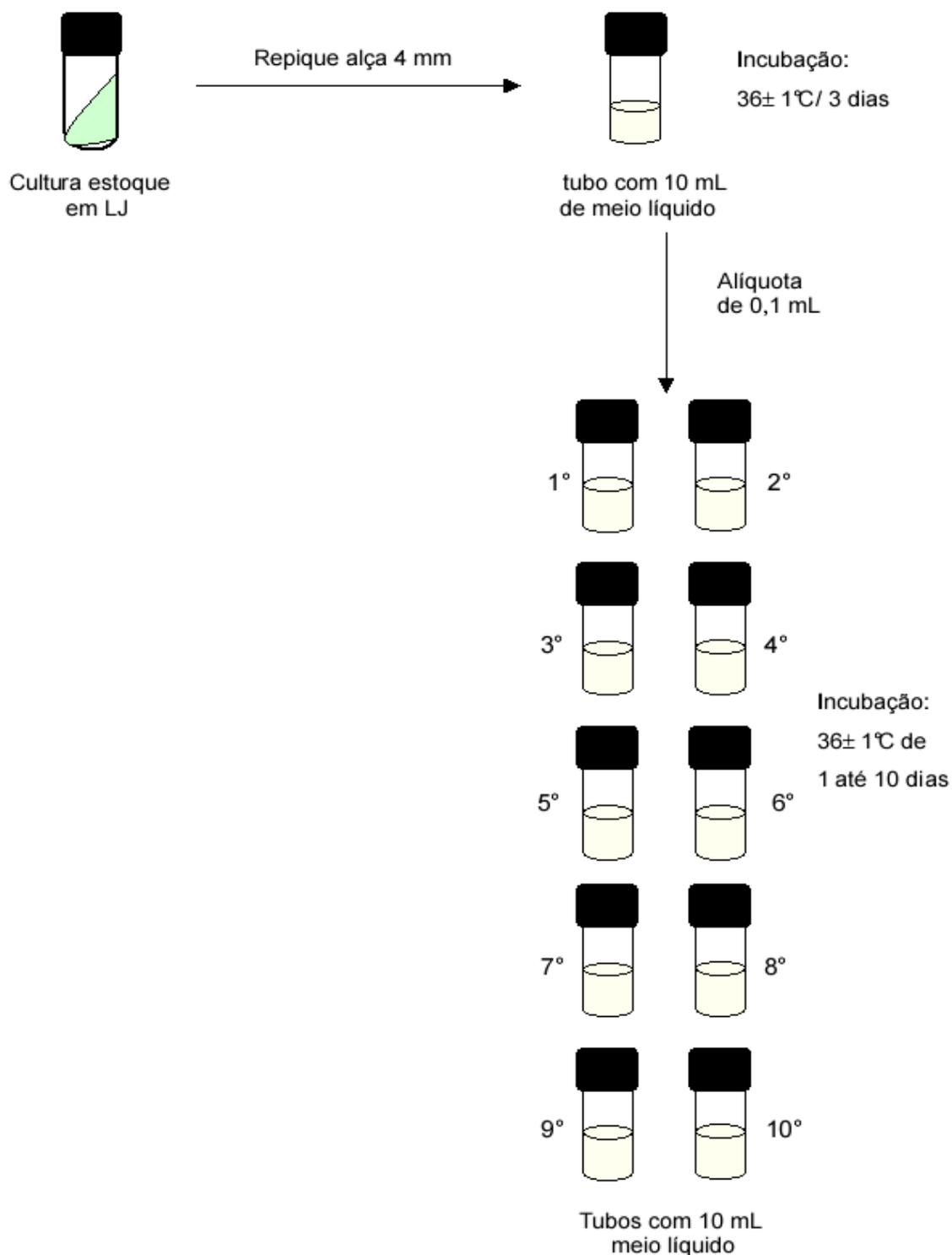


FIGURA 5. Representação esquemática do procedimento de crescimento para as micobactérias de crescimento rápido. LJ – Meio Löwestein-Jensen.

Para análise estatística foi aplicado teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, utilizando função específica do programa Office Excel ano 2003 versão SP3 da *Microsoft Corporation* e o programa BioEstat ano 2007 versão 5.0 para análise dos resultados.

3.4.2 Cepa *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062

A partir da cultura estoque da cepa de *M. bovis* em Ágar Middlebrook 7H9 inclinado foram preparados cinco tubos de pré-inóculos contendo 10 mL dos seguintes meios de cultura: PB, K com ADC, K com SFBG, 7H9 com ADC e 7H9 com SFBG. Os pré-inóculos foram incubados por 10 a 12 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, uma alíquota de 0,1 mL da suspensão bacteriana foi inoculada assepticamente em 6 tubos contendo 10 mL dos respectivos meios líquidos citados anteriormente, essa inoculação foi realizada em triplicata perfazendo um total de 18 tubos inoculados por meio de cultura. As culturas foram incubadas por 6, 10, 15, 20, 25 e 31 dias. Após cada período de incubação, o conteúdo do tubo era homogeneizado em agitador de tubos até a completa homogeneização visual (FONSECA; DA SILVA; GONTIJO FILHO, 1985), sendo a contagem realizada através da contagem de colônias, onde a partir dos tubos de meio de cultura homogeneizados, foram retiradas alíquotas de 100 μL de cada tubo de meio de cultura, realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} com 900 μL de água purificada em microtubos. Após as diluições, foram retiradas alíquotas de 10 μL de cada diluição referente ao respectivo meio de cultura em triplicata (PB, K e 7H9 com ADC e com SFBG) e semeadas em duas placas contendo Ágar Middlebrook 7H9. As placas foram incubadas por 20 dias a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram lidas apenas as diluições que apresentavam contagem de colônias na faixa de 0 a 30 UFC/ 10 μL (CHEN; NACE; IRWIN, 2003).

A partir das culturas incubadas por 6, 10, 15, 20, 25 e 31 dias, após homogeneização, foram retiradas alíquotas de 3 mL de cada tubo que foram

analisadas por espectrofotometria para determinação da densidade ótica (DO) em transmitância a 650nm utilizando o espectrofotômetro Shimadzu UV - 1601.

A curva de crescimento foi obtida a partir de dois experimentos independentes após aplicação de teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, utilizando função específica do programa Office Excel ano 2003 versão SP3 da *Microsoft Corporation* e o programa BioEstat ano 2007 versão 5.0 para análise dos resultados.

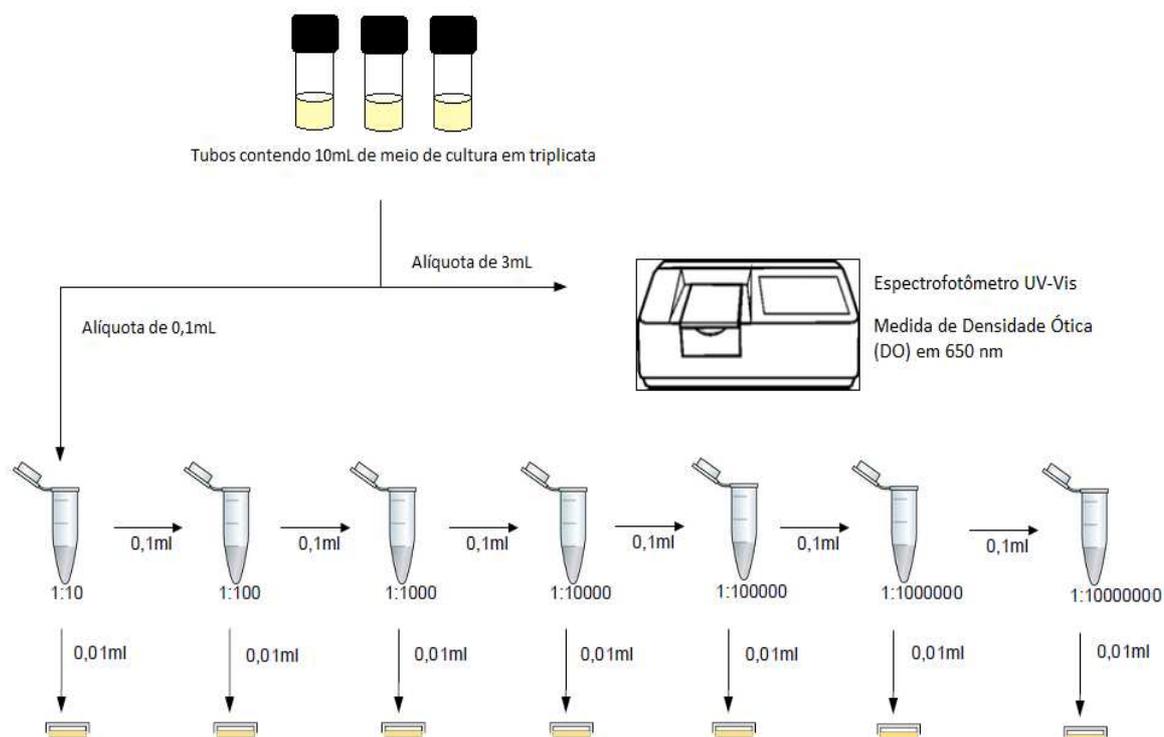


FIGURA 6. Representação esquemática da diluição das micobactérias para a obtenção da curva de crescimento através da contagem de colônias e leituras por espectrofotometria. UV – Ultra-Violeta, Vis – Visível.

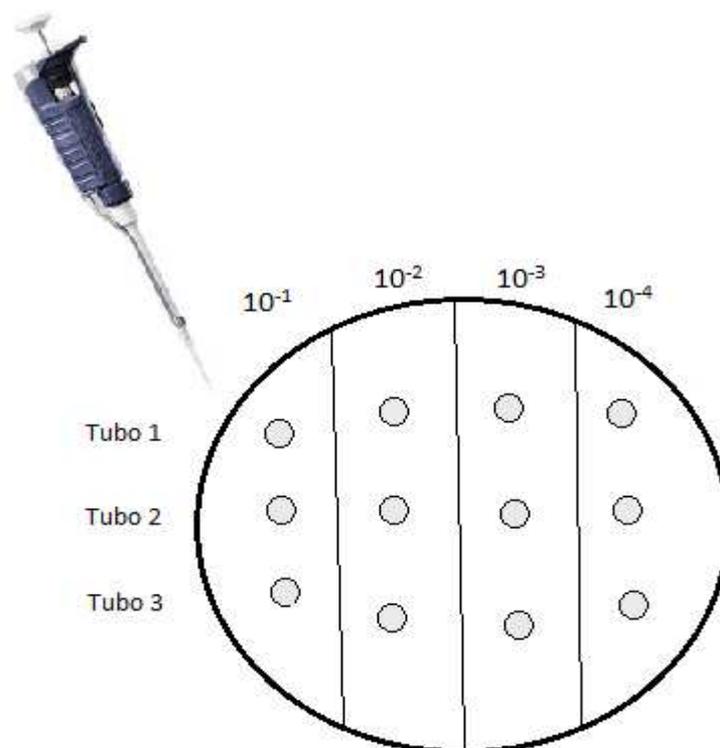


FIGURA 7. Esquema da inoculação das diluições de cada meio de cultura em triplicata em placa de Petri contendo Ágar Müller Hinton.

3.5 VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DOS PRODUTOS DESINFETANTES

A qualidade dos desinfetantes foi verificada através do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes - POP INCQS nº 65.3210.004 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a). Para cada desinfetante foram realizados os procedimentos a seguir.

A partir da cultura estoque da cepa *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062 e *M. massiliense* INCQS nº 00594 foram semeados 10 tubos contendo 10 mL de caldo PB que foram incubados por 21-25 e 5-7 dias, respectivamente, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ (**FIGURA 8**).

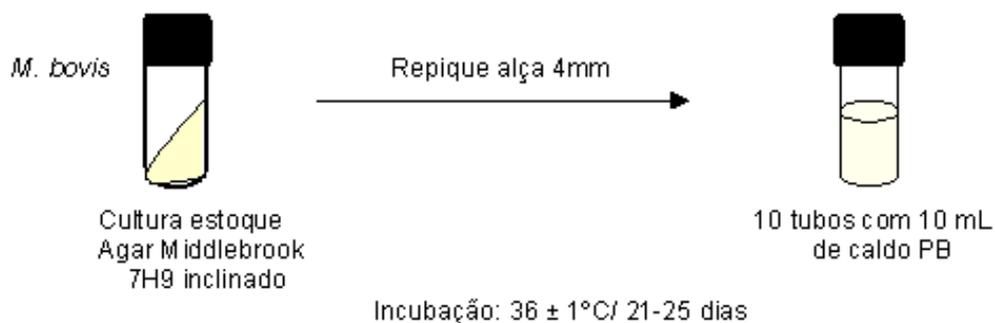


FIGURA 8. Etapa inicial da preparação do inóculo de *M. bovis* realizada a partir da cultura estoque. PB – Caldo Proskauer-Beck modificado, M - *Mycobacterium*.

Às culturas da cepa de *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062 foram adicionados 1,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato 80 e pérolas de vidro, nas culturas de *M. massiliense* foram adicionadas apenas pérolas de vidro. Essas culturas foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador de tubos. Após o tempo de aproximadamente 5 minutos em repouso para permitir a sedimentação das partículas maiores, os sobrenadantes de cada tubo de cultura em PB foram transferidos para um tubo de ensaio ou para um erlenmeyer estéril, a partir do qual foi preparada uma suspensão a 20% de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm utilizando o próprio meio de cultura. Ao tubo contendo 15 mL da suspensão T20% foram transferidos 12 cilindros de porcelana estéreis onde, após permanecerem por 15 minutos foram transferidos com o auxílio de um gancho de transferência para uma placa de Petri contendo 2 folhas de papel de filtro de forma que fossem mantidos na posição vertical, e levados à estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 minutos (**FIGURA 9**).

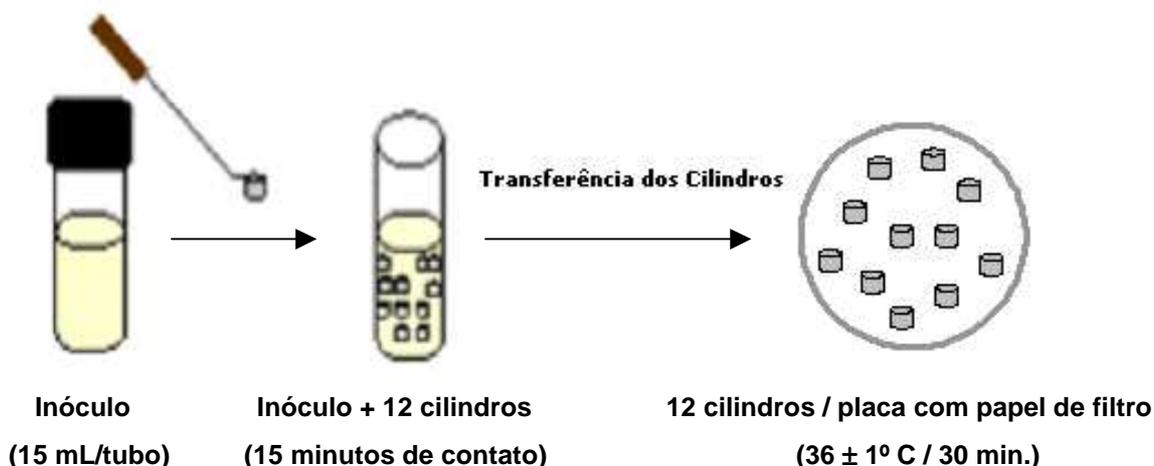


FIGURA 9. Transferência dos cilindros contaminados pela suspensão T20% para placa de Petri contendo duas folhas de papel de filtro.

Após a incubação, dez cilindros foram transferidos, cronometradamente, a intervalos de tempo de 1 minuto para os respectivos tubos contendo 10 mL de desinfetante à temperatura de 20 ± 1 °C. Os demais cilindros que sobraram foram utilizados para controle. Após 30 minutos de contato com o desinfetante os cilindros foram transferidos obedecendo ao mesmo intervalo de tempo anterior, ou seja, de um minuto, para os respectivos tubos contendo 10 mL de soro estéril de cavalo, com o objetivo de neutralizar o desinfetante e, depois para os respectivos tubos contendo 20 mL de caldo Proskauer-Beck modificado. De cada um dos 10 tubos contendo o soro de cavalo foram retiradas alíquotas de 4 mL para transferir 2 mL para o tubo contendo 20 mL do meio Middlebrook 7H9 e 2 mL para o tubo contendo 20 mL do meio de Kirchners correspondentes. Os tubos contendo os meios PB, K e 7H9 foram incubados por 60 dias em estufa a 36 ± 1 °C, e caso não se evidenciasse crescimento ou o crescimento observado fosse tênue, estes seriam re-incubados por um tempo adicional de 30 dias (**FIGURA 10**).

A qualidade dos desinfetantes também foi avaliada realizando-se o ensaio com os enriquecimentos ADC e SFBG adicionados aos meios 7H9 e K.

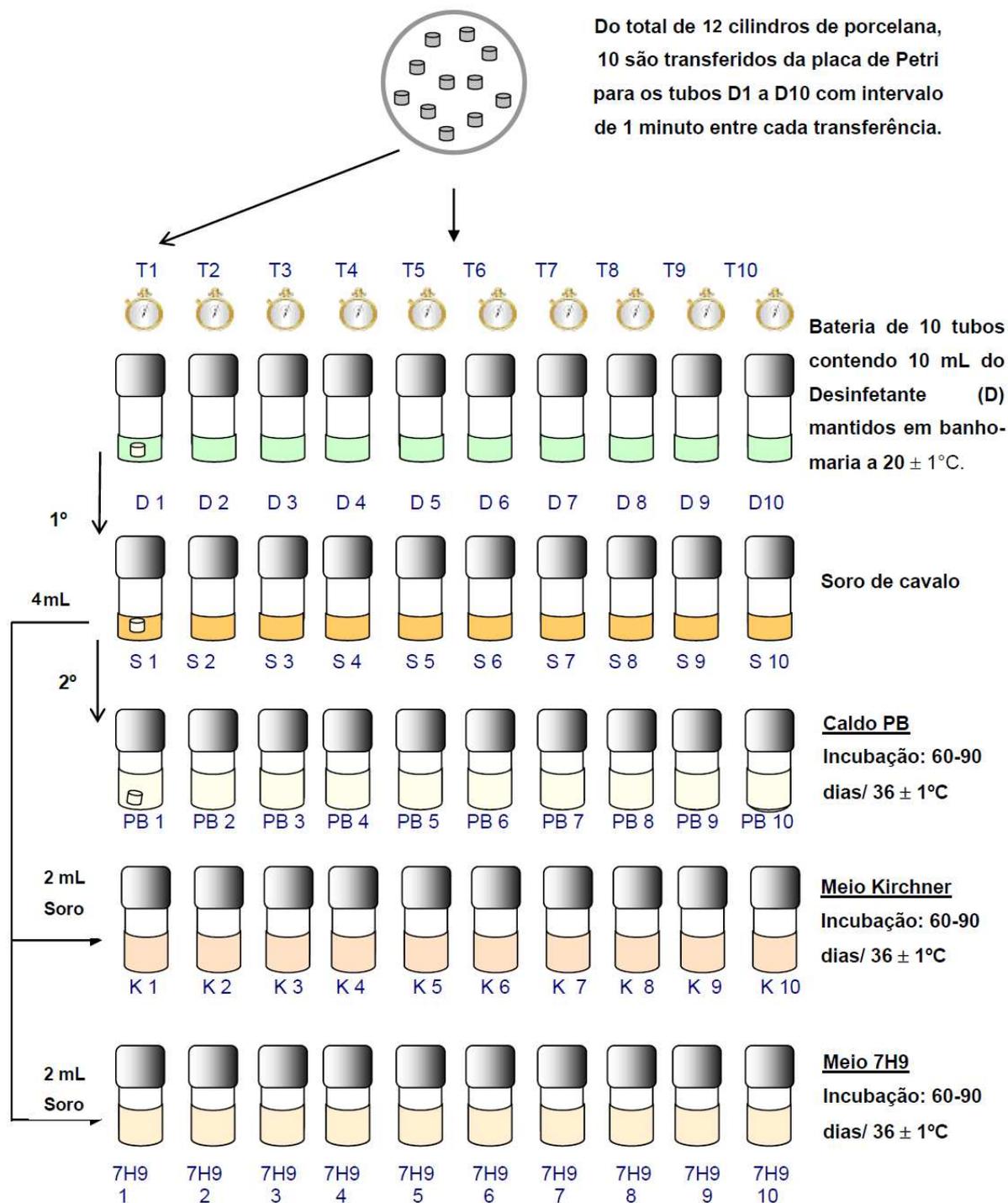


FIGURA 10. Esquema da transferência dos cilindros entre tubos utilizados no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes - POP INCQS nº 65.3210.004 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a). T1 a T10 – Indica o tempo de transferência dos cilindros para os tubos D1 a D10, D1 a D10 – Tubos numerados de 1 a 10 contendo desinfetante, S1 a S10 – Tubos numerados de 1 a 10 contendo soro de cavalo, PB1 a PB10 - Tubos numerados de 1 a 10 contendo Caldo Proskauer-Beck modificado, K1 a K10 - Tubos numerados de 1 a 10 contendo Meio de Kirchners, 7H9-1 a 7H9-10 - Tubos numerados de 1 a 10 contendo Meio Middlebrook 7H9.

3.5.1 Controles de Esterilidade

Todo material envolvido no ensaio foi testado quanto a sua esterilidade. Os controles a serem realizados foram descritos abaixo.

3.5.1.1 *Esterilidade dos Meios de Cultura*

A esterilidade dos meios de cultura foi verificada incubando um tubo do mesmo lote, a ser utilizado nos ensaios, de cada um dos meios de cultura - PB, K e 7H9 com ADC e com SFBG – incubando a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60-90 dias. Não deve ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.5.1.2 *Esterilidade da Água Purificada*

Neste procedimento foram adicionados 0,2 mL da água purificada estéril, usada para diluir o fenol a 5%, a um tubo contendo o meio de cultura Proskauer-Beck modificado e incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60-90 dias, e não deve ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.5.1.3 *Esterilidade dos Lotes de Pipeta*

Foi separada uma pipeta de cada lote utilizado no ensaio, e com o auxílio de um pipetador automático o caldo Proskauer-Beck modificado foi aspirado até acima

da marcação da graduação, permitindo logo em seguida, a saída do líquido para o mesmo tubo. Este procedimento foi repetido 3 vezes. O tubo foi incubado a $36 \pm 1^\circ$ C por 60-90 dias, e não deve ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.5.1.4 *Esterilidade do Cilindro de Porcelana*

Um cilindro estéril, do lote empregado no ensaio, foi transferido para um tubo contendo caldo Proskauer-Beck modificado utilizado no ensaio e incubado a $36 \pm 1^\circ$ C por 60-90 dias, e não deve ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.5.1.5 *Esterilidade do Soro de Cavalo*

Neste procedimento foram adicionados 2 mL do soro de cavalo estéril a um tubo do mesmo lote de todos os meios de cultura utilizados no ensaio – PB, K e 7H9 – e incubados a $36 \pm 1^\circ$ C por 60-90 dias, e não deve ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.5.1.6 *Esterilidade da Solução de Cloreto de Sódio a 0,85% com 0,1% de Polissorbato*

Neste procedimento foram adicionados 0,2 mL da solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato estéril, utilizada para preparar a suspensão

bacteriana da cultura teste da cepa de *M. bovis* BCG Moreau, a um tubo contendo o caldo Proskauer-Beck modificado e incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60-90 dias, e não deve ser observado crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.5.2 Controles Positivos

Os controles positivos foram realizados através da verificação da viabilidade do meio de cultura. Um cilindro contaminado e seco foi transferido para um tubo contendo o mesmo lote de todos os meios de cultura utilizados no ensaio e incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60-90 dias. Após esse tempo de incubação deve ser observado crescimento característico do microrganismo (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.5.3 Controle de Resistência do Microrganismo

A cultura teste foi verificada quanto à sua resistência ao fenol, como descrito no POP INCQS nº 65.3210.004 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a). A partir da solução estoque de fenol a 5% (1:20) foram preparadas soluções a 1:50 e 1:75 utilizando água purificada estéril. O controle da resistência da cultura teste foi realizado da mesma forma descrita no item 3.5 utilizando as soluções de fenol 1:75 e 1:50 no lugar do desinfetante, e os microrganismos teste permanecendo nas soluções de fenol pelo tempo de contato de 10 minutos.

Critério de avaliação: o microrganismo deve sobreviver sobre os 10 cilindros frente à solução 1:75 e deve ser eliminado frente à solução 1:50 após os 10 minutos de contato (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE,

2009a). De acordo com os resultados apresentados o microrganismo foi considerado resistente, sensível ou dentro do padrão desejado.

O controle do microrganismo foi também avaliado realizando o ensaio com os enriquecimentos ADC e SFBG adicionados aos meios 7H9 e K.

3.5.4 Leitura dos resultados

Realizada através da presença ou ausência de crescimento microbiano. No caso de crescimento, este foi confirmado através da presença de BAAR (bacilos álcool – ácido resistentes), corando pelo Método de Ziehl-Neelsen (KANTOR, 1979, INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.5.5 Interpretação dos resultados

O desinfetante deve ser capaz de matar o microrganismo teste sobre os dez cilindros carreadores presentes no meio PB e não deve ocorrer crescimento microbiano nas alíquotas de 2 mL do soro de cavalo inoculadas nos meios de cultura de K e 7H9 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.6 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DAS MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO DE REFERÊNCIA UTILIZANDO OS DIFERENTES ENRIQUECIMENTOS

A suscetibilidade de *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35572 e *M. fortuitum* ATCC 6841 foi verificada através da realização do mesmo ensaio

empregado para avaliar a qualidade do desinfetante descrito no item 3.5, utilizando os enriquecimentos ADC e SFBG adicionados aos meios 7H9 e K.

De acordo com o número de tubos que apresentou crescimento nos ensaios de avaliação da atividade micobactericida dos desinfetantes utilizando-se às cepas de MCR foi estabelecido um critério de classificação onde as cepas foram consideradas fracamente tolerantes (1 a 10 tubos), médio tolerantes (11 a 20 tubos) e altamente tolerantes (21 a 30 tubos) (LANGSRUD; SUNDHEIM, 1997).

4 RESULTADOS

4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DAS MICOBACTÉRIAS

4.1.1 *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977

Para obtenção da curva de crescimento desta MCR, as culturas foram incubadas por 1 a 10 dias, e após cada período de incubação as culturas obtidas nos tubos contendo PB (3 tubos), K (3 tubos com ADC e 3 tubos SFBG) e 7H9 (3 tubos com ADC e 3 tubos com SFBG) foram homogeneizadas em agitador de tubos até a completa homogeneização visual (FONSECA; DA SILVA; GONTIJO FILHO, 1985), sendo então realizada a contagem das UFC através da contagem de colônias, onde a partir dos tubos de meio de cultura homogeneizados, foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada tubo de meio de cultura, realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} com 900 µL de água purificada em microtubos. De cada diluição foram retiradas alíquotas de 10 µL que foram semeadas em duplicata em placas contendo Ágar Müeller Hinton que ficaram incubadas por 7 dias a $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Após o período de incubação foram realizadas as leituras das UFC. Foi utilizada para fins de cálculo a diluição que estava dentro da faixa estabelecida, perfazendo assim um total de nove resultados provenientes de dois experimentos independentes. O cálculo foi realizado baseado na mediana dos resultados das leituras das placas de cada meio de cultura utilizado (**TABELA 2**).

A **FIGURA 11** exibe o crescimento de *M. abscessus* em Ágar Müeller Hinton oriundo de meio 7H9 som SFBG.

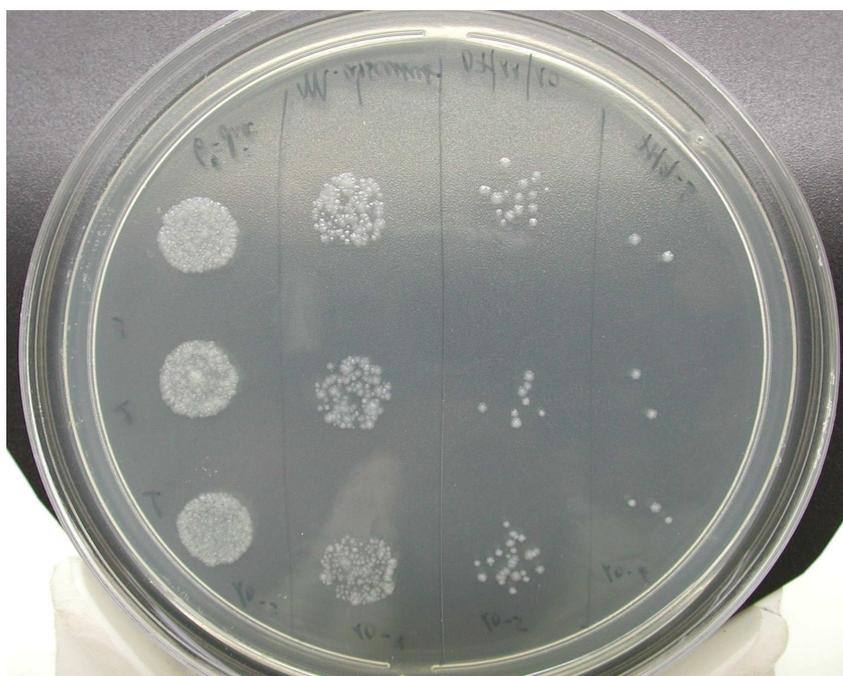


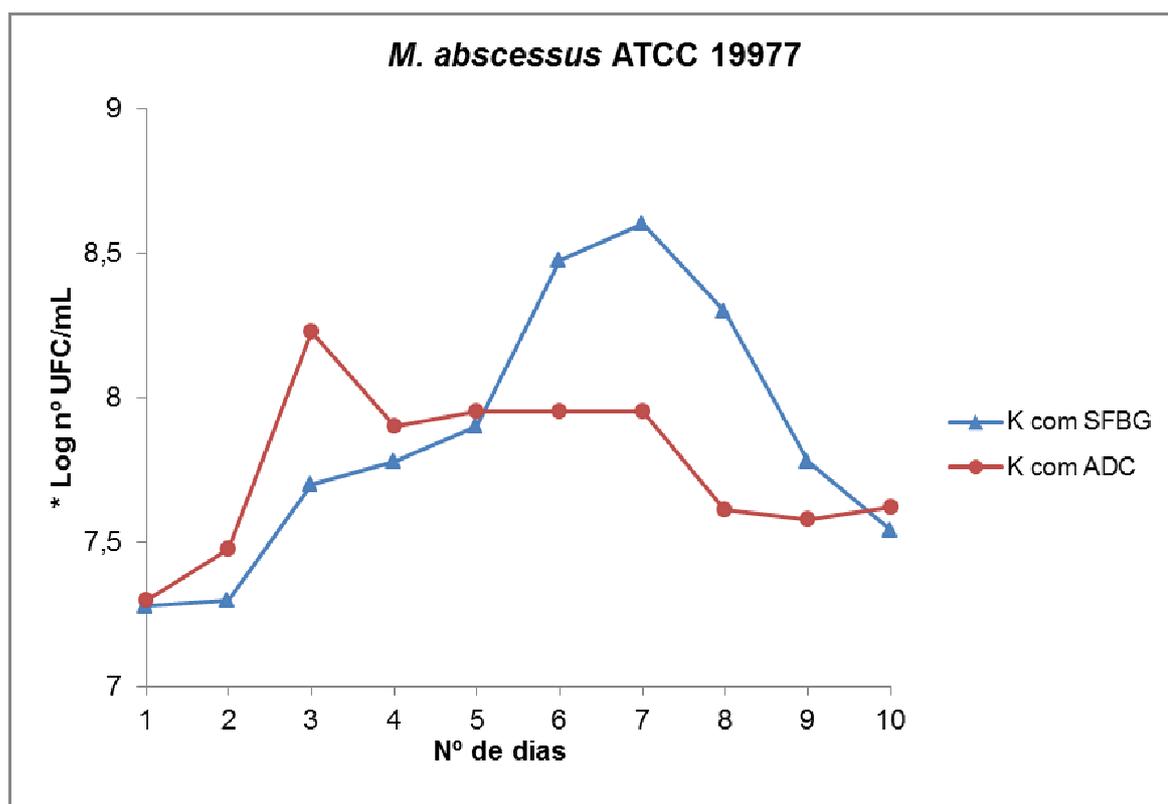
FIGURA 11. Crescimento de *M. abscessus* em Ágar Müller Hinton. Esta micobactéria havia sido previamente crescida no meio 7H9 com SFBG. SFBG – enriquecimento à base de Soro Fetal Bovino com Glicose, 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, M - *Mycobacterium*.

TABELA 2. Resultados do número de unidades formadoras de colônias/mL para *Mycobacterium abscessus* obtidos através da contagem de colônias

<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977	Leituras	Proskauer-Beck *	Kirchners com ADC *	Kirchners com SFBG *	7H9 com ADC *	7H9 com SFBG *
		(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)
	1º dia	1,1E+05	2,0E+07	1,9E+07	4,0E+06	1,0E+07
	2º dia	5,0E+05	3,0E+07	2,0E+07	3,0E+07	2,8E+07
	3º dia	1,0E+07	1,7E+08	5,0E+07	2,3E+08	3,0E+07
	4º dia	1,2E+08	8,0E+07	6,0E+07	4,0E+08	6,0E+07
	5º dia	9,0E+07	9,0E+07	8,0E+07	7,0E+08	9,0E+07
	6º dia	9,0E+07	9,0E+07	3,0E+08	1,3E+09	2,0E+08
	7º dia	2,0E+07	9,0E+07	4,0E+08	6,0E+08	5,0E+08
	8º dia	4,0E+07	4,1E+07	2,0E+08	8,0E+08	1,4E+09
	9º dia	2,0E+07	3,8E+07	6,0E+07	1,2E+09	2,0E+09
	10º dia	2,0E+06	4,2E+07	3,5E+07	4,5E+08	6,0E+08

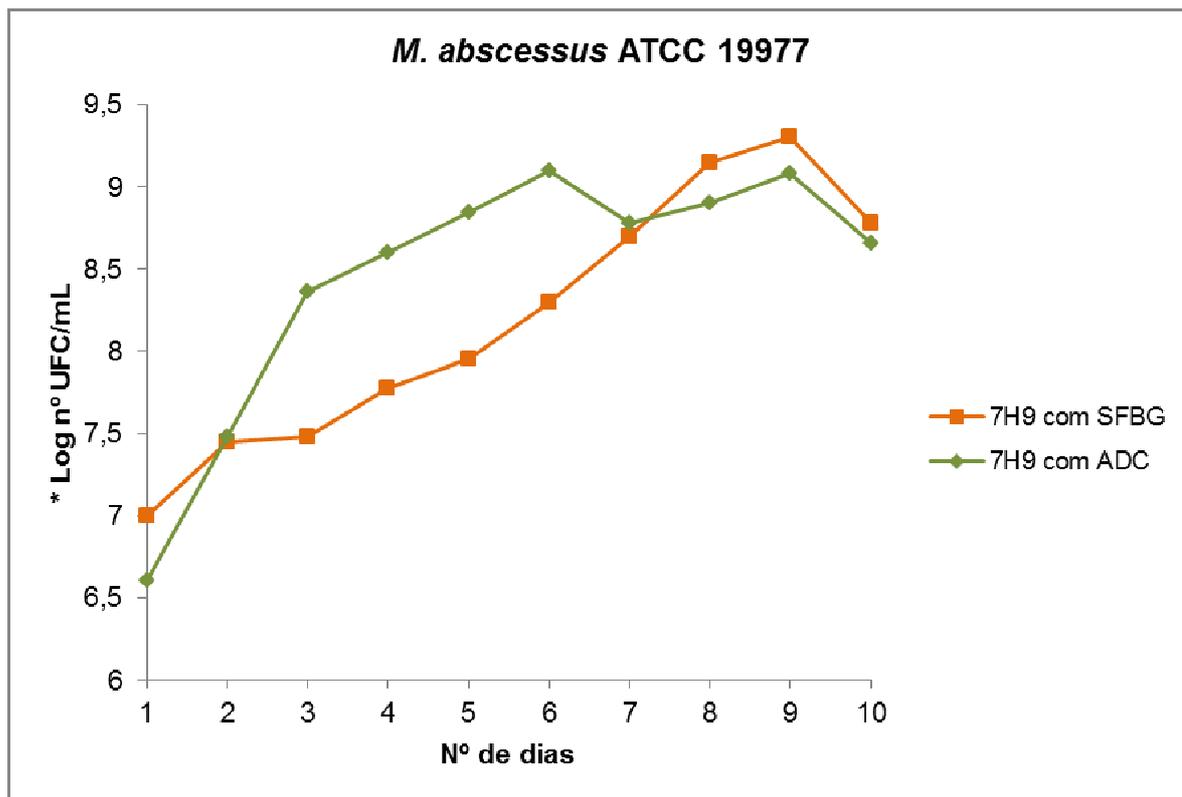
*Os resultados referem-se à mediana de nove leituras. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, ATCC - *American Type Culture Collection*.

A partir da obtenção do gráfico da curva de crescimento para *M. abscessus* nos meios K com SFBG e K com ADC durante os dez dias de incubação, observou-se que esta micobactéria demonstrou um crescimento significativo, apresentando com o enriquecimento ADC um pico de crescimento no terceiro dia e com o enriquecimento SFBG um pico de crescimento no sétimo dia (**FIGURA 12**). Para a curva de crescimento de *M. abscessus* em 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC, houve também um crescimento significativo deste microrganismo, sendo que o mesmo apresentou curvas de crescimento similares com o enriquecimento SFBG e com o enriquecimento ADC, porém, com um pico de crescimento no nono dia em 7H9 com SFBG e em 7H9 com ADC observou-se um pico de crescimento no sexto dia (**FIGURA 13**).



*O gráfico representa o log das medianas de nove leituras.

FIGURA 12. Curva de crescimento de *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977 nos meios K com SFBG e K com ADC. K – Meio de Kirchners, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, ATCC - American Type Culture Collection, M - *Mycobacterium*.



*O gráfico representa o log das medianas de nove leituras.

FIGURA 13. Curva de crescimento de *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, ATCC - American Type Culture Collection, M - *Mycobacterium*.

Apesar das curvas apresentarem picos de crescimento de *M. abscessus* com os meios K com ADC, K com SFBG, 7H9 com ADC e 7H9 com SFBG, através da análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5%, percebeu-se que não houve interferência destes picos de crescimento na comparação dos dois enriquecimentos e, que o enriquecimento à base de Soro Fetal Bovino com Glicose comparado com o enriquecimento ADC não interferiu no crescimento de *M. abscessus*, ou seja, não houve diferença significativa entre os enriquecimentos testados. Os valores de p foram todos acima de 0,05, dentro do limite de confiança de 95% (TABELA 3).

TABELA 3. Resultado da análise estatística da comparação do crescimento de *M. abscessus* em meio de Kirchners e meio Middlebrook 7H9.

<i>M. abscessus</i> ATCC 19977		<i>K com SFBG versus K com ADC</i>	<i>7H9 com SFBG versus 7H9 com ADC</i>
	p-valor	0.8201	0.4494

Valor de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. K – Meio de Kirchners, 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - *American Type Culture Collection*, M - *Mycobacterium*.

4.1.2 *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841

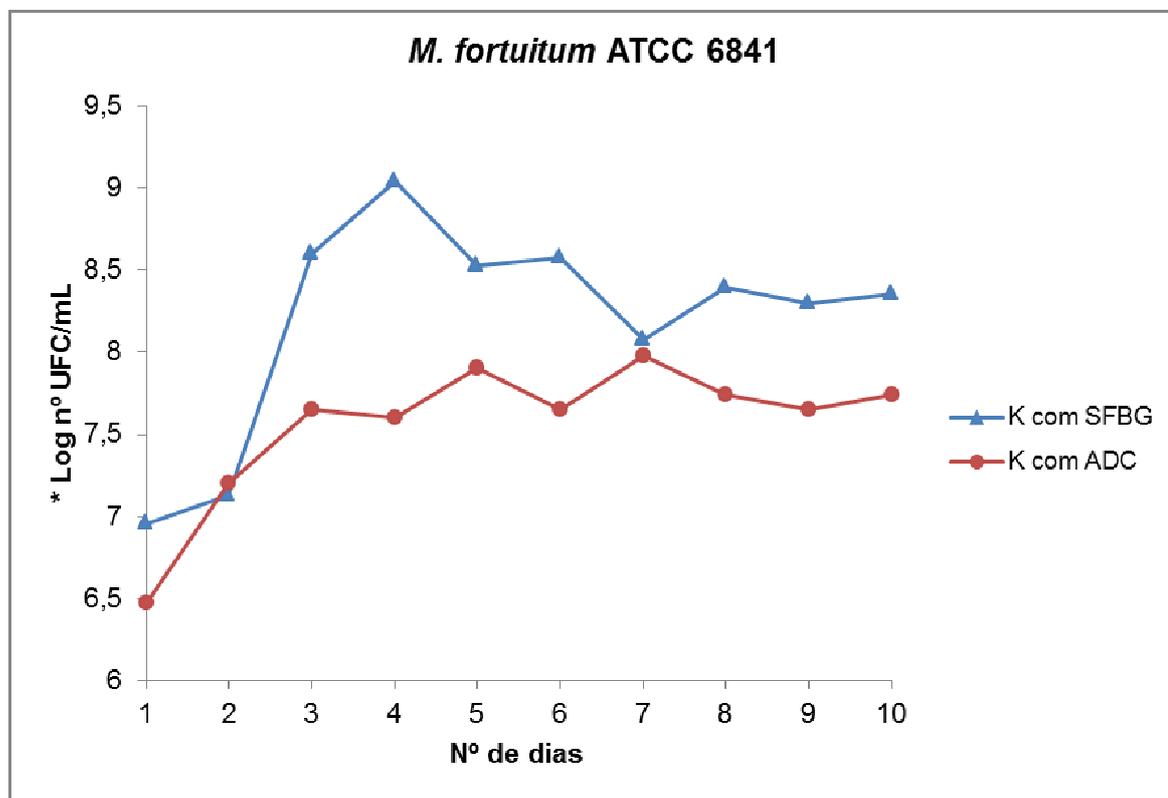
O procedimento para realização deste experimento foi semelhante ao descrito no item 4.1.1, sendo que todas as diluições foram inoculadas em duplicata nas placas de Petri contendo Ágar Müeller Hinton. Foi utilizada para fins de cálculo a diluição que estava dentro da faixa estabelecida, perfazendo assim um total de doze resultados. O cálculo foi realizado baseado na mediana dos resultados das leituras das placas de cada meio de cultura utilizado (**TABELA 4**).

A partir da obtenção do gráfico da curva de crescimento para *M. fortuitum* nos meios K com SFBG e K com ADC durante os dez dias de incubação, observou-se que esta micobactéria demonstrou um crescimento significativo, apresentando, com o enriquecimento ADC, um pico de crescimento tênue no sétimo dia comparado com o pico de crescimento no quarto dia com o enriquecimento SFBG (**FIGURA 14**). Para a curva de crescimento em 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC, houve também um crescimento significativo deste microrganismo, sendo que as curvas de crescimento foram muito similares, apresentando apenas um crescimento um pouco maior com o SFBG do sexto ao nono dia (**FIGURA 15**).

TABELA 4. Resultados do número de unidades formadoras de colônias/mL para *Mycobacterium fortuitum* obtidos através da contagem de colônias.

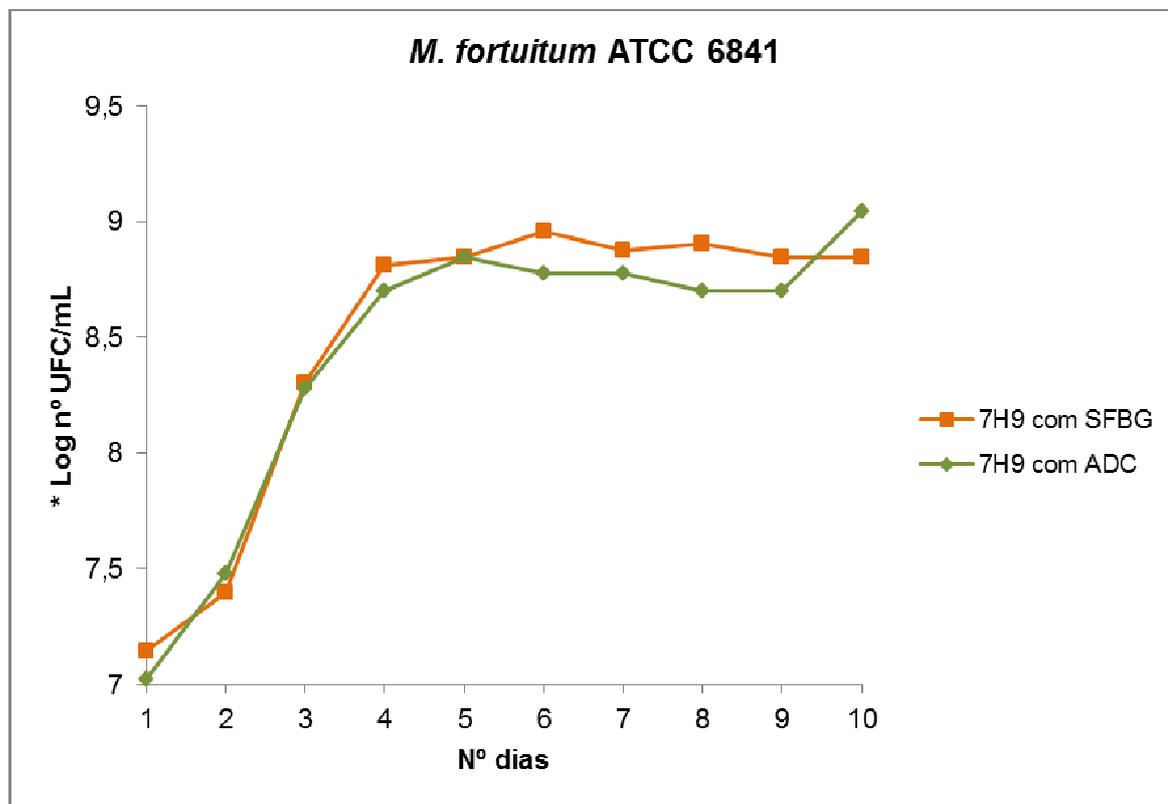
<i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841	Leituras	Proskauer-Beck *	Kirchners com ADC *	Kirchners com SFBG *	7H9 com ADC *	7H9 com SFBG *
		(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)
	1º dia	3,5E+06	3,0E+06	9,0E+06	1,1E+07	1,4E+07
	2º dia	6,0E+06	1,6E+07	1,4E+07	3,0E+07	2,5E+07
	3º dia	1,2E+07	4,5E+07	4,0E+07	1,9E+08	2,0E+08
	4º dia	1,8E+07	4,0E+07	1,1E+08	5,0E+08	6,5E+08
	5º dia	3,3E+07	8,0E+07	3,4E+08	7,0E+08	7,0E+08
	6º dia	3,9E+06	4,5E+07	3,8E+08	6,0E+08	9,0E+08
	7º dia	4,0E+06	9,5E+07	1,2E+08	6,0E+08	7,5E+08
	8º dia	9,0E+06	5,5E+07	2,5E+08	5,0E+08	8,0E+08
9º dia	1,0E+07	4,5E+07	2,0E+08	5,0E+08	7,0E+08	
10º dia	6,5E+06	5,5E+07	2,3E+08	1,1E+09	7,0E+08	

*Os resultados referem-se à mediana de doze leituras. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, ATCC - *American Type Culture Collection*.



*O gráfico representa o log das medianas de doze leituras.

FIGURA 14. Curva de crescimento de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 nos meios K com SFBG e K com ADC. K – Meio de Kirchners, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, ATCC - American Type Culture Collection, M - *Mycobacterium*.



*O gráfico representa o log das medianas de doze leituras.

FIGURA 15. Curva de crescimento de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, ATCC - *American Type Culture Collection*, M - *Mycobacterium*.

Apesar das curvas de *M. fortuitum* apresentarem picos de crescimento e crescimento tênue com os meios K com ADC e K com SFBG e, crescimento um pouco maior, porém, bem similares entre o meio 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC, através da análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5%, percebeu-se que não houve interferência destes picos de crescimento na comparação dos dois enriquecimentos e, que o enriquecimento à base de Soro Fetal Bovino com Glicose comparado com o enriquecimento ADC não interferiu no crescimento de *M. fortuitum*, ou seja, não houve diferença significativa entre os enriquecimentos testados. Os valores de *p* foram todos acima de 0,05, dentro do limite de confiança de 95% (**TABELA 5**).

TABELA 5. Resultado da análise estatística da comparação do crescimento de *M. fortuitum* em meio de Kirchners e meio Middlebrook 7H9.

<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841		<i>K com SFBG versus K com ADC</i>	<i>7H9 com SFBG versus 7H9 com ADC</i>
	p-valor	0.0634	0.2387

Valor de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. K – Meio de Kirchners, 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - *American Type Culture Collection*, M - *Mycobacterium*.

4.1.3 *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752

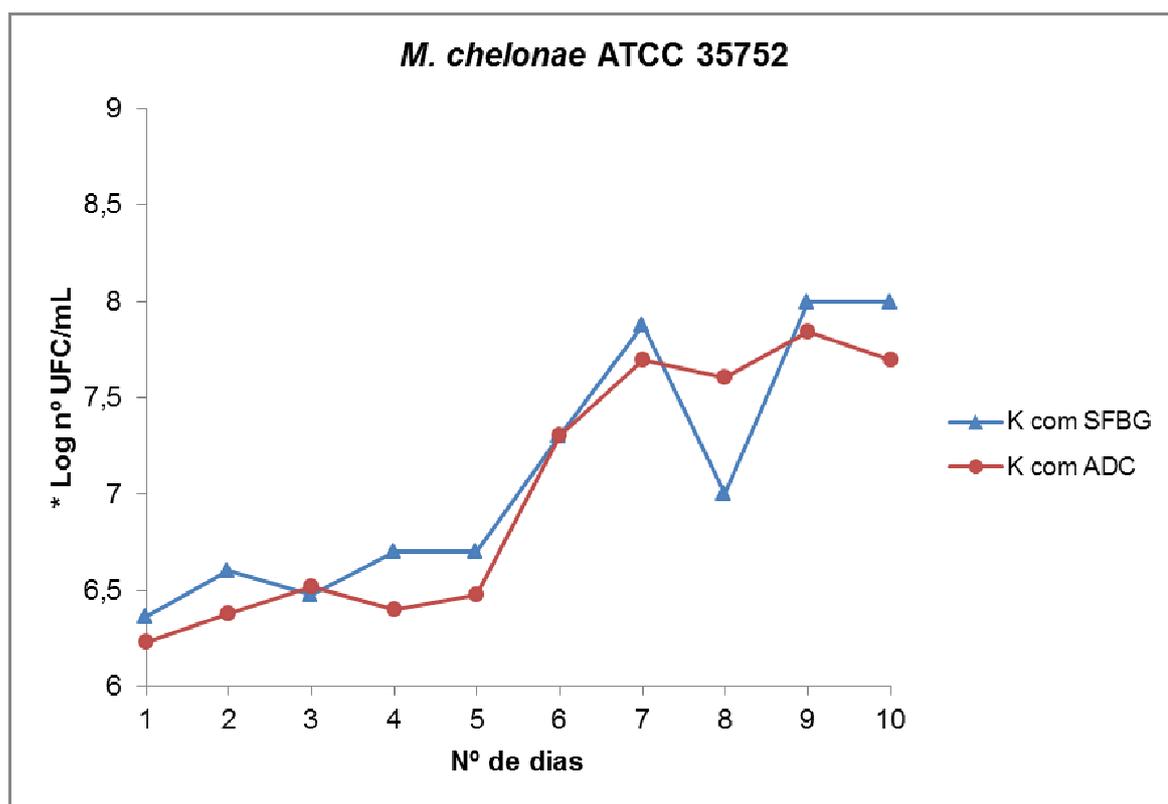
O procedimento para realização deste experimento foi semelhante ao descrito no item 4.1.1, sendo que apenas uma das diluições foi inoculada em duplicata nas placas de Petri contendo Ágar Müller Hinton. Foi utilizada para fins de cálculo a diluição que estava dentro da faixa estabelecida, perfazendo assim um total de nove resultados. O cálculo foi realizado baseado na mediana dos resultados das leituras das placas de cada meio de cultura utilizado (**TABELA 6**).

TABELA 6. Resultados do número de unidades formadoras de colônias/mL para *Mycobacterium chelonae* obtidos através da contagem de colônias.

<i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752	Leituras	Proskauer-Beck *	Kirchners com ADC *	Kirchners com SFBG *	7H9 com ADC *	7H9 com SFBG *
		(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)
	1º dia	3,0E+04	1,7E+06	2,3E+06	2,0E+06	3,0E+06
	2º dia	7,0E+05	2,4E+06	4,0E+06	3,0E+06	3,0E+06
	3º dia	1,0E+06	3,3E+06	3,0E+06	4,0E+06	3,0E+06
	4º dia	4,0E+05	2,5E+06	5,0E+06	5,0E+06	4,0E+06
	5º dia	7,0E+06	3,0E+06	5,0E+06	5,0E+06	5,6E+06
	6º dia	1,4E+07	2,0E+07	2,0E+07	4,0E+06	7,0E+06
	7º dia	1,0E+07	5,0E+07	7,6E+07	8,0E+06	9,0E+06
	8º dia	1,1E+07	4,0E+07	1,0E+07	1,8E+07	2,5E+07
	9º dia	6,0E+07	7,0E+07	1,0E+08	3,0E+07	2,8E+07
	10º dia	3,0E+07	5,0E+07	1,0E+08	4,0E+07	8,0E+07

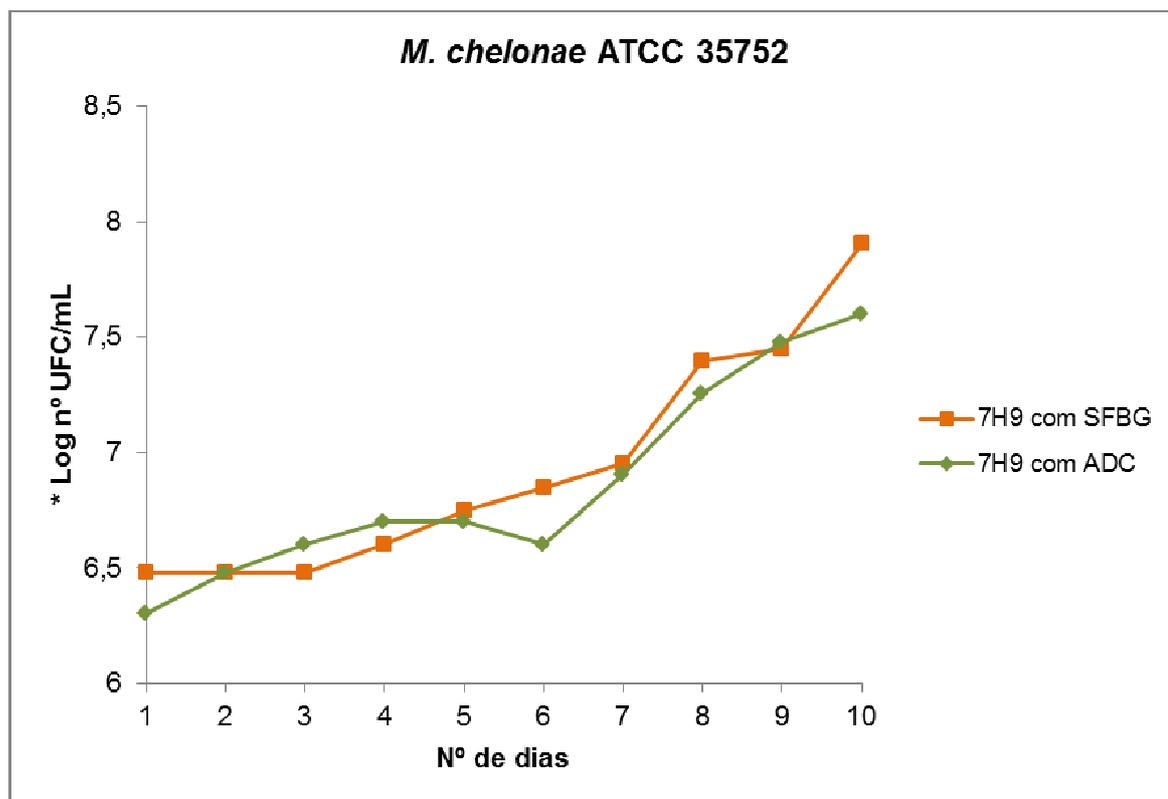
*Os resultados referem-se à mediana de nove leituras. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, ATCC - *American Type Culture Collection*.

A partir da obtenção do gráfico da curva de crescimento para *M. chelonae* nos meios K com SFBG e K com ADC durante os dez dias de incubação, observou-se que esta micobactéria demonstrou um crescimento significativo apresentando com o enriquecimento ADC e com o enriquecimento SFBG curvas de crescimento similares, porém, com uma queda no crescimento no oitavo dia em K com SFBG (FIGURA 16). Para a curva de crescimento de *M. chelonae* em 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC, houve também um crescimento significativo deste microrganismo, sendo que o mesmo apresentou com o enriquecimento SFBG e com o enriquecimento ADC curvas de crescimento bem similares, apresentando apenas um crescimento um pouco maior com o SFBG do quinto ao oitavo e no décimo dia (FIGURA 17).



*O gráfico representa o log das medianas de nove leituras.

FIGURA 16. Curva de crescimento de *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 nos meios K com SFBG e K com ADC. K – Meio de Kirchners, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, ATCC - American Type Culture Collection, M - *Mycobacterium*.



*O gráfico representa o log das medianas de nove leituras.

FIGURA 17. Curva de crescimento de *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, ATCC - *American Type Culture Collection*, M - *Mycobacterium*.

Apesar das curvas de *M. chelonae* apresentarem variações em algumas leituras realizadas, picos de crescimento e algumas quedas dependendo do meio de cultura e do enriquecimento, através da análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5%, percebeu-se que não houve interferência destes picos de crescimento na comparação dos dois enriquecimentos e, que o enriquecimento à base de Soro Fetal Bovino com Glicose comparado com o enriquecimento ADC não interferiu no crescimento de *M. chelonae*, ou seja, não houve diferença significativa entre os enriquecimentos testados. Os valores de p foram todos acima de 0,05, dentro do limite de confiança de 95% (**TABELA 7**).

TABELA 7. Resultado da análise estatística da comparação do crescimento de *M. chelonae* em meio de Kirchners e meio Middlebrook 7H9.

<i>M. chelonae</i> ATCC 35752		<i>K com SFBG versus K com ADC</i>	<i>7H9 com SFBG versus 7H9 com ADC</i>
	p-valor	0.4488	0.8493

Valor de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. K – Meio de Kirchners, 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - *American Type Culture Collection*, M - *Mycobacterium*.

4.1.4 *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594

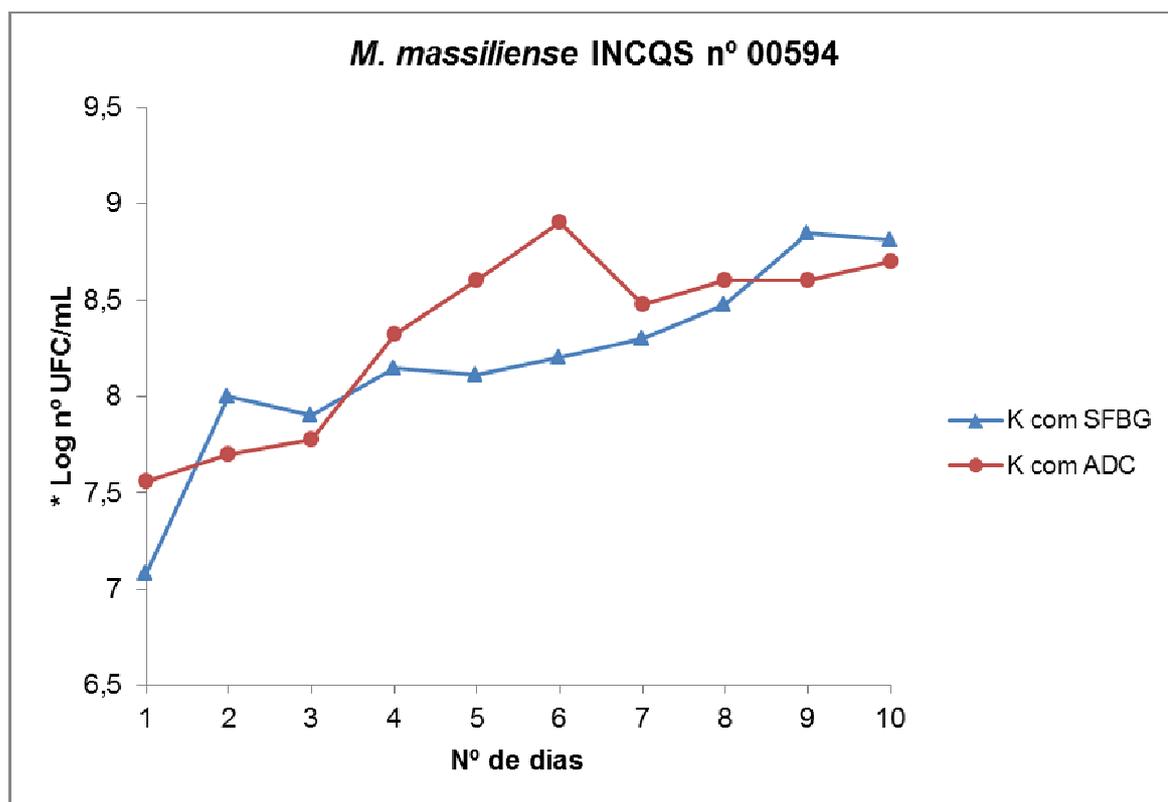
O procedimento para realização deste experimento foi semelhante ao descrito no item 4.1.1, sendo que apenas uma das diluições foi inoculada em duplicata nas placas de Petri contendo Ágar Müeller Hinton. Foi utilizada para fins de cálculo a diluição que estava dentro da faixa estabelecida, perfazendo assim um total de nove resultados. O cálculo foi realizado baseado na mediana dos resultados das leituras das placas de cada meio de cultura utilizado (**TABELA 8**).

A partir da obtenção do gráfico da curva de crescimento para *M. massiliense* nos meios K com SFBG e K com ADC durante os dez dias de incubação, observou-se que esta micobactéria demonstrou um crescimento significativo apresentando com o enriquecimento ADC um pico de crescimento no sexto dia (**FIGURA 18**). Para a curva de crescimento de *M. massiliense* em 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC, houve também um crescimento significativo deste microrganismo, sendo que no sétimo dia ocorreu uma queda do crescimento em 7H9 com ADC (**FIGURA 19**).

TABELA 8. Resultados do número de unidades formadoras de colônias/mL para *Mycobacterium massiliense* obtidos através da contagem de colônias.

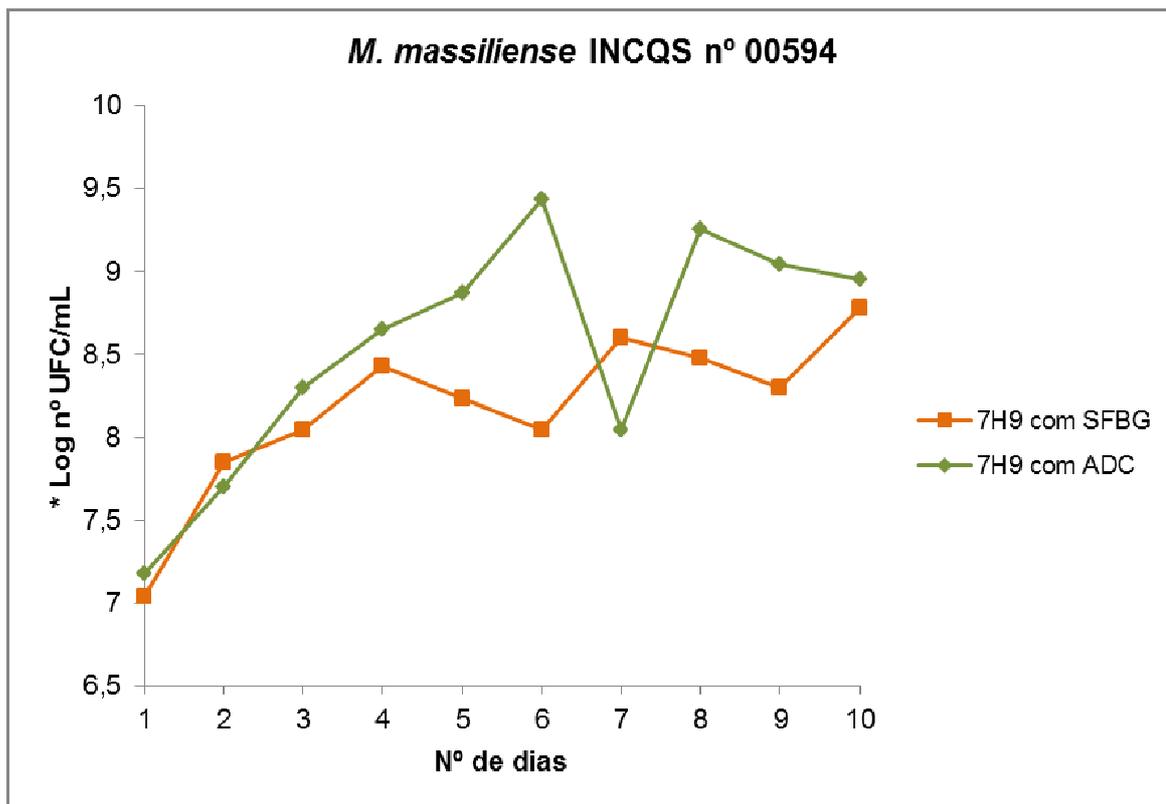
<i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS n° 00594	Leituras	Proskauer-Beck *	Kirchners com ADC *	Kirchners com SFBG *	7H9 com ADC *	7H9 com SFBG *
		(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)
	1º dia	1,4E+07	3,6E+07	1,2E+07	1,5E+07	1,1E+07
	2º dia	4,0E+06	5,0E+07	1,0E+08	5,0E+07	7,0E+07
	3º dia	2,1E+06	6,0E+07	8,0E+07	2,0E+08	1,1E+08
	4º dia	1,3E+06	2,1E+08	1,4E+08	4,5E+08	2,7E+08
	5º dia	4,0E+05	4,0E+08	1,3E+08	7,5E+08	1,7E+08
	6º dia	1,0E+05	8,0E+08	1,6E+08	2,7E+09	1,1E+08
	7º dia	1,0E+05	3,0E+08	2,0E+08	1,1E+08	4,0E+08
	8º dia	1,0E+05	4,0E+08	3,0E+08	1,8E+09	3,0E+08
9º dia	1,0E+06	4,0E+08	7,0E+08	1,1E+09	2,0E+08	
10º dia	7,0E+06	5,0E+08	6,5E+08	9,0E+08	6,0E+08	

*Os resultados referem-se à mediana de nove leituras. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.



*O gráfico representa o log das medianas de nove leituras.

FIGURA 18. Curva de crescimento de *Mycobacterium massiliense* INCQS n°00594 nos meios K com SFBG e K com ADC. K – Meio de Kirchners, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, M - *Mycobacterium*.



*O gráfico representa o log das medianas de nove leituras.

FIGURA 19. Curva de crescimento de *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, M - *Mycobacterium*.

Apesar das curvas apresentarem perfis de crescimento de *M. massiliense* com os meios K com ADC, K com SFBG, 7H9 com ADC e 7H9 com SFBG, visualmente diferentes, através da análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5%, percebeu-se que não houve interferência destes picos de crescimento na comparação dos dois enriquecimentos e, que o enriquecimento à base de Soro Fetal Bovino com Glicose comparado com o enriquecimento ADC não interferiu no crescimento de *M. massiliense*, ou seja, não houve diferença significativa entre os enriquecimentos testados. Os valores de p foram todos acima de 0,05, dentro do limite de confiança de 95% (TABELA 9).

TABELA 9. Resultado da análise estatística da comparação do crescimento de *M. massiliense* em meio de Kirchners e meio Middlebrook 7H9.

<i>M. massiliense</i> INCQS n° 00594		<i>K com SFBG versus K com ADC</i>	<i>7H9 com SFBG versus 7H9 com ADC</i>
	p-valor	0.4718	0.1397

Valor de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. K – Meio de Kirchners, 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, M - *Mycobacterium*.

4.1.5 Cepa *Mycobacterium bovis* BCG Moreau INCQS n° 00062

Não houve resultados referentes à curva de crescimento da cepa de *M. bovis* devido a problemas na recuperação deste microrganismo nos meios de cultura utilizados, além disso, o experimento não pode ser repetido devido ao longo tempo de incubação necessário para obtenção do microrganismo.

4.2 LEITURA POR ESPECTROFOTOMETRIA

4.2.1 *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752, e *Mycobacterium massiliense* INCQS n° 00594.

Para obtenção das leituras do crescimento por espectrofotometria das MCR, as culturas foram incubadas por 1 a 10 dias, após cada período de incubação as culturas obtidas nos tubos contendo PB (3 tubos), K (3 tubos com ADC e 3 tubos SFBG) e 7H9 (3 tubos com ADC e 3 tubos com SFBG) foram homogeneizadas em agitador de tubos até a completa homogeneização visual (FONSECA; DA SILVA; GONTIJO FILHO, 1985), onde a partir dos tubos de meio de cultura

homogeneizados, foram retiradas alíquotas de 3 mL de cada tubo de meio de cultura, que foram analisadas por espectrofotometria para determinação da densidade ótica (DO) em transmitância a 650nm. Os resultados foram baseados na mediana das seis leituras dos tubos de cada meio de cultura utilizado.

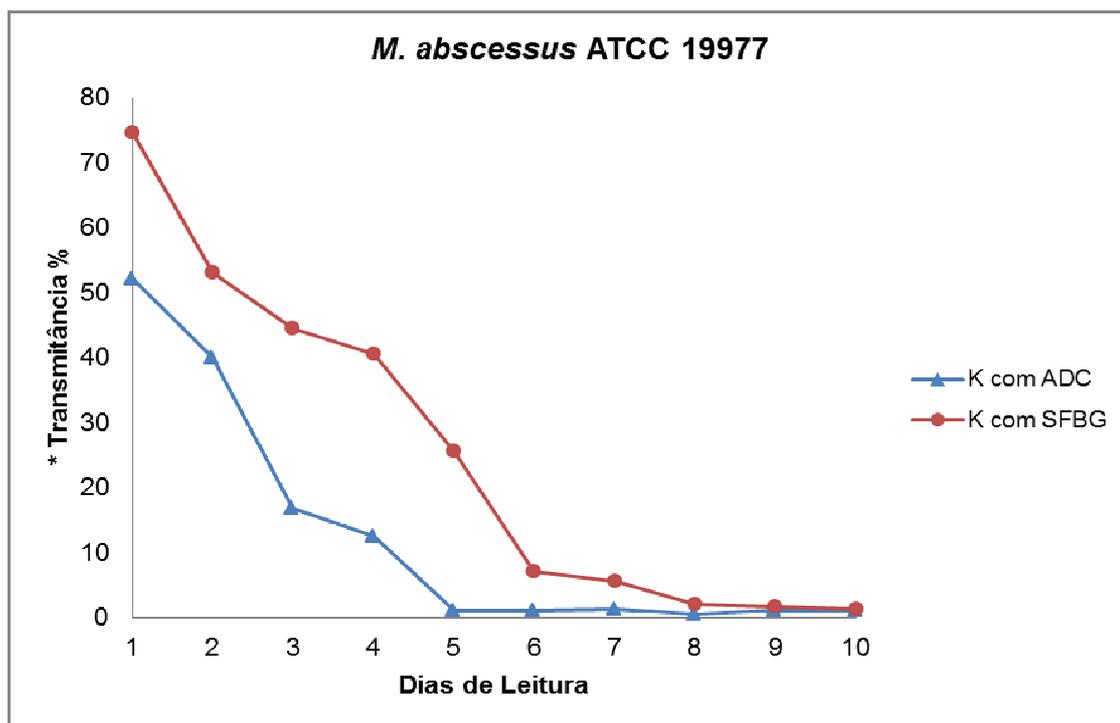
Os resultados referentes aos microrganismos *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752, e *Mycobacterium massiliense* INCQS n° 00594 estão nas **TABELAS 10, 11, 12 e 13**, respectivamente.

A partir da obtenção dos gráficos de transmitância para *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* nos meios K com SFBG, K com ADC, 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC durante os dez dias de incubação, observou-se que estas micobactérias apresentaram comportamentos semelhantes quando os gráficos da curva de crescimento das mesmas foram observados (**FIGURAS 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27**).

TABELA 10. Resultados obtidos através da leitura da densidade ótica em transmitância (T%) a 650nm para *Mycobacterium abscessus*.

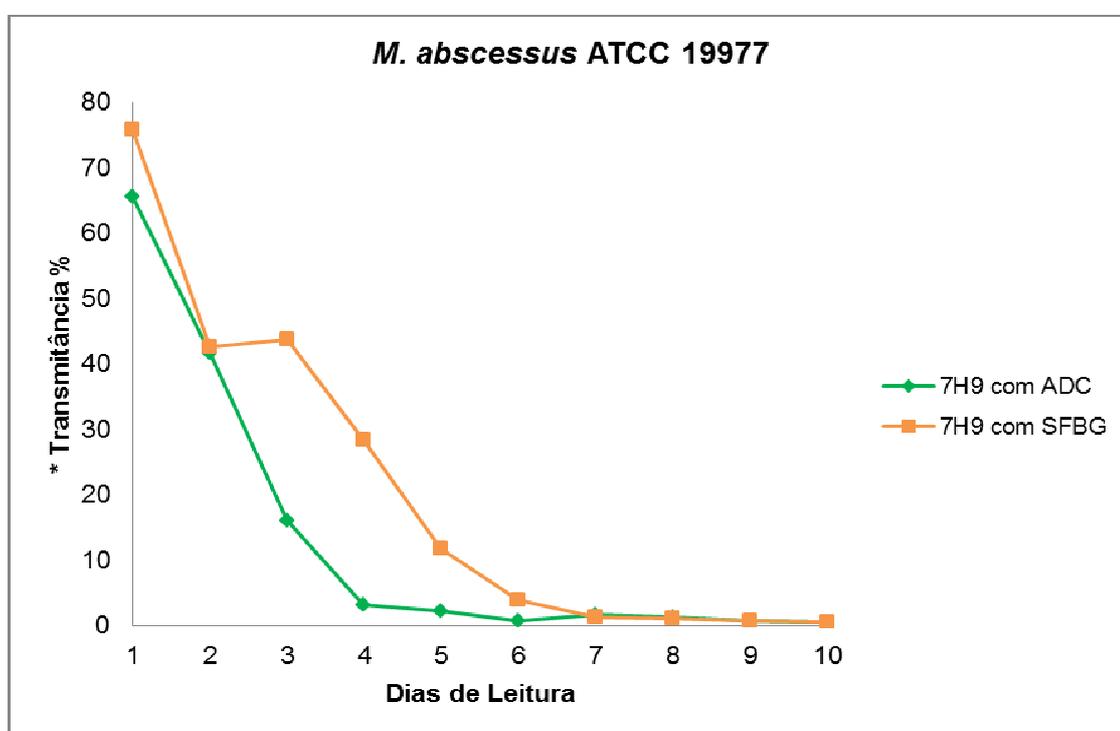
<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977	Leituras	Proskauer-Beck *	Kirchners com ADC *	Kirchners com SFBG *	7H9 com ADC *	7H9 com SFBG *
		(T%)	(T%)	(T%)	(T%)	(T%)
	1º dia	48,65	52,2	74,55	65,65	75,95
	2º dia	46,85	40,05	53,1	41,65	42,6
	3º dia	29,6	16,8	44,5	16,1	43,65
	4º dia	11,4	12,6	40,6	3,1	28,5
	5º dia	0,7	1,15	25,6	2,3	11,85
	6º dia	1,8	1,2	7,1	0,7	3,85
	7º dia	1,15	1,35	5,55	1,6	1,35
	8º dia	1,7	0,5	2,15	1,3	1,05
	9º dia	2,1	1,2	1,6	0,7	0,8
	10º dia	1,7	1,1	1,25	0,55	0,6

*Os resultados referem-se à mediana de seis leituras. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, T – Transmitância, ATCC - *American Type Culture Collection*.



*O gráfico representa a mediana de seis leituras de transmitância.

FIGURA 20. Curva de transmitância de *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977 nos meios K com SFBG e K com ADC. K – Meio de Kirchners, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - American Type Culture Collection.



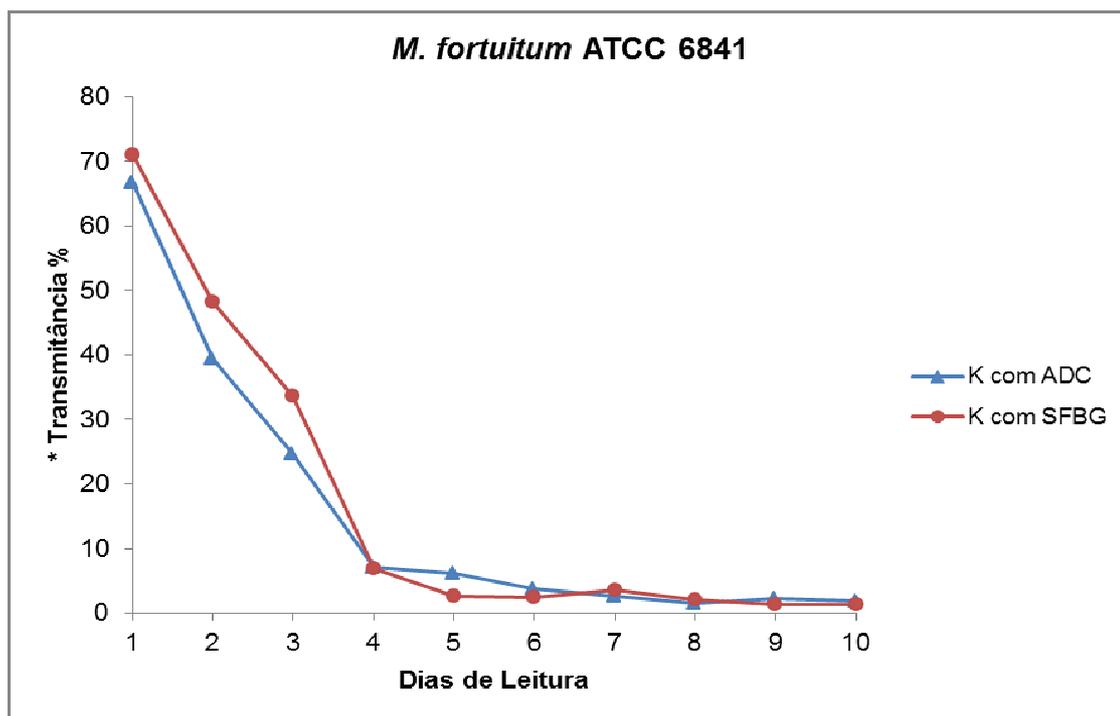
*O gráfico representa a mediana de seis leituras de transmitância.

FIGURA 21. Curva de transmitância de *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - American Type Culture Collection.

TABELA 11. Resultados obtidos através da leitura da densidade ótica em transmitância (T%) a 650nm para *Mycobacterium fortuitum*.

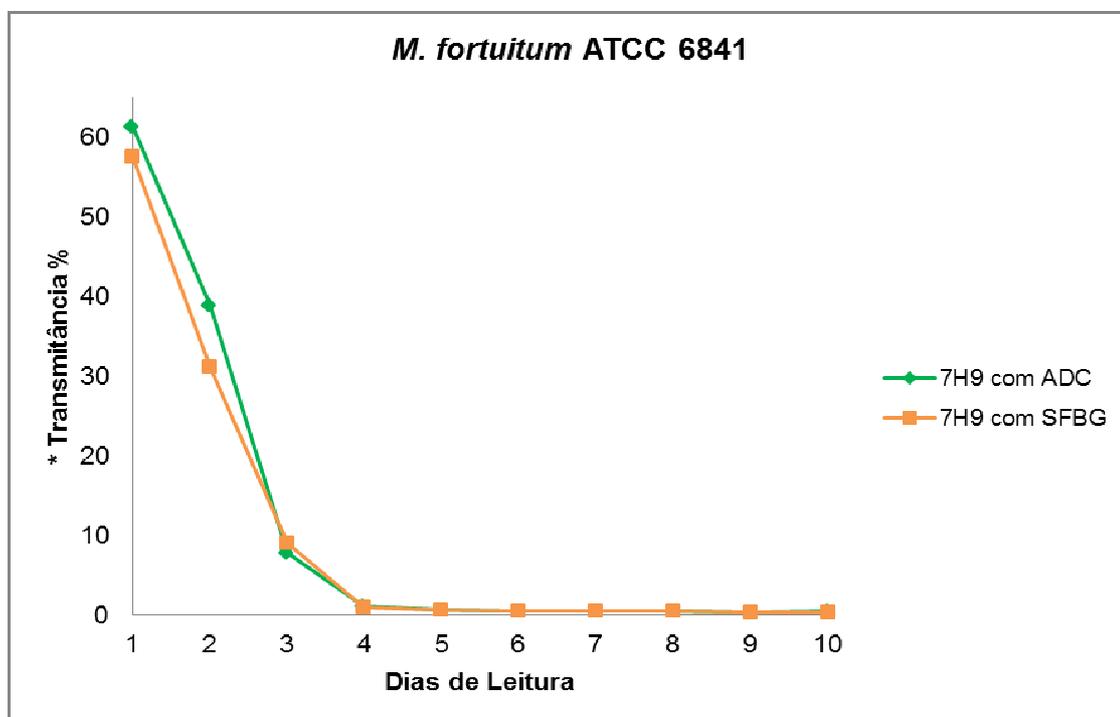
<i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841	Leituras	Proskauer-Beck *	Kirchners com ADC *	Kirchners com SFBG *	7H9 com ADC *	7H9 com SFBG *
		(T%)	(T%)	(T%)	(T%)	(T%)
	1º dia	80,4	66,8	71	61,3	57,5
	2º dia	61,2	39,45	48,3	38,85	31,2
	3º dia	44,25	24,6	33,55	7,75	9
	4º dia	13,6	7,15	6,85	1	0,9
	5º dia	3,25	6,15	2,6	0,65	0,65
	6º dia	2,45	3,8	2,45	0,5	0,5
	7º dia	1,25	2,6	3,6	0,45	0,45
	8º dia	1,65	1,55	2,1	0,4	0,45
	9º dia	1,2	2,3	1,3	0,35	0,35
	10º dia	1,3	1,95	1,35	0,4	0,35

*Os resultados referem-se à mediana de seis leituras. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9,SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, T – Transmitância, ATCC - *American Type Culture Collection*.



*O gráfico representa a mediana de seis leituras de transmitância.

FIGURA 22. Curva de transmitância de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 nos meios K com SFBG e K com ADC. K – Meio de Kirchners, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - American Type Culture Collection.



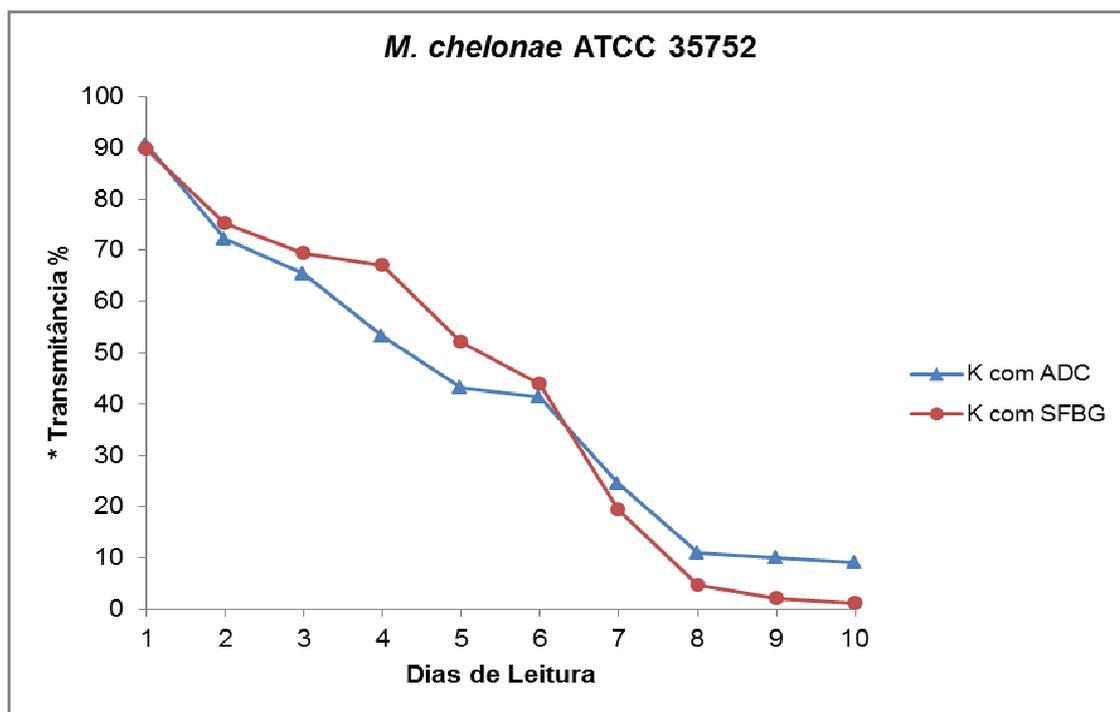
*O gráfico representa a mediana de seis leituras de transmitância.

FIGURA 23. Curva de transmitância de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - American Type Culture Collection.

TABELA 12. Resultados obtidos através da leitura da densidade ótica em transmitância (T%) a 650nm para *Mycobacterium chelonae*.

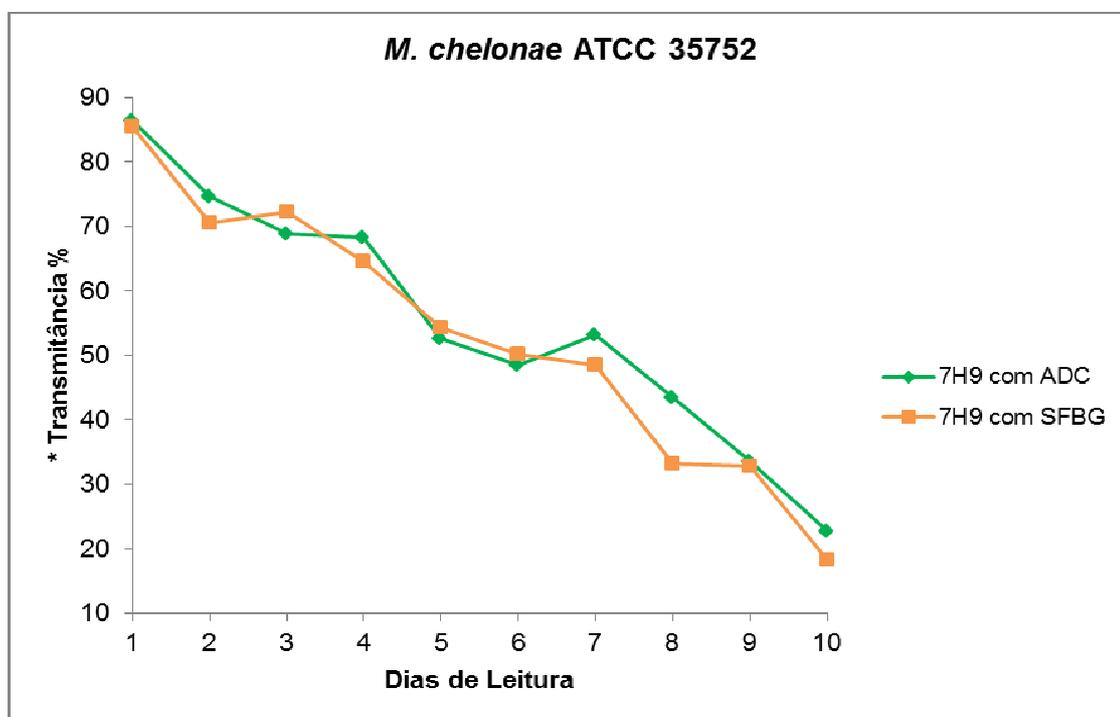
<i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752	Leituras	Proskauer-Beck *	Kirchners com ADC *	Kirchners com SFBG *	7H9 com ADC *	7H9 com SFBG *
		(T%)	(T%)	(T%)	(T%)	(T%)
	1º dia	98,15	90,65	89,7	86,35	85,5
	2º dia	86,7	72,15	75,3	74,7	70,6
	3º dia	79,6	65,4	69,45	68,8	72,2
	4º dia	44,95	53,3	67,05	68,35	64,55
	5º dia	45,1	43,3	52,05	52,55	54,25
	6º dia	30,4	41,35	43,9	48,45	50,15
	7º dia	16,05	24,55	19,5	53,1	48,45
	8º dia	21,25	10,95	4,6	43,45	33,15
	9º dia	5,25	9,95	2,2	33,5	32,8
	10º dia	7	9,1	1,25	22,7	18,25

*Os resultados referem-se à mediana de seis leituras. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, T – Transmitância, ATCC - *American Type Culture Collection*.



*O gráfico representa a mediana de seis leituras de transmitância.

FIGURA 24. Curva de transmitância de *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 nos meios K com SFBG e K com ADC. K – Meio de Kirchners, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - *American Type Culture Collection*.



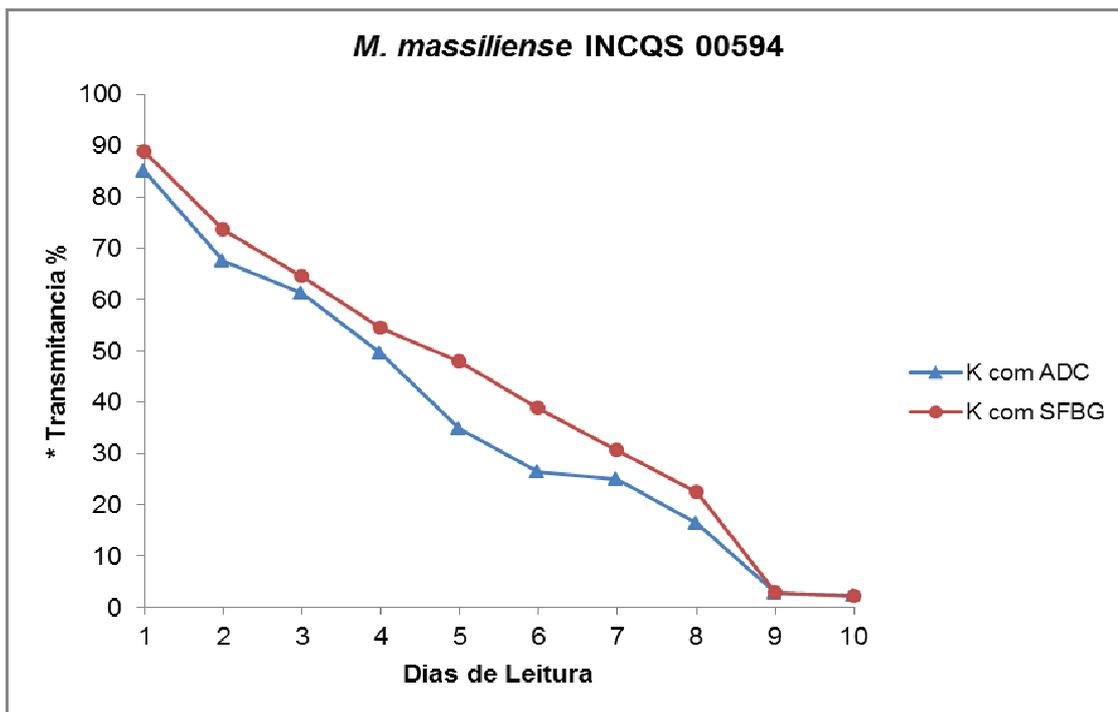
*O gráfico representa a mediana de seis leituras de transmitância.

FIGURA 25. Curva de transmitância de *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - *American Type Culture Collection*.

TABELA 13. Resultados obtidos através da leitura da densidade ótica em transmitância (T%) a 650nm para *Mycobacterium massiliense*.

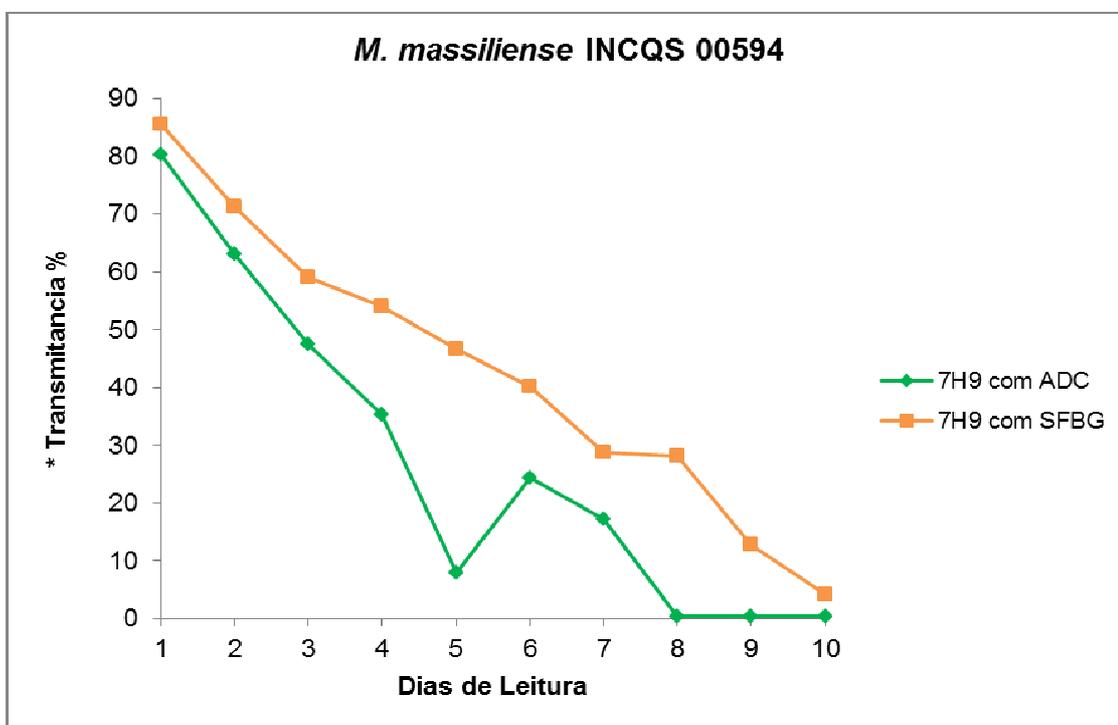
<i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594	Leituras	Proskauer-Beck *	Kirchners com ADC *	Kirchners com SFBG *	7H9 com ADC *	7H9 com SFBG *
		(T%)	(T%)	(T%)	(T%)	(T%)
	1º dia	96,6	85	88,85	80,3	85,65
	2º dia	91,45	67,5	73,65	63,15	71,25
	3º dia	75,05	61,1	64,45	47,6	59,1
	4º dia	49,35	49,6	54,35	35,35	53,95
	5º dia	39,8	34,7	47,8	8,05	46,6
	6º dia	36,8	26,45	38,8	24,35	40,2
	7º dia	31,5	24,9	30,7	17,2	28,85
	8º dia	30,3	16,25	22,4	0,4	28,15
9º dia	30,25	2,9	2,9	0,35	12,9	
10º dia	17,85	2,45	2	0,5	4,25	

*Os resultados referem-se à mediana de seis leituras. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, T – Transmitância, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.



*O gráfico representa a mediana de seis leituras de transmitância.

FIGURA 26. Curva de transmitância de *Mycobacterium massiliense* INCQS n° 00594 nos meios K com SFBG e K com ADC. K – Meio de Kirchners, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.



*O gráfico representa a mediana de seis leituras de transmitância.

FIGURA 27. Curva de transmitância de *Mycobacterium massiliense* INCQS n°00594 nos meios 7H9 com SFBG e 7H9 com ADC. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

4.2.2 Análise estatística dos resultados das leituras por espectrofotometria das MCRs de referência

Através da análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5% nos resultados de leitura por transmitância, percebeu-se que o enriquecimento à base de Soro Fetal Bovino com Glicose comparado com o enriquecimento ADC não interferiu no crescimento de *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. massiliense*, ou seja, não houve diferença significativa entre os enriquecimentos testados. Os valores de p foram todos acima de 0,05, dentro do limite de confiança de 95% (**QUADROS 1 e 2**).

QUADRO 1. Resultado da análise estatística da comparação do crescimento das Micobactérias de Crescimento Rápido de referência em meio de Kirchners.

K com SFBG versus K com ADC		<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	<i>M. massiliense</i> INCQS nº 00594
	p-valor	0.9397	0.7336	0.0587	0.6775

Valor de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. K – Meio de Kirchners, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, M – *Mycobacterium*.

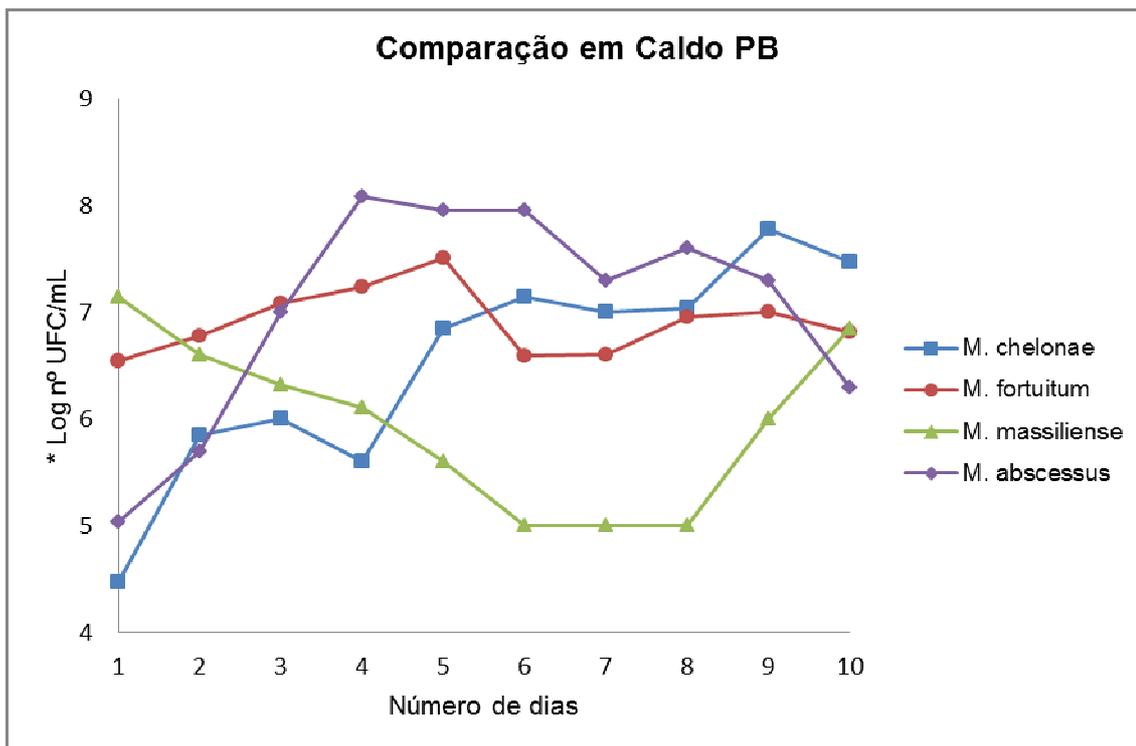
QUADRO 2. Resultado da análise estatística da comparação do crescimento das Micobactérias de Crescimento Rápido de referência em meio Middlebrook 7H9.

7H9 com SFBG versus 7H9 com ADC		<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	<i>M. massiliense</i> INCQS nº 00594
	p-valor	0.7913	0.9395	0.4055	0.1736

Valor de p onde resultados significativamente semelhantes possuem $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. 7H9 – Meio Middlebrook 7H9, SFBG – Enriquecimento à base de Soro Fetal bovino e glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, M – *Mycobacterium*.

4.3 OBSERVAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NO MEIO DE CULTURA ISENTO DE ENRIQUECIMENTO – PB

Os microrganismos *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. massiliense* foram também inoculados em Caldo Proskauer-Beck Modificado para a obtenção da curva de crescimento dessas micobactérias conforme citado no item 4.1.1. No preparo deste meio de cultura não é utilizado enriquecimento, ou seja, não há interferência deste tipo de substância e, o mesmo é utilizado para o preparo da suspensão teste do Método para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, sendo assim considerado como meio controle. Devido a este fato, observou-se que era importante a análise comparativa destes microrganismos apenas em PB. O cálculo foi realizado baseado na mediana dos resultados das leituras das placas inoculadas com o microrganismo que havia sido previamente crescido em PB.



*O gráfico representa o log das medianas das leituras dos respectivos microrganismos.

FIGURA 28. Curva de Crescimento das micobactérias de crescimento rápido de referência no meio PB. PB – Caldo Proskauer-Beck modificado, UFC – Unidades Formadoras de Colônia, mL – mililitro, M – *Mycobacterium*.

Através somente da análise do gráfico não poderíamos realizar a comparação das micobactérias *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. massiliense* crescidas em meio PB. Foi realizada então a análise estatística destes resultados em mediana utilizando o teste de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 95%. Porém, ao aplicar este teste estatístico com todas as micobactérias obteve-se um p -valor menor que 0,05, ou seja, indicando que havia uma diferença estatística entre os crescimentos obtidos em meio PB.

Com este resultado, procurou-se avaliar o que estava levando a esta diferença e foi concluído que havia um pico de crescimento de *M. abscessus* referente ao quarto dia, que alterava o p -valor para abaixo de 0,05. Devido a este fato, o teste estatístico foi realizado novamente, sendo incluídas apenas *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* e assim, obteve-se um p -valor $> 0,05$,

indicando não haver diferença estatística no crescimento destas micobactérias em meio PB (**TABELA 14**).

TABELA 14. Resultado da análise estatística da comparação do crescimento das micobactérias *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* em meio PB.

Proskauer-Beck		<i>M. chelonae</i> ATCC 35752 / <i>M. fortuitum</i> ATCC 6841 / <i>M. massiliense</i> INCQS 00594
	p-valor	0.0559

Valor de p onde resultado significativamente semelhante possui $p > 0,05$ para um limite de confiança de 95%. M – *Mycobacterium*, ATCC - American Type Culture Collection.

4.4 VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DOS DESINFETANTES

4.4.2 Desinfetante A

Na avaliação da atividade micobactericida para verificar a qualidade do Desinfetante A, foi observado crescimento de *M. bovis* em um tubo de cada meio de cultura (Proskauer-Beck modificado, Kirchnners e Middlebrook 7H9) tanto com enriquecimento ADC quanto com SFBG, porém o microrganismo estava sensível no controle da resistência frente às diluições do fenol (**QUADRO 3 e 4**). Foi realizada então, a repetição do ensaio e o crescimento observado foram de dois tubos de PB e um tubo de K com o enriquecimento ADC. Com o enriquecimento SFBG foi observado crescimento em três tubos de PB, dois tubos de K e um tubo de 7H9 (**QUADRO 3**).

Na avaliação da atividade micobactericida desse mesmo produto utilizando a cepa de *M. massiliense* INCQS nº 00594 foi observado crescimento em todos os 30 tubos de meio de cultura empregados, tanto com enriquecimento ADC quanto com SFBG, observando-se assim a ineficácia do produto desinfetante A (**QUADRO 3**).

Durante a leitura desses resultados, visualizou-se um crescimento maior desta micobactéria nos meios de cultura onde foi empregado o enriquecimento SFBG do que nos meios com o enriquecimento ADC.

O teor do princípio ativo glutaraldeído do desinfetante A estava em 108% do declarado pelo fabricante, considerado assim satisfatório pela metodologia INCQS 65.3110.026 (Faixa aceita: 85% a 115%) (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009b), mas, independentemente deste resultado, o desinfetante A foi considerado insatisfatório pelo Método para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes porque o mesmo não foi capaz de eliminar os microrganismos oficialmente exigidos pela legislação vigente de acordo com os critérios de aprovação do método.

Nas **FIGURAS 29 e 30** está representado graficamente o número de tubos de meio de cultura com os enriquecimentos ADC e SFBG que apresentaram crescimento de acordo com os microrganismos *M. bovis* e *M. massiliense* frente ao desinfetante A.

QUADRO 3. Avaliação da atividade micobactericida do desinfetante A utilizando a cepa de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594.

Desinfetante A	Microorganismos	Total de carreadores positivos												Controles		Resultado
		Ensaio 1						Ensaio 2						Esterilidade	Viabilidade	
		PB	K-ADC	7H9-ADC	PB	K-SFBG	7H9-SFBG	PB	K-ADC	7H9-ADC	PB	K-SFBG	7H9-SFBG			
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau INCQS nº 00062	1	1	1	1	1	1	2	1	0	3	2	1	C	C	I	
<i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594	10	10	10	10	10	10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	C	C	I	

PB – Proskauer-Beck modificado, K – Kirchners, 7H9 – Middlebrook 7H9, SFBG – Soro Fetal bovino com glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, NR – Não realizado, C – Conforme, I – Insatisfatório, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

QUADRO 4. Avaliação da resistência dos microorganismos *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594 frente às diluições do fenol no ensaio com o desinfetante A.

Desinfetante A	Microorganismos	Controle de Resistência do Microorganismo ao Fenol - Ensaio 1		Controle de Resistência do Microorganismo ao Fenol - Ensaio 2	
		F (ADC)	F (SFBG)	F (ADC)	F (SFBG)
		<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau INCQS nº 00062	Sensível	Sensível	Sensível
<i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594	Dentro do Padrão	Dentro do Padrão	Não realizado	Não realizado	

F - Fenol, SFBG – Soro Fetal bovino com glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

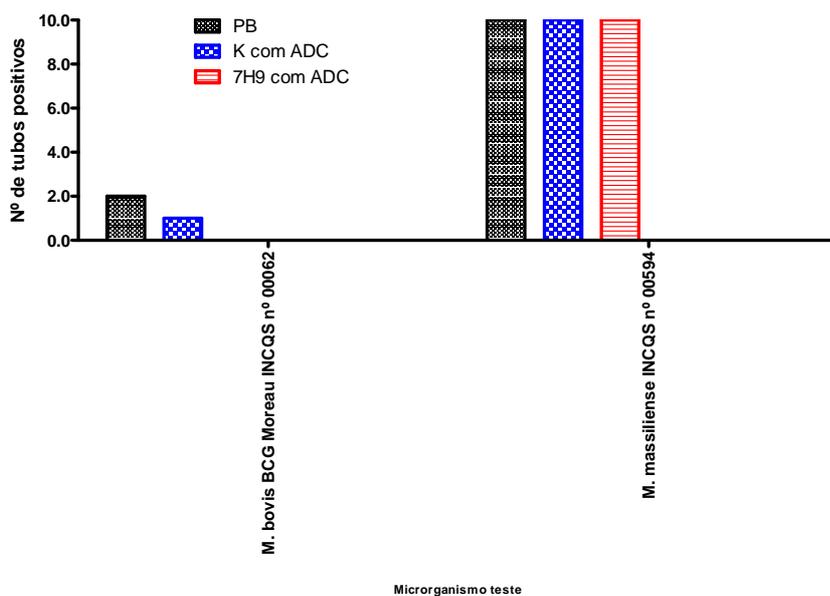


Figura 29. Atividade micobactericida do Desinfetante A frente aos microrganismos *M. bovis* e *M. massiliense* utilizando os meios de cultura com o enriquecimento ADC. PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, M – *Mycobacterium*, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

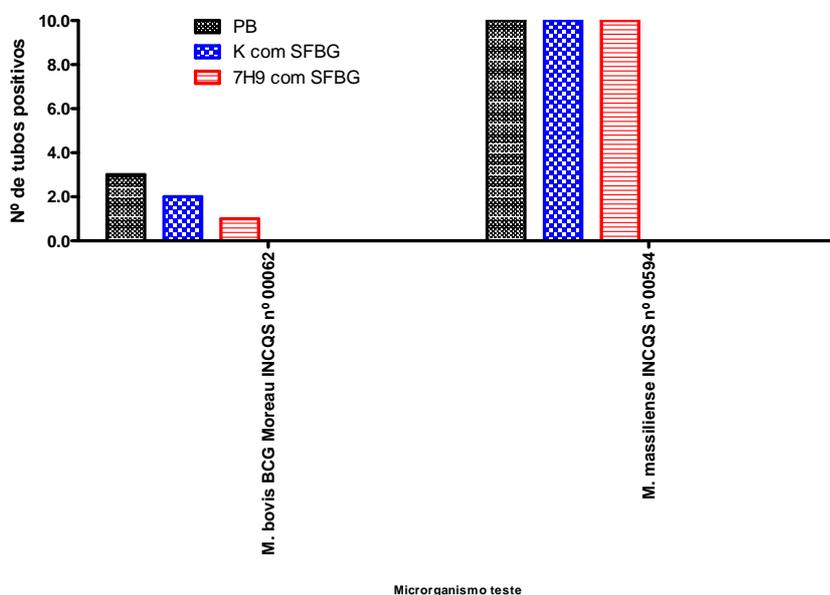


Figura 30. Atividade micobactericida do Desinfetante A frente aos microrganismos *M. bovis* e *M. massiliense* utilizando os meios de cultura com o enriquecimento SFBG. PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, SFBG – enriquecimento à base de Soro Fetal bovino com Glicose, M – *Mycobacterium*, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

4.4.3 Desinfetante B

Na avaliação da atividade micobactericida para verificar a qualidade do Desinfetante B, não foi observado crescimento de *M. bovis* em nenhum dos tubos contendo meios de cultura (Proskauer-Beck modificado, Kirchnners e Middlebrook 7H9) com enriquecimento ADC, porém foi observado crescimento de quatro tubos em cada meio de cultura com o enriquecimento SFBG. Mas, o microrganismo estava sensível no controle da resistência frente às diluições do fenol (**QUADRO 5 e 6**). Foi realizada então, a repetição do ensaio, já que havia sido observado crescimento em tubos contendo meios de cultura adicionados de SFBG, mesmo com um microrganismo demonstrando sensibilidade frente ao controle do fenol. O crescimento observado no segundo ensaio foi de dois tubos de PB, dois tubos de K e um tubo de 7H9 com o enriquecimento ADC. Já com o enriquecimento SFBG foi observado crescimento em cinco tubos de PB, quatro tubos de K e quatro tubos de 7H9 (**QUADRO 5**).

Na avaliação da atividade micobactericida desse mesmo produto utilizando a cepa de *M. massiliense* INCQS nº 00594 foi observado crescimento em todos os 30 tubos de meio de cultura empregados tanto com enriquecimento ADC quanto com SFBG, verificando assim a total ineficácia do desinfetante B (**QUADRO 5**). Durante a leitura destes resultados, visualizou-se um crescimento maior desta micobactéria nos meios de cultura onde foi empregado o enriquecimento SFBG do que nos meios com o enriquecimento ADC.

O teor do princípio ativo glutaraldeído do desinfetante B estava em 97% do declarado pelo fabricante, considerado assim satisfatório pela metodologia INCQS 65.3110.026 (Faixa aceita: 85% a 115%) (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009b), mas, independentemente deste resultado o desinfetante B foi considerado insatisfatório pelo Método para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes porque o mesmo não foi capaz de eliminar os microrganismos oficialmente exigidos pela legislação vigente de acordo com os critérios de aprovação do método.

Nas **FIGURAS 31 e 32** está representado graficamente o número de tubos de meio de cultura com os enriquecimentos ADC e SFBG que apresentaram crescimento de acordo com *M. bovis* e *M. massiliense* frente ao desinfetante B.

QUADRO 5. Avaliação da atividade micobactericida do desinfetante B utilizando a cepa de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594

Desinfetante B	Microorganismos	Total de carreadores positivos												Controles		Resultado
		Ensaio 1						Ensaio 2						Esterilidade	Viabilidade	
		PB	K-ADC	7H9-ADC	PB	K-SFBG	7H9-SFBG	PB	K-ADC	7H9-ADC	PB	K-SFBG	7H9-SFBG			
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau INCQS nº 00062	0	0	0	4	4	4	2	2	1	5	4	4	C	C	I	
<i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594	10	10	10	10	10	10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	C	C	I	

PB – Proskauer-Beck modificado, K – Kirchners, 7H9 – Middlebrook 7H9, SFBG – Soro Fetal bovino com glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, NR – Não realizado, C – Conforme, I – Insatisfatório, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde.

QUADRO 6. Avaliação da resistência dos microrganismos *Mycobacterium bovis* BCG Moreau e *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594 frente às diluições do fenol no ensaio com o desinfetante B.

Desinfetante B	Microorganismos	Controle de Resistência do Microorganismo ao Fenol - Ensaio 1		Controle de Resistência do Microorganismo ao Fenol - Ensaio 2	
		F (ADC)	F (SFBG)	F (ADC)	F (SFBG)
		<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Moreau INCQS nº 00062	Sensível	Sensível	Sensível
<i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594	Dentro do Padrão	Dentro do Padrão	Não realizado	Não realizado	

F - Fenol, SFBG – Soro Fetal bovino com glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

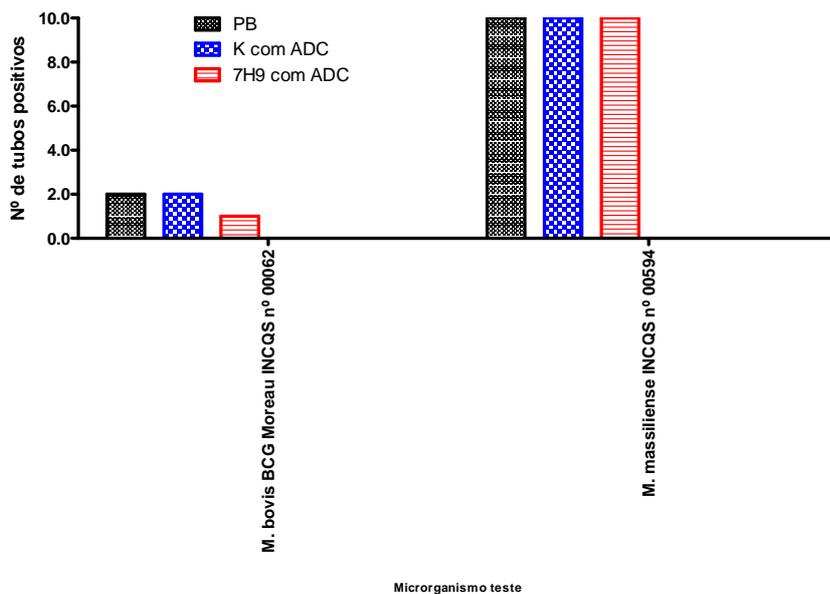


Figura 31. Atividade micobactericida do Desinfetante B frente aos microrganismos *M. bovis* e *M. massiliense* utilizando os meios de cultura com o enriquecimento ADC. PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, M – *Mycobacterium*, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

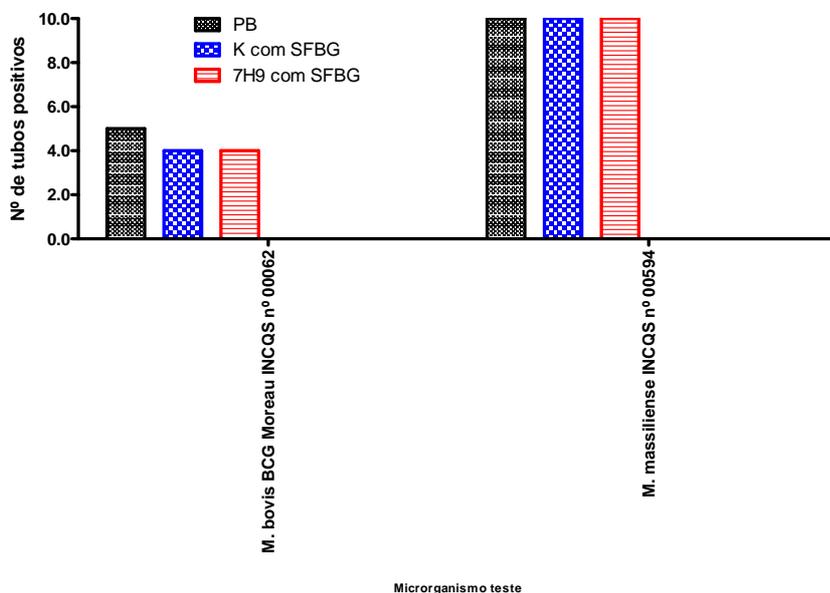


Figura 32. Atividade micobactericida do Desinfetante B frente aos microrganismos *M. bovis* e *M. massiliense* utilizando os meios de cultura com o enriquecimento SFBG. PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, SFBG – enriquecimento à base de Soro Fetal bovino com Glicose, M – *Mycobacterium*, INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

4.5 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DAS MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO DE REFERÊNCIA UTILIZANDO OS DIFERENTES ENRIQUECIMENTOS

4.5.2 Desinfetante A

Quanto à avaliação da suscetibilidade das MCR frente ao desinfetante A, *M. abscessus* mostrou-se médio tolerante, pois foi observado crescimento em 6 tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado, em 3 contendo meio de Kirchners e em 2 tubos com meio Middlebrook 7H9 com o enriquecimento ADC e, com o enriquecimento SFBG foi observado crescimento em 10 tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado, em 4 contendo meio de Kirchners e em 6 tubos com meio Middlebrook 7H9 (**QUADRO 7**).

Para *M. chelonae* não foi observado crescimento em nenhum meio de cultura (Proskauer-Beck modificado, Kirchners e Middlebrook 7H9) tanto com enriquecimento ADC quanto com SFBG, porém o microrganismo estava sensível na avaliação da resistência frente às diluições do fenol (**QUADRO 7 e 8**). Foi necessária, então, a repetição do ensaio e o crescimento observado foi de apenas um tubo de K com o enriquecimento ADC e um tubo de 7H9 com o enriquecimento SFBG, mostrando assim uma fraca tolerância de *M. chelonae* ao desinfetante A. (**QUADRO 7**).

Já para *M. fortuitum*, foi observado apenas crescimento em um tubo de PB no ensaio com o enriquecimento ADC, porém este microrganismo estava sensível na avaliação da resistência frente às diluições do fenol (**QUADRO 7 e 8**). Foi necessária, então, a repetição do ensaio e o crescimento observado foi de 3 tubos com o meio PB para o ensaio com o enriquecimento ADC e de 1 tubo de PB para o ensaio com o enriquecimento SFBG. *M. fortuitum* mostrou-se assim fracamente tolerante ao desinfetante A (**QUADRO 7**).

Nas **FIGURAS 33 e 34** está representado graficamente o número de tubos de meio de cultura com os enriquecimentos ADC e SFBG que apresentaram crescimento de acordo com as MCR de referência frente ao desinfetante A.

QUADRO 7. Avaliação da suscetibilidade de *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 e *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 utilizando desinfetante A.

Desinfetante A	Microorganismos	Total de carreadores positivos												Controles	
		Ensaio 1						Ensaio 2						Esterilidade	Viabilidade
		PB	K-ADC	7H9-ADC	PB	K-SFBG	7H9-SFBG	PB	K-ADC	7H9-ADC	PB	K-SFBG	7H9-SFBG		
<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977	6	3	2	10	4	6	NR	NR	NR	NR	NR	NR	C	C	
<i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	C	C	
<i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841	1	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	C	C	

PB – Proskauer-Beck modificado, K – Kirchners, 7H9 – Middlebrook 7H9, SFBG – Soro Fetal bovino com glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, NR – Não realizado, C – Conforme, ATCC - *American Type Culture Collection*.

QUADRO 8. Avaliação da resistência dos microrganismos *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 e *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 frente às diluições do fenol no ensaio com o desinfetante A.

Desinfetante A	Microorganismos	Controle de Resistência do Microorganismo ao Fenol - Ensaio 1		Controle de Resistência do Microorganismo ao Fenol - Ensaio 2	
		F (ADC)	F (SFBG)	F (ADC)	F (SFBG)
<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977		Dentro do Padrão	Dentro do Padrão	Não Realizado	Não Realizado
<i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752		Sensível	Sensível	Dentro do Padrão	Dentro do Padrão
<i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841		Sensível	Sensível	Dentro do Padrão	Dentro do Padrão

F - Fenol, SFBG – Soro Fetal bovino com glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - *American Type Culture Collection*.

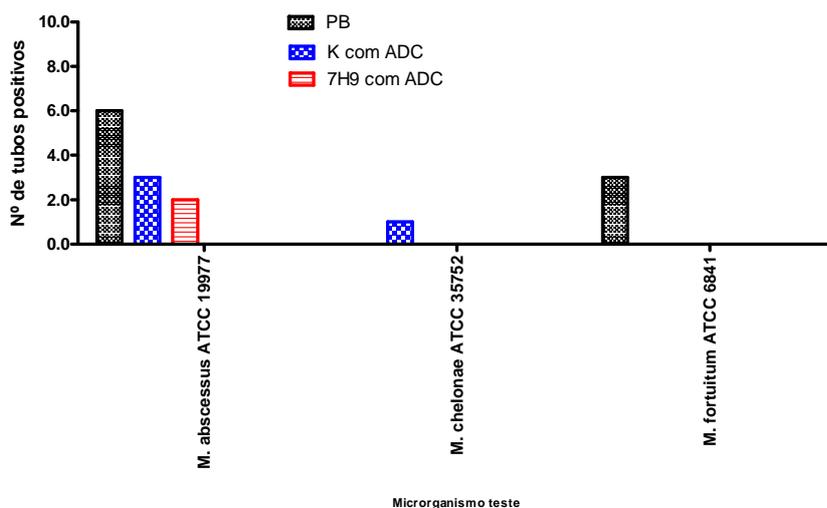


Figura 33. Avaliação da suscetibilidade das MCRs de referência frente ao desinfetante A utilizando os meios de cultura com o enriquecimento ADC. MCR – micobactérias de crescimento rápido, PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC – *American Type Culture Collection*, M – *Mycobacterium*.

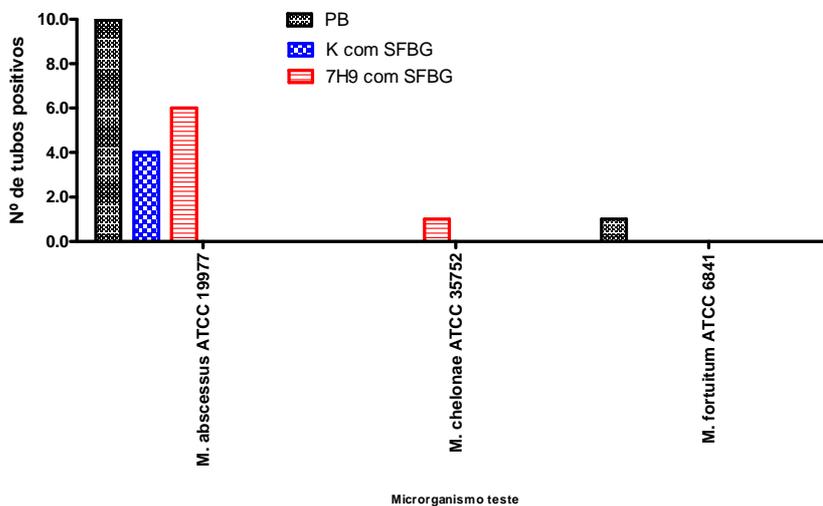


Figura 34. Avaliação da suscetibilidade das MCRs de referência frente ao desinfetante A utilizando os meios de cultura com o enriquecimento SFBG. MCR – micobactérias de crescimento rápido, PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, SFBG – enriquecimento à base de Soro Fetal bovino com Glicose, ATCC – *American Type Culture Collection*, M – *Mycobacterium*.

4.5.3 Desinfetante B

Quanto à avaliação da suscetibilidade das MCR frente ao desinfetante B, em *M. abscessus*, foi observado crescimento em 9 tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado, em 5 tubos contendo meio de Kirchners e em 3 tubos com meio Middlebrook 7H9 com o enriquecimento ADC e, com o enriquecimento SFBG foi observado crescimento em 9 tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado, em 7 contendo meio de Kirchners e em 8 tubos (**QUADRO 9**). *M. abscessus* mostrou-se altamente tolerante ao desinfetante B utilizando os meios de cultura K e 7H9 com o enriquecimento SFBG e, já com o enriquecimento ADC esta micobactéria apresentou-se médio tolerante ao mesmo desinfetante.

Para *M. chelonae* não foi observado crescimento em nenhum meio de cultura (Proskauer-Beck modificado, Kirchners e Middlebrook 7H9) tanto com enriquecimento ADC quanto com SFBG, porém o microrganismo estava sensível no controle da resistência frente às diluições do fenol (**QUADRO 9 e 10**). Foi necessária, então, a repetição do ensaio e não foi novamente observado crescimento em nenhum meio de cultura com os dois enriquecimentos e, o microrganismo neste segundo ensaio estava dentro do padrão de resistência frente às diluições do fenol (**QUADRO 9 e 10**), confirmando assim que *M. chelonae* foi eliminado pelo desinfetante B utilizando os dois enriquecimentos.

Já para *M. fortuitum*, foi observado apenas crescimento em um tubo de PB no ensaio com o enriquecimento ADC e em um tubo de PB no ensaio com o enriquecimento SFBG, porém este microrganismo estava sensível no controle da resistência frente às diluições do fenol (**QUADRO 9 e 10**). Foi necessária, então, a repetição do ensaio e o crescimento observado foi de 1 tubo com o meio PB para o ensaio com o enriquecimento ADC e de 3 tubos de PB para o ensaio com o enriquecimento SFBG. *M. fortuitum* mostrou-se assim fracamente tolerante ao desinfetante B (**QUADRO 9**).

Nas **FIGURAS 35 e 36** está representado graficamente o número de tubos de meio de cultura com os enriquecimentos ADC e SFBG que apresentaram crescimento de acordo com as MCR de referência frente ao desinfetante B.

QUADRO 9. Avaliação da suscetibilidade de *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 e *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 utilizando o desinfetante B.

Desinfetante B	Microorganismos	Total de carreadores positivos												Controles	
		Ensaio 1						Ensaio 2						Esterilidade	Viabilidade
		PB	K-ADC	7H9-ADC	PB	K-SFBG	7H9-SFBG	PB	K-ADC	7H9-ADC	PB	K-SFBG	7H9-SFBG		
<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977	9	5	3	9	7	8	NR	NR	NR	NR	NR	NR	C	C	
<i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C	C	
<i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	0	C	C	

PB – Proskauer-Beck modificado, K – Kirchners, 7H9 – Middlebrook 7H9, SFBG – Soro Fetal bovino com glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, NR – Não realizado, C – Conforme, ATCC - *American Type Culture Collection*.

QUADRO 10. Avaliação da resistência dos microrganismos *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 e *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 frente às diluições do fenol no ensaio com o desinfetante B.

Desinfetante B	Microorganismos	Controle de Resistência do Microrganismo ao Fenol - Ensaio 1		Controle de Resistência do Microrganismo ao Fenol - Ensaio 2	
		F (ADC)	F (SFBG)	F (ADC)	F (SFBG)
<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977		Dentro do Padrão	Dentro do Padrão	Não Realizado	Não Realizado
<i>Mycobacterium chelonae</i> ATCC 35752		Sensível	Sensível	Dentro do Padrão	Dentro do Padrão
<i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 6841		Sensível	Sensível	Dentro do Padrão	Dentro do Padrão

F - Fenol, SFBG – Soro Fetal bovino com glicose, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC - *American Type Culture Collection*.

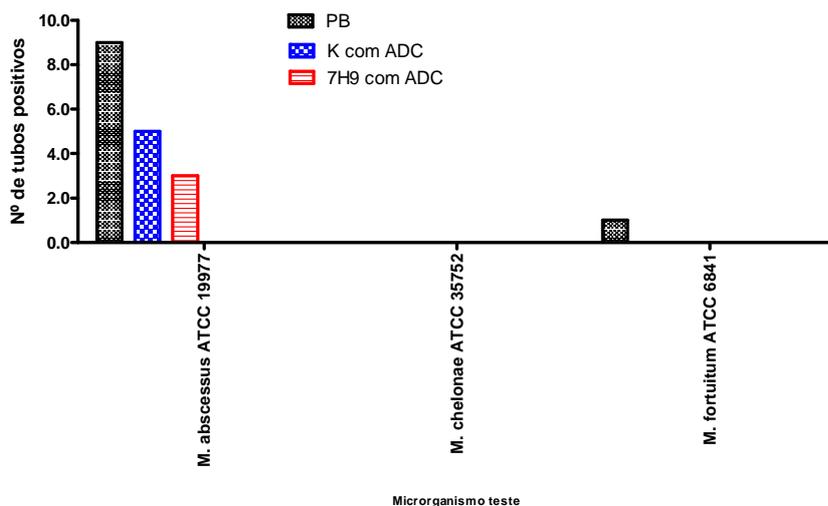


Figura 35. Avaliação da suscetibilidade das MCRs de referência frente ao desinfetante B utilizando os meios de cultura com o enriquecimento ADC. MCR – micobactérias de crescimento rápido, PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, ADC – enriquecimento Middlebrook ADC, ATCC – *American Type Culture Collection*, M – *Mycobacterium*.

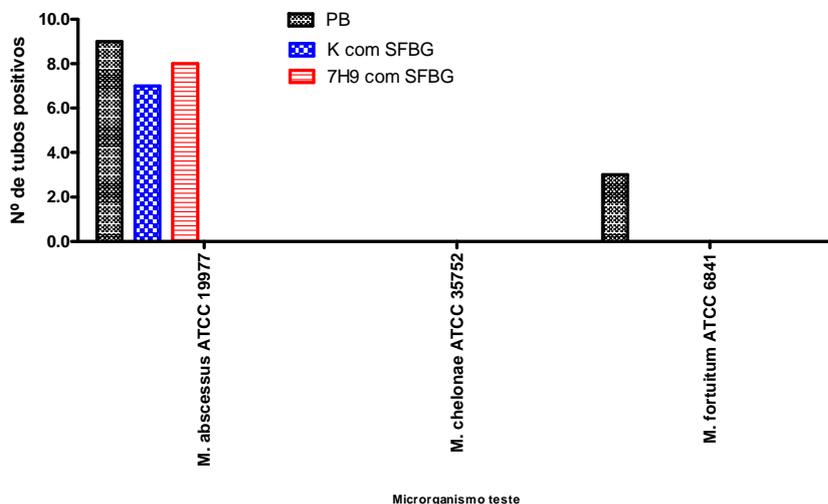


Figura 36. Avaliação da suscetibilidade das MCRs de referência frente ao desinfetante B utilizando os meios de cultura com o enriquecimento SFBG. MCR – micobactérias de crescimento rápido, PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, SFBG – enriquecimento à base de Soro Fetal bovino com Glicose, ATCC – *American Type Culture Collection*, M – *Mycobacterium*.

5 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi comparar a taxa de crescimento de algumas micobactérias utilizando o enriquecimento comercial *Middlebrook ADC Enrichment* (ADC) e um enriquecimento formulado em laboratório contendo soro fetal bovino adicionado de glicose (SFBG). Esses enriquecimentos são adicionados a dois dos três meios de cultura empregados no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, sendo esperado que os resultados preliminares possam fornecer subsídios para o desenvolvimento tecnológico do método de avaliação da qualidade de saneantes micobactericidas, não somente por diminuir a dependência em relação a apenas um fabricante do ADC, como também trazer informações sobre o perfil de suscetibilidade de micobactérias envolvidas recentemente em epidemias no Brasil. Este desenvolvimento também está associado a uma demanda institucional, que se estabeleceu após a publicação pela ANVISA da Resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009), na qual está estabelecido que os fabricantes devem comprovar a eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos contra, não somente a cepa *M. bovis* BCG Moreau, como também contra *Mycobacterium massiliense* INCQS Nº 00594. É importante ressaltar que não haviam estudos realizados no Brasil envolvendo esta micobactéria, sua taxa de crescimento e seu perfil de suscetibilidade em diferentes condições de crescimento antes da publicação da RDC nº 51, e esses aspectos importantes devem ser considerados após a inclusão desta micobactéria na resolução.

O crescimento e exigências nutricionais de micobactérias têm sido intensamente estudados desde a descoberta de *M. tuberculosis* por Koch em 1882. Porém é surpreendente que a identidade de muitos transportadores de nutrientes essenciais de *M. tuberculosis* e de outras micobactérias ainda seja desconhecida, apesar dos consideráveis progressos no desenvolvimento de métodos genéticos para as micobactérias (KANA; MIZRAHI, 2004, MACHOWSKI; DAWES; MIZRAHI, 2005). Recentemente, o metabolismo do carbono de micobactérias atraiu grande interesse com a observação de que *M. tuberculosis* depende do ciclo do glioxilato para sobreviver em camundongos (McKINNEY et al., 2000, MUNOZ-ELIAS; McKINNEY, 2005). Isso indica que *M. tuberculosis* pode utilizar lipídios como

principal fonte de carbono durante a infecção. Por outro lado, os genes que codificam um suposto transportador de dissacarídeos foram considerados essenciais para *M. tuberculosis* durante a primeira semana de infecção (SASSETTI; RUBIN, 2003), indicando que *M. tuberculosis* pode mudar a sua principal fonte de carbono, de carboidratos para lipídios, na resposta imune adaptativa. Obviamente, isso exige que *M. tuberculosis* tenha a capacidade de captar determinados carboidratos e lipídios.

Recentemente Niederweis (2008) publicou uma revisão descrevendo uma comparação entre os possíveis processos de captação de nutrientes em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*. Nessa revisão, os transportadores de carboidratos através da membrana interna das micobactérias foram descritos de acordo com análises *in silico* em combinação com dados experimentais disponíveis na literatura. Em relação à captação de carboidratos, foi observada a presença de somente 5 proteínas transportadoras de carboidratos na membrana interna de *M. tuberculosis*, enquanto *M. smegmatis* possui 28 transportadores a sua disposição. Talvez devido a esse fato, as MCR tenham mais facilidade em captar nutrientes, conseqüentemente um tempo de geração menor do que as micobactérias de crescimento lento.

Outras proteínas também foram identificadas e caracterizadas em micobactérias, estando envolvidas na captação de vários nutrientes, como fosfato (VYAS, N.; VYAS, M; QUIOCHO, 2003, WEBB, 2003, PEIRS et al., 2005, GEBHARD; TRAN; COOK, 2006, WOLSCHEENDORF; MAHFOUD; NIEDERWEIS, 2007), sulfato (WOOFF et al., 2002) e alguns aminoácidos (SETH; CONNELL, 2000, TALAUE et al., 2006).

A presença de duas barreiras lipídicas em micobactérias impõe limitações consideráveis para o transporte de solutos do exterior da célula para o citoplasma e tem importantes conseqüências para a fisiologia e patogênese de micobactérias (NIEDERWEIS, 2008).

Além disso, o conjunto de porinas da membrana externa de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* aparenta ser diferente. Estas diferenças, provavelmente representam adaptações de *M. tuberculosis* ao seu crescimento mais lento (COX; COOK, 2007) e ao seu habitat natural muito diferente. Em particular, proteínas da membrana externa podem oferecer uma enorme vantagem como alvos de drogas, já que os inibidores não precisariam atravessar a membrana externa. Outro ponto interessante, é que provavelmente essas porinas, novos alvos de drogas, não parecem demonstrar

qualquer similaridade com outras proteínas (FALLER; NIEDERWEIS; SCHULZ, 2004).

A sobrevivência dos microrganismos em laboratório depende da sua capacidade de crescer sob certas substâncias químicas e físicas. A compreensão dessas condições permitiria caracterizar cepas e diferenciar os tipos de micobactérias. Nutrientes ou fatores de crescimento também são necessários para crescimento celular e manutenção dos organismos (BRITTLE, 2009).

Em laboratório, muitas vezes o glicerol é a fonte de carbono preferencial para crescimento abundante de muitas micobactérias, incluindo *M. tuberculosis*. No entanto, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti* são incapazes de utilizar o glicerol como única fonte de carbono, necessitando da adição de piruvato ao meio de cultura de modo a permitir o crescimento. Na presença de glicerol, as micobactérias conseguem produzir um excesso de lipídios e polissacarídeos, o que pode explicar a maior massa de bacilos obtidos neste substrato por unidade de volume de meio de cultura. As influências do glicerol sobre culturas micobacterianas surgiram a partir do fato de que o glicerol e seus derivados metabólicos podem atuar como precursores na biossíntese de lipídios e de constituintes da parede celular (KEATING et al., 2005).

Outro estudo, realizado por Hedgecock em 1968 descreveu as características nutricionais das micobactérias atípicas. Foram testados vários compostos de carbono simples (ácido oleico, glicerol, glicose, ácido pirúvico, ácido acético, D-ribose) que foram adicionados em meio de Kirchner e compararam o crescimento de micobactérias atípicas com linhagens de *M. tuberculosis*. A maior taxa de crescimento das micobactérias testadas ocorreu em meio de Kirchner modificado contendo ácido oleico como única fonte de carbono.

Sangue, plasma, soro ou outros fluidos corporais também podem contribuir como fatores de crescimento para meios de cultura para isolamento e cultivo de patógenos (BRITTLE, 2009).

Os meios de cultura consistem da associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento de microrganismos fora do seu meio natural. Eles são essenciais para o crescimento dos microrganismos e as exigências básicas para um meio incluem, uma fonte de nutriente, um agente solidificante (para meios sólidos), um pH determinado, e vários aditivos específicos. As exigências nutritivas da maioria dos microrganismos são

complexas. A maior parte deles utiliza uma disposição de fontes nutrientes que incluem o nitrogênio, o carbono, sais inorgânicos, minerais, e outras substâncias diversas (MURRAY, 2007).

Os microrganismos apresentam diferentes comportamentos quando crescidos em meios de cultura. Isto se deve, porque o seu metabolismo é totalmente alterado neste meio de cultura em que ele se encontra, como por exemplo, em meios com poucos nutrientes, ou seja, “meios pobres”, ou, em meios com muitos nutrientes, “meios ricos”. É muito comum que a formulação destes meios de cultura seja alterada para nosso benefício, visando um melhor crescimento, recuperação ou identificação destes microrganismos e, para que isto aconteça são utilizados meios seletivos, meios diferenciais e meios de enriquecimento.

Os meios seletivos são elaborados com o objetivo de favorecer o crescimento do microrganismo de interesse e impedir o crescimento de outros microrganismos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Eles contêm os aditivos que realçam essa detecção do microrganismo desejado inibindo aqueles não desejados. Porém, a eficácia desses meios seletivos pode variar, colônias pequenas de microrganismos parcialmente inibidos podem estar presentes nos meios, como também, os ingredientes que fazem meios altamente seletivos podem acabar inibindo o microrganismo a ser preferencialmente selecionado (MURRAY, 2007).

O meio diferencial é utilizado para a fácil identificação da colônia do microrganismo de interesse quando existem outros microrganismos muito parecidos crescendo na mesma placa de meio de cultura (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). É uma identificação presuntiva através da aparência dos microrganismos nos meios de cultura. Isto pode ser demonstrado pela coloração da colônia ou por um precipitado que se forme sobre ou em torno da colônia (MURRAY, 2007). Em alguns casos, as características dos meios seletivos e diferenciais podem ser combinadas no mesmo meio de cultivo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Para o isolamento de microrganismos presentes em pequeno número junto com outros que estão em grande quantidade, é necessária a utilização de meios de enriquecimento. O meio utilizado para enriquecimento de uma cultura normalmente é líquido e contém todos os nutrientes necessários para favorecer a multiplicação do microrganismo de interesse, considerado exigente e fastidioso, facilitando assim sua detecção (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Algumas micobactérias se enquadram na classificação de microrganismos exigentes, sendo comumente crescidas e isoladas em meios de cultura sólidos à base de ovo, meios ágar base e meios de cultura líquidos específicos. Estes dois últimos são quimicamente melhor definidos e alguns utilizam enriquecimentos na sua formulação que são essenciais para o crescimento do microrganismo (MURRAY, 2007).

Os meios à base de ovo contêm vários aditivos e, um deles é o verde malaquita, que inibe parcialmente o crescimento de bactérias contaminantes que não micobactérias e atua como um indicador de pH. Estes meios têm uma boa capacidade tampão e uma vida útil longa (vários meses sob refrigeração) e suportam o crescimento da maioria das micobactérias. Dos meios de cultura à base de ovo, Löwestein-Jensen (LJ) é mais comumente usado (MURRAY, 2007), porém, utilizam-se também os meios Ogawa e *American Trudeau Society* (ATS) (PARISH; STOKER, 1998).

Culturas de micobactérias em meios sólidos são mais específicas e sensíveis, mas o crescimento nos mesmos pode levar semanas (MIROVIC; LEPSANOVIC, 2002). Já os meios de cultura líquidos, mais utilizados para o crescimento das micobactérias são Proskauer-Beck, Sauton, Kirchner, Middlebrook e Dubos (PARISH; STOKER, 1998), esses meios normalmente proporcionam uma ótima recuperação destes microrganismos (MURRAY, 2007). Os meios de cultura PB e Sauton são quimicamente definidos enquanto que os outros contêm proteína animal. Proskauer-Beck também é útil para o cultivo de grandes quantidades de *M. tuberculosis* e outras espécies através do crescimento em forma de películas de superfície (PARISH; STOKER, 1998).

O meio de Kirchner pode ser utilizado como meio seletivo aumentando a taxa de isolamento das micobactérias a partir de amostras clínicas, tais como tecidos e líquidos do corpo, que geralmente tem pequenas populações bacterianas. Isso foi observado em um estudo desenvolvido por David (2004), onde a cultura direta de amostras clínicas utilizando-se o meio de Kirchner apresentou uma positividade maior em relação a recuperação de micobactérias do que quando foi utilizado o meio LJ. Outros estudos envolvendo a associação de antimicrobianos com o meio de Kirchner também obtiveram o mesmo resultado positivo (MITCHISON; ALLEN; MANICKAVASAGAR, 1983, SPARHAM; HARRIS; SPENCER, 1984, MATHEW et al., 1995, VANAJAKUMAR et al., 1997). Além disso, como acontece com outros

meios de cultura seletivos, Kirchner pode ser usado para recuperar micobactérias a partir de culturas contaminadas (PARISH; STOKER, 1998).

Os meios ágar base são aqueles desenvolvidos por Middlebrook e colaboradores. Estes são os meios de cultura "7H", e foram desenvolvidos através de uma série de alterações nas fórmulações. Cada pequena alteração aos constituintes conduziu a uma alteração no número do meio como, por exemplo, 7H9, 7H10 e 7H11. Existem apenas poucos fornecedores comerciais destes meios na forma desidratada, podendo também serem produzidos internamente no laboratório, embora a variação do lote de produção seja geralmente maior do que aquela apresentada pelo lote comercial.

O meio Middlebrook 7H9 é provavelmente o meio líquido mais utilizado nas investigações de pesquisa, desenvolvido para acelerar o crescimento e a taxa de recuperação de micobactérias no laboratório (LU; HEEREN; DUNNE, 2002), sendo necessária nesse meio à adição do enriquecimento a base de albumina, dextrose e catalase (ADC), assim como no meio Middlebrook 7H10 e 7H11 que são enriquecidos com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC). O ácido oleico desempenha um papel importante no metabolismo da micobactéria, a albumina age como um agente de proteção se ligando a ácidos graxos livres, tóxicos para as micobactérias, enquanto que a glicose é incluída como uma fonte de energia e a catalase destrói todos os peróxidos tóxicos que podem estar presentes no meio (BRITTLE et al, 2009). É importante reconhecer o valor dos meios de cultura Middlebrook tanto para trabalhos de pesquisa e diagnóstico (PARISH; STOKER, 1998).

Existem muitas dificuldades para recuperar, isolar e identificar as micobactérias em amostras clínicas e de água. Foram realizados alguns estudos comparando vários métodos de cultura para isolar espécies de micobactérias em águas de superfície, água tratada e amostras clínicas, sendo o objetivo principal desses, identificar o método que apresente o melhor desempenho para isolamento do microrganismo (NEUMANN et al., 1997, JUAN et al., 2006, WHITTINGTON, 2009, RADOMSKI et al., 2010)

Outros estudos compararam sistemas automatizados (BACTEC 460, BACTEC MGIT 960, MB/BacT), utilizando meios líquidos, com os métodos que utilizam os meios sólidos convencionais. Os sistemas automatizados mostraram-se mais sensíveis e com um menor tempo de detecção das micobactérias, porém,

muitos afirmam que a combinação do sistema automatizado com o método de cultura convencional poderia ser capaz de realizar uma maior recuperação das micobactérias (ROHNER et al., 1997, IDIGORAS et al., 2000, HARRIS et al., 2000, PIERSIMONI et al., 2001, LU; HEEREN; DUNNE, 2002, MIROVIC; LEPSANOVIC, 2002, GIL-SETAS et al., 2004, COELHO et al., 2005, ALMEIDA et al., 2005, RISHI et al., 2007, BRITTLE et al., 2009, SORLOZANO et al., 2009). Segundo o *Center for Disease Control* (CDC), apesar do importante papel desempenhado pelos meios sólidos no isolamento de amostras clínicas, é ainda recomendada a utilização em paralelo de um meio líquido (SORLOZANO, 2009).

Já outros estudos compararam vários tipos de meios de cultura com o objetivo de melhor crescimento, isolamento e rápida detecção de micobactérias (LIU et al., 1973, KONONOV; DANG TA; HEIFETS, 1988, BHATTACHARYA et al., 2009, AKYAR et al., 2010). Na literatura podemos perceber uma busca incessante por parte dos pesquisadores, por um meio de cultura, um método de cultura ou um sistema automatizado, que se transformem em um procedimento de eleição para facilitar o crescimento, a detecção e identificação das micobactérias.

Assim como os meios de cultura, os enriquecimentos utilizados para suplementar estes meios também são muito importantes, porém, os enriquecimentos comerciais disponíveis à venda são caros, possuem um limitado prazo de validade e apenas um fabricante, o que dificulta muito sua aquisição. Até o momento, poucos foram os estudos realizados com o objetivo de se tentar substituir os enriquecimentos ADC e OADC.

Fonseca, da Silva e Gontijo Filho (1985) realizaram um estudo de comparação de crescimento utilizando o enriquecimento ADC, e outro de menor custo financeiro, por ser formulado no próprio laboratório, constituído de soro fetal bovino e glicose (SFBG). Os autores compararam o crescimento de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, entre elas a cepa de *M. bovis* BCG Moreau, e verificaram que os resultados obtidos não se apresentaram diferentes, em relação ao crescimento das micobactérias, para os dois enriquecimentos testados.

Já em 2000, Heifets e Sanchez, realizaram uma pesquisa sobre um novo meio de cultura sólido para teste de sensibilidade de *M. tuberculosis* à pirazinamida. Este meio tem um pH ácido de 6,0, para fornecer condições ideais para a atividade da pirazinamida, em vez do habitual de 6,8 utilizado nos meios de ágar. Também difere do meio convencional, o ágar Middlebrook 7H10/7H11, onde o soro fetal

bovino (SFB) e soro fetal eqüino (SFE) são usados em vez do enriquecimento ácido oleico-albumina-dextrose-catalase (OADC) para suportar um bom crescimento de *M. tuberculosis* no baixo pH de 6,0. O crescimento no novo meio de cultura com os enriquecimentos à base de SFB e SFE em pH 6,8 foram iguais e às vezes superiores ao cultivo em OADC e, já em pH 6,0 os enriquecimentos à base de soro apresentaram crescimentos superiores.

No presente estudo, após a análise estatística, não foi evidenciada diferença significativa na taxa de crescimento apresentada por *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* e *M. massiliense* utilizando-se os dois enriquecimentos, ADC e SFBG. Observou-se também, no ensaio de avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes, que a recuperação destes microrganismos foi maior em SFBG do que em ADC em alguns casos.

Os resultados obtidos no presente estudo se apresentaram muito similares quando comparados com os desenvolvidos por Fonseca, da Silva e Gontijo Filho (1985) e Heifets e Sanchez (2000). Porém um estudo mais abrangente é necessário, envolvendo a finalização dos ensaios com *M. bovis* BGC Moreau, e realização de estudos de validação intra-laboratorial e inter-laboratorial relacionados à substituição do enriquecimento a ser empregado oficialmente nos ensaios para avaliação da atividade micobactericida de saneantes.

Em relação aos ensaios de avaliação da qualidade dos desinfetantes, no presente estudo, *M. massiliense* INCQS nº 00594 apresentou crescimento em todos os 30 tubos de meio de cultura empregados tanto para o desinfetante A quanto para o desinfetante B quando aplicado o Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida seguindo a metodologia oficial descrita no POP INCQS nº 65.3210.004 utilizando os meios de cultura K e 7H9, e a comparação entre os enriquecimentos ADC e SFBG.

Nos ensaios de avaliação da suscetibilidade das MCR, *M. chelonae* ATCC 35572 foi a única cepa que foi eliminada pelo desinfetante B. *M. bovis* cepa BCG Moreau INCQS nº 00062, *M. abscessus* ATCC 19977 e *M. fortuitum* ATCC 6841 se mostraram menos tolerantes que *M. massiliense* INCQS nº 00594, porém não foram eliminados totalmente pelos dois desinfetantes à base de glutaraldeído a 2%, como determina a metodologia oficial.

Todos os meios de cultura citados são muito importantes para o crescimento, isolamento e identificação das micobactérias. Porém, quando é realizado um ensaio

para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes há dificuldades de recuperação deste microrganismo. Por isso, os enriquecimentos são considerados tão importantes na preparação dos meios de cultura utilizados neste ensaio. Isto se deve ao fato de que quando este método é realizado, a micobactéria teste passa por um “estresse” após contato com o desinfetante, fazendo com que o meio de cultura que receba uma quantidade muito pequena deste microrganismo, que é o esperado, possa recuperar esta micobactéria. O resultado deste ensaio é crucial para a determinação da qualidade do produto, por isso a importância da utilização de meios enriquecidos que possam realmente demonstrar um resultado fidedigno.

6 CONCLUSÃO

- Os perfis das curvas de crescimento de cada microrganismo, *M. abscessus* ATCC 19977, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. chelonae* ATCC 35572 e *M. massiliense* INCQS nº 00594, foram muito semelhantes quando comparados os enriquecimentos utilizados ADC e SFBG nos meios de cultura K e 7H9 e, após a análise estatística, verificou-se que não havia diferença significativa entre os mesmos na presença dos diferentes enriquecimentos.
- Na avaliação da atividade micobactericida dos desinfetantes foi observado que nenhum dos produtos à base de glutaraldeído (desinfetante A e B) foi eficaz frente à cepa de *M. bovis* BCG Moreau INCQS nº 00062. Houve uma recuperação maior do microrganismo utilizando os meios de cultura K e 7H9 acrescidos do enriquecimento SFBG.
- Verificou-se que dois desinfetantes à base de glutaraldeído não foram capazes de destruir a cepa de *M. massiliense* INCQS nº 00594 durante a avaliação da atividade micobactericida dos desinfetantes, utilizando os dois enriquecimentos testados, ADC e SFBG.
- Os dois desinfetantes não se apresentaram satisfatórios seguindo o Método para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes adotado atualmente pelo INCQS.
- Quanto à verificação da suscetibilidade de *M. chelonae* ATCC 35572, frente aos dois produtos à base de glutaraldeído, o microrganismo foi eliminado apenas pelo desinfetante B e não foi eliminado pelo desinfetante A, apresentando-se fracamente tolerante, quando utilizado os diferentes enriquecimentos.
- *M. abscessus* ATCC 19977 apresentou-se médio tolerante ao desinfetante A utilizando os dois enriquecimentos, quanto ao desinfetante B, essa cepa de

referência foi altamente tolerante quando SFBG foi adicionado aos meios de cultura.

- *M. fortuitum* ATCC 6841 também não foi eliminado pelos desinfetantes A e B, apresentando um comportamento fracamente tolerante aos mesmos.

REFERÊNCIAS

ADÉKAMBI, T. et al. Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.12, p. 5493-5501, 2004.

AKYAR, I. et al. Lateral flow assay for rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and 97 species of mycobacteria other than tuberculosis grown in Löwestein-Jensen and TK-SLC medium. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 28, n. 4, p. 308-312, 2010.

ALI, L., KHAMBATY, F.; DIACHENKO, G. Investigating the suitability of the Calgary Biofilm Device for assessing the antimicrobial efficacy of new agents. **Bioresour. Technol.** Article in Press. 2005.

ALMEIDA, E.A.D. et al. Rendimento da cultura de escarro na comparação de um sistema de diagnóstico automatizado com o meio de Lowenstein-Jensen para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. **J. Bras. Pneumol.**, v. 31, n. 3, p. 231-236, 2005

ANVISA. 2007a. Nota técnica Nº 02 /DEVEP/SVS/MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária on line, publicado em 11 de abril de 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2007/110407.htm>. Acesso em: 03 nov. 2008.

ANVISA. 2007b. Informe técnico nº4. Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência à saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária on line, publicado em março de 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/control/Alertas/informe_tecnico_04.pdf. Acesso em: 09 mai. 2009.

ANVISA. 2008. Nota técnica informa sobre infecções causadas por micobactérias, Agência Nacional de Vigilância Sanitária on line, publicado em 08 de agosto de

2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_2.htm.

Acesso em: 28 out. 2008.

ARAUJO, D.V.; MARIA, O.I.; BAPTISTA, F.D. Micobactérias. Divulgado em 06 de novembro de 2008. Disponível em:

http://hansen.bvs.ilsi.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoas/PDF/micro.pdf.

Acesso em: 21 abr. 2009.

ASSIS, A.A.R. **Estudo de *Mycobacterium phlei* (ATCC 11758) como agente agregante para hematita e quartzo**. Minas Gerais: UFMG, 2007. 102 p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia da UFMG, Minas Gerais.

ATCC. American Type Culture Collection. The Global Bioresource Center. **How to Revive Cultures**. Disponível em:

<http://www.atcc.org/HowtoReviveCultures/tabid/695/Default.aspx>. Acesso em: 21 abr. 2009.

BHATTACHARYA, S. et al. Comparison of a novel bilayered medium with the conventional media for cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. **Indian J. Med. Res.**, v. 130, p. 561-566, 2009.

BLOCK, S.S. Disinfection, Sterilization and Preservation. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1481 p., 2001.

BOLDIN, B.; BONTEN, M.J.M.; DIEKMANN, O. Relative effects of barrier precautions and topical antibiotics on nosocomial bacterial transmission: results of multi-compartment models. **Bull. Math. Biol.**, v. 69, n. 7, p. 2227-2248, 2007.

BRASIL. Decreto nº79094 de 5 de Janeiro de 1977a. Regulamenta a Lei nº6360 de 23 de Setembro de 1976. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 114-141, 5 set. 1977.

BRASIL. Lei nº 6360 de 23 de Setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância a que ficam submetidos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos e outros produtos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 90-102, 24 set. 1976.

BRASIL. Lei nº 6437 de 20 de Agosto de 1977b. Configura as infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 193-200, 5 set. 1977.

BRASIL. Lei nº 9782 de 26 de Janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 1-6, 27 jan. 1999.

BRASIL. Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: <http://www.saude.inf.br/legisl/lei8080.htm>. Acesso em: 21 abr. 2009.

BRASIL. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares anexas à presente. Estabelecer o prazo até as respectivas revalidações dos registros para que os produtos aqui abrangidos e anteriormente registrados se adequem ao novo regulamento. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, p.17041-3, 5 de set 1988, Seção I.

BRASIL. Resolução RDC nº14 de 28 de Fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 mar. 2007. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/saneantes/legis/especifica/desinfetante.htm>. Acesso em 03 nov.2008.

BRASIL. Resolução nº 75 de 23 de outubro de 2008. Dispõe sobre a comprovação de eficácia de Esterilizantes e Desinfetantes Hospitalares para Artigos SemiCríticos frente às micobactérias *Mycobacterium abscessus* e *Mycobacterium massiliense* e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 27 out. 2008. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=33819&word=resolu%C3%A7%C3%B5>. Acesso em 21 abr. 2009.

BRASIL. Resolução RDC nº 35 de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 ago. 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0035_16_08_2010.html. Acesso em 20 ago. 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº 51 de 21 de outubro de 2009. Dispõe sobre a comprovação da eficácia de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente à micobactéria *Mycobacterium massiliense* e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 out. 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0051_21_10_2009.html. Acesso em 29 set. 2010.

BRITO, A.C. **Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em Saúde Pública**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2008.

BRITTLE, W.et al. Improvement in Mycobacterial yield and reduced time to detection in pediatric samples by use of a nutrient broth growth supplement. **J. Clinical Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 1287-1289, 2009.

BRITTLE, W. **The optimization of laboratory cultivation in childhood mycobacterial disease in South Africa**. 2009. 92 p. Thesis (Master of Technology: Biomedical Technology) - Faculty of Health and Wellness Sciences, Cape Peninsula University of Technology, Cape Town, 2009.

BROWN-ELLIOT, B.A.; GRIFFITH, D.E.; WALLACE, R.J. Newly described emerging human species of nontuberculous mycobacteria. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, n. 1, p. 187-220, 2002.

BROWN-ELLIOT, B.A.; WALLACE Jr, R.J.; Infections caused by Nontuberculous Mycobacteria. In: Mandell, Benett & Dolin. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6 ed. Philadelphia: Elsevier, p. 2909-2915, 2005.

BUCHER, A. Hand hygiene – is hand disinfection the best solution? **Tidsskr Nor Laegeforen.**, v. 120, n. 4, p. 472-475, 2000.

CARBONNE, A. et al. Outbreak of nontuberculous mycobacterial subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 6, p. 1961-1964, 2009.

CHEN, C.Y.; NACE, G.W.; IRWIN, P.L. A 6X6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Methods**, v. 55, p. 475-479, 2003.

CHO, A.Y. et al. Identification of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infections associated with repeated surgical procedures. **Ann. Dermatol.**, v. 22, n. 1, p.114-118, 2010.

COELHO, A.G.V. Comparativo entre técnicas de Lowenstein-Jensen e do sistema MB/BacT no isolamento de micobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 132-136, 2005.

COLLINS, F.M.; MONTALBINE, V. Mycobactericidal activity of glutaraldehyde solution. **J. Clin. Microbiol.**, v. 4, p. 408-412, 1976.

COROS, A.; DE CONNO, E.; DERBYSHIRE, K.M. A *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among *Mycobacterial* species. **J. Bacteriol.**, v.190, n. 9, p. 3408-3410, 2008.

COVERT, T.C. et al. Occurrence of non-tuberculous mycobacteria in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 2492-2496, 1999.

COX, R.A.; COOK, G.M. Growth regulation in the mycobacterial cell. **Curr. Mol. Med.**, v. 7, p. 231-245, 2007.

DAVID, S.T. et al. Detecting mycobacteraemia for diagnosing tuberculosis. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, p. 259-266, 2004.

DAWSON, D.J. Mycobacterial terminology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3913, 2000.

EID, A.J. et al. Prosthetic Joint infection due to rapidly growing mycobacteria: report of 8 cases and review of the literature. **Clin. Infect. Dis.**, v. 45, p. 687-694, 2007.

EMORI, T.G.; GAYNES, R.P. Overview of nosocomial infections, including the role of microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 428-442, 1993.

EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature – Genus *Mycobacterium*. Société de bactériologie systématique et vétérinaire. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>. Acesso em 31 mar. 2011.

FALKINHAM, J.O. III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 177-215, 1996.

FALLER, M.; NIEDERWEIS, M.; SCHULZ, G.E. The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. **Science**, v. 303, p. 1189-1192, 2004.

FAVERO, M.S; BOND, W.W. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: BLOCK, S.S. Disinfection, sterilization and preservation. 5 ed. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 881-917.

FONSECA, L. DE SOUZA; DA SILVA, M.G.; FILHO, P.P.G. Avaliação da eficiência do meio 7H10 com soro fetal bovino no crescimento de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. **Rev. Microbiol.**, v. 16, n. 4, p. 272-274, 1985.

FONTANA, R.T. As Micobactérias de Crescimento Rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 61, n. 3, p. 371-376, 2008.

FREITAS, D. et al. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. **Ophthalmol.**, v. 110, p. 276-285, 2003.

GEBHARD, S.; TRAN, S.L.; COOK, G.M. The Phn system of *Mycobacterium smegmatis*: a second high-affinity ABC-transporter for phosphate. **Microbiol.**, v. 152, p. 3453-3465, 2006.

GIL-SETAS, A. et al. Evaluation of the MB/BacT system compared with Middlebrook 7H11 and Löwenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 224-228, 2004.

GOLDMANN, D.A. Library of Congress (ed). In: Hospital Infections. USA. 982 p. p 767, 1992.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **Altex.**, v. 20, p. 275-281, 2003.

HARRIS, G. et al. Comparison of three isolation systems for the culture of mycobacteria from respiratory and non-respiratory samples. **J. Clin. Pathol.**, v. 53, p. 615-618, 2000.

HEDGECOCK, L.W. Nutritional characteristics of the atypical mycobacteria. **J. Bacteriol.**, v. 96, n. 2, p. 306-313, 1968.

HEIFETS, L.; SANCHEZ, T. New Agar medium for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. **J. Clinical Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 1498-1501, 2000.

HOPPER, W. R., MOSS, R. Common breaks in sterile technique: clinical perspectives and perioperative implications. **AORN J.**, v. 91, n. 3, p. 350-364, 2010.

HOWARD, S.T.; BYRD, T.F. The rapid growing *mycobacteria*: saprophytes and parasites. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 1845-1853, 2000.

IDIGORAS, P. et al. Comparison of the automated nonradiometric Bacted MGIT 960 system with Löwenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 350-354, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3210.004**: Método confirmatório para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes. Rev. 08. Rio de Janeiro, 2009a. 15p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3110.026**: Determinação do teor de glutaraldeído. Rev. 03. Rio de Janeiro, 2009b. 6p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

JORDAN, P.W. et al. Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 459-466, 2007.

JUAN, L. DE et al. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 9, p. 5927-5932, 2006.

KAMPF, G., HOLLINGSWORTH, A. Validity of the four European test strains of prEN 12054 for the determination of comprehensive bactericidal activity of an alcohol-based hand rub. **J. Hosp. Infect.**, v. 55, n. 3, p. 226-231, 2003.

KANA, B.D.; MIZRAHI, V. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* in relation to the discovery of novel drugs and vaccines. **Tuberculosis**, v. 84, p. 63-75, 2004.

KANTOR, I. N. **Bacteriología de la tuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis, 1979. 63 p. (Serie de Monografías Científicas y Técnicas, 11)

KATOCH, V.M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NMT). **Indian J. Med. Res.**, v. 120, p. 290-304, 2004.

KAYABAS, U. et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* because of inadequate disinfection procedures in a urology unit: A pulsed-field gel electrophoresis-based epidemiologic study. **Am. J. Infect. Control.**, v. 36, n. 1, p. 33-38, 2008.

KEATING, L.A. et al. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for *in vivo* growth. **Mol. Microbiol.**, v. 56, n. 1, p. 163-174, 2005

KIM, H.Y. et al. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 9, p. 3127-3130, 2007.

KOCH, R. Die Aetiologie der Tuberculose. **Berliner Klinische Wochenschrift**, v. 19, p. 18, 1882.

KONONOV, Y.; TA DANG, K.; HEIFETS, L. Effect of egg yolk on growth of *Mycobacterium tuberculosis* in 7H12 liquid medium. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, n. 7, p. 1395-1397, 1988.

LANGSRUD, S; SUNDHEIM, G. Factor contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. **J. Appl. Microbiol.**, v. 82, p. 705-712, 1997.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 154-160.

LIU, P.I. et al. Comparison of three culture media for isolation of *Mycobacterium tuberculosis*: a 6-year study. **Appl. Microbiol.**, v. 26, n. 6, p. 880-883, 1973.

LORENA, N.O.S.; DUARTE, R.S.; PITOMBO, M.B. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos vídeo cirúrgicos – a hipótese do glutaraldeído. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 36, p. 266-267, 2009.

LU, D.; HEEREN, B.; DUNNE, W.M. Comparison of the automated mycobacteria growth indicator tube system (BACTED 960/MGIT) with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **Microbiol. Infect. Dis.**, v. 118, p. 542-545, 2002.

MACHOWSKI, E.E.; DAWES, S.; MIZRAHI, V. TB tools to cell the tale – molecular genetic methods for mycobacterial research. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 37, p. 54-68, 2005.

MATHEW, S. et al. Vancomycin for controlling contamination of selective Kirchner's liquid medium in the culture of gastric lavage for tubercle bacilli. **Indian J. Med. Res.**, v. 102, p. 152-155, 1995.

McDONNELL, G.E. **Antisepsis, disinfection and sterilization: types, action and resistance**. Washington: American Society for Microbiology, 2007. p. 89.

McKINNEY, J.D. et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v. 406, p. 735-738, 2000.

MEYER, D.; KLARENBECK, R.; MEYER, F. Current concepts in perioperative care for the prevention of deep surgical site infections in elective spinal surgery. **Cen. Eur. Neurosurg.**, v. 71, p. 117-120, 2010.

MIROVIC, V.; LEPSANOVIC, Z. Evaluation of the MB/BacT system for recovery of mycobacteria from clinical species in comparison to Löwestein-Jensen medium. **Clin. Microbiol. Infec.**, v. 8, n. 11, p. 709-714, 2002.

MITCHISON, D.A.; ALLEN, B.W.; MANICKAVASAGAR, D. Selective Kirchner medium in the culture of specimens other than sputum for mycobacteria. **J. Clin. Pathol.**, v. 36, n. 12, p. 1357-1361, 1983.

MUNOZ-ELIAS, E.J.; MCKINNEY, J.D. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for *in vivo* growth and virulence. **Nat. Med.**, v. 11, p. 638-644, 2005.

MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007.

NEUMANN, M. et al. Comparison of Methods for isolation of Mycobacteria from water. **Appli. Env. Microbiol.**, v. 63, n. 2, p. 547-552, 1997.

NIEDERWEIS, M. Nutrient acquisition by mycobacteria. **Microbiology**, v. 154, p. 679-692, 2008.

NOGUCHI, N. et al. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 172, p. 345-353, 1999.

OTERO, J.J.G. **Riesgos del trabajo del personal sanitario**. 2 ed. Madrid: Interamericana, 1993. p. 269-270.

PARISH, T.; STOKER, N.G. Methods in Molecular Biology: **Mycobacteria protocols**. Vol.101. Totowa: Humana Press, 1998.

PEIRS, P. et al. *Mycobacterium tuberculosis* with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced in vivo virulence. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1898-1902, 2005.

PENNA, T. C. V., MAZZOLA, P. G., MARTINS, A. M. S. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. **BMC Infect. Dis.**, v. 1, n. 16, 2001.

PHYLLIPS, M.S.; VON REYN, C.F. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. 1363-1374, 2001.

PIERSIMONI, C. et al. Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with radiometric BACTED system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 651-657, 2001.

PITTET, D. et al. 'Clean care is safer care': the global patient safety challenge 2005-2006. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 6, p. 419-424, 2006.

PITOMBO, M.B.; LUPI, O.; DUARTE, R.S. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 31, n.11, p. 529-33, 2009.

PRIMM T.P.; LUCERO C.A.; FALKINHAM J.O. III. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 98-106, 2004.

RADOMSKI, N. et al. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 76, n. 11, p. 3514-3520, 2010.

RAMOS, M.C. et al. A retrospective bacteriological study of mycobacterial infections in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 86-90, 2000.

RISHI, S. et al. A comparative study for the detection of mycobacteria by BACTEC MGIT 960, Löwestein-Jensen media and direct AFB smear examination. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 383-386, 2007.

RODRIGUES, E.A.C. et al. **Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle**. São Paulo: Sarvier, 1997. p. 416-420.

ROHNER, P. et al. Evaluation of the MB/BacT system and comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation mycobacteria from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 2, p. 3127-3131, 1997.

ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. 304 p.

RUSSEL, A.D. Principles of antimicrobial activity. In: **Disinfection, sterilization, and preservation**. Pennsylvania: Lea & Febiger, p. 29-58, 1991.

RUSSEL, A.D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, p. 794-803, 2003.

RUTALA, W.A. Disinfection, sterilization and waste disposal. In: WENZEL, R.P. **Prevention and control of nosocomial infections**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1987. p. 247-282.

RUTALA, W.A. Draft APIC Guideline for selection and use of disinfectants. **Am. J. Infect. Cont.**, v. 23, n. 3, p. 35A-67A, 1995.

RUTALA, W.A. APIC Guidelines for selection and use of disinfectants. **Am. J. Infect. Cont.**, v. 24, n. 4, p. 313-342, 1996a.

RUTALA, W.A. Disinfection and sterilization. In: MAYHALL, C.G. **Hospital epidemiology and infection control**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1283p, p. 913-936, 1996b.

SAIDA, N. B., MARZOUK, M., FERJENI, J., BOUKADIDA, J. A three-year surveillance of nosocomial infections by methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in newborns reveals the disinfectant as a possible reservoir. **Pathol. Biologie**, v. 57, n. 3, p. 29-35, 2009.

SASSETTI, C.M.; RUBIN, E.J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 12989-12994, 2003.

SCOTT, E.M.; GORMAN, S.P. Glutaraldehyde. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 361-381.

SETH, A.; CONNELL, N.D. Amino acid transport and metabolism in mycobacteria: cloning, interruption, and characterization of an L-arginine/gamma-aminobutyric acid permease in *Mycobacterium bovis* BCG. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 919-927, 2000.

SHIN, J.H. et al. Prevalence of non-tuberculous mycobacteria in a hospital environment. **J. Hosp. Infect.**, v. 65, p. 143-148, 2007.

SHINNICK, T.M.; GOOD, R.C. Mycobacterial taxonomy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 13, p. 884-901, 1994.

SORLOZANO, A. et al. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, n. 10, p. 1259-1264, 2009.

SOUTO, A. S.S. **Avaliação da suscetibilidade de *Mycobacterium massiliense* isolados de surto epidêmico de infecções de sítio cirúrgico em hospitais do Rio de Janeiro frente a desinfetantes**. 2011. 87 p. Tese (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

SPARHAM, P.D.; HARRIS, D.M.; SPENCER, R.C. Selective Kirchner medium in the culture of specimens for mycobacteria. **J. Clin. Pathol.**, v. 37, n. 5, p. 598-599, 1984.

TALAUÉ, M.T. et al. Arginine homeostasis in J774.1 macrophages in the context of *Mycobacterium bovis* BCG infection. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 4830-4840, 2006.

TIMERMAN, A. Micobactérias não-tuberculosas e doenças associadas. In: **Tratado de Infectologia**. 3.ed. Editora Atheneu, 2005.

TIWARI, T.S. et al. Forty years disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p.954-962, 2003.

TOMASINO, S. Disinfectants. In: **Official Methods of Analysis**. 18 ed. Revision 2. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, cap. 6, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 68-69.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004. 718 p.

USLAN, D.Z. et al. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria. **Arch. Dermatol.**, v. 142, p. 1287-1292, 2006.

VAN DER VALK, J. et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicol. in Vitro.**, v. 18, p. 1-12, 2004.

VANAJAKUMAR, N. et al. Transportation of lymph biopsy specimens in selective Kirchner's liquid medium for culture of tubercle bacilli. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 260-262, 1997.

VIANA-NIERO, C. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletti* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 850-855, 2008.

VON REYN, C.F. et al. Persistent colonization of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. **Lancet.**, v. 343, p. 1137-1141, 1994.

VON REYN, C.F. et al. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire and Kenya. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 3227-3230, 1993.

VYAS, N.K.; VYAS, M.N.; QUIOCHO, F.A. Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. **Structure**, v. 11, p. 765-774, 2003.

WAGNER, D.; YOUNG, L.S. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. **Infection**, v. 32, p. 257-270, 2004.

WALLACE JR, R.J.; BROWN, B.A.; GRIFFITH, D.E. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 52, p. 453-490, 1998.

WEBB, M.R. Mycobacterial ABC transport system: structure of the primary phosphate receptor. **Structure**, v. 11, p. 736-738, 2003.

WHITTINGTON, R.J. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 3, p. 614-622, 2009.

WOLSCHEENDORF, F.; MAHFOUD, M.; NIEDERMEIS, M. Porins are required for uptake of phosphates by *Mycobacterium smegmatis*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 2435-2442, 2007.

WOOFF, E. et al. Functional genomics reveals the sole sulphate transporter of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its relevance to the acquisition of sulphur *in vivo*. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p. 653-663, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Alliance for Patient Safety: forward programme 2005. Geneva: WHO, 2005. Disponível em: www.who.int/patientsafety/en/brochure_final.pdf. Acesso em 01 abr. 2011.

ANEXO A - MEIOS DE CULTURA

A.1 – Caldo Proskauer-Beck modificado

Fosfato monopotássico.....	2,5 g
Asparagina	5,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado.....	0,6 g
Sulfato de zinco heptahidratado	0,001 g
Citrato de magnésio	2,5 g
Cloreto férrico	0,0046 g
Glicerol	20,0 mL
Água purificada.....	1000 mL

Aquecer a mistura para dissolver. Ajustar o pH a $7,3 \pm 0,1$ a 25°C , com solução de NaOH 1M. Filtrar através de papel de filtro e autoclavar durante 20 minutos a 121°C . Filtrar novamente através de papel de filtro e distribuir em porções de 10 ou 20 mL em tubos de 25 mm x 200 mm ou similar com tampa de rosca. Re-autoclavar durante 20 minutos a 121°C .

A.2 – Meio Middlebrook 7H9

Sulfato de amônio	0,5 g
L- ácido glutâmico	0,5 g
Citrato de sódio	0,1 g
Piridoxina	0,001 g
Biotina	0,0005 g
Fosfato dissódico	2,5 g
Fosfato monopotássico.....	1,0 g
Citrato de ferro amoniacal	0,04 g
Sulfato de magnésio	0,05 g
Cloreto de cálcio	0,0005 g
Sulfato de zinco	0,001 g
Sulfato de cobre	0,001 g

Água purificada contendo 2,0 mL de glicerol e 1,0 de ágar.....900 mL

pH final do meio base: $6,6 \pm 0,2$ a 25° C.

Dissolver os componentes do meio base em 900 mL de água purificada contendo 2,0 mL de glicerol e 1,0 g de ágar. Aquecer a mistura até a dissolução. Distribuir em porções de 180 mL. Autoclavar durante 15 minutos a 121° C.

A cada porção de 180 mL a 50° C aproximadamente, adicionar assepticamente, 20 mL da solução de enriquecimento. Distribuir em porções de 20 mL em tubos de 25 mm x 200 mm ou similar com tampa de rosca.

A.3 – Meio de Kirchners

Fosfato dipotássico.....	1,5 g
Fosfato monopotássico.....	2,5 g
Sulfato de magnésio	0,6 g
Citrato de sódio	2,5 g
Asparagina	5,0 g
Ágar.....	1,0 g
Glicerol	20,0 mL
Água purificada.....	1000 mL

Aquecer a mistura do meio base até completa dissolução. Ajustar o pH a 7,2 a 25° C, com solução de NaOH a 1N. Distribuir em porções de 180 mL. Autoclavar por 15 minutos a 121° C.

A cada porção de 180 mL a 50° C aproximadamente, adicionar assepticamente 20 mL da solução de enriquecimento. Distribuir em porções de 20 mL em tubos de 25 mm x 200 mm ou similar com tampa de rosca.

A.4 – Ágar Middlebrook 7H9

Acrescentar 14,0 g de ágar ao caldo Middlebrook 7H9 (ver seção A.2). Proceder como descrito na seção A.2, distribuindo em porções de 10 mL em tubos de 20 mm x 160 mm ou similar com tampa de rosca. Inclinar após a autoclavação (121° C / 15 minutos).

A.5 – Ágar Mueller-Hinton

Extrato de carne.....	2,0 g
Caseína hidrolisada.....	15,5 g
Amido.....	1,5 g
Ágar.....	13 g
Água Purificada.....	1000 mL

Suspender os componentes da fórmula em água purificada e aquecer sob agitação até a completa dissolução do ágar. Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

pH final: 7.4 ± 0.2 a 25°C

A.6 – Ágar Löwenstein-Jensen

Composição do meio base

Fosfato de potássio monobásico.....	2,5 g
Sulfato de magnésio heptahidratado.....	0,24 g
Dicitrato de tri-magnésio 14-hidratado.....	0,6 g
L - asparagina.....	3,6 g
Farinha de batata.....	30,0 g
Verde malaquita.....	0,4 g
Água destilada.....	600 mL

Preparo da Base:

- a) pesar, em recipiente de aço inoxidável com capacidade para 5 litros, a quantidade recomendada pelo fabricante para preparar 3600 mL de meio;
- b) adicionar 72 mL de glicerol 87%;
- c) adicionar 3600 mL de água destilada e misturar utilizando bastão de vidro;
- d) verificar o pH que deve ser de 4,8 +/- 0,2;
- e) aquecer sob agitação até a dissolução completa dos ingredientes;
- f) interromper o aquecimento assim que for observada ebulição, não deixando que o meio ferva;
- g) transferir para erlenmeyer;
- h) autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Preparo da Suspensão de ovos:

- a) utilizar 12 dúzias de ovos não embrionados de tamanho médio, de casca lisa sem ranhuras;
- b) lavar bem os ovos com água e detergente neutro utilizando escova;
- c) enxaguar em água corrente;
- d) enxaguar em água destilada;
- e) dispor os ovos dentro de um recipiente limpo, forrado com gaze, podendo ser armazenado à temperatura de 2 – 8 °C por no máximo 24 horas;
- f) colocar os ovos lavados em recipiente contendo solução de álcool etílico a 70% durante 15 - 20 minutos;
- g) enxugar cada ovo com gaze;
- h) quebrar os ovos, colocar a clara e a gema em becher esterilizado;
- i) bater o conteúdo, utilizando uma batedeira manual, até que seja obtido aspecto homogêneo;
- j) transferir para recipiente de vidro esterilizado com capacidade para 12 litros.

Notas:

- a) o rendimento esperado é de aproximadamente 6 litros de suspensão;
- b) descartar ovos rachados e que flutuem durante imersão em água destilada conforme alínea d.

Preparo e distribuição do meio:

- a) misturar a base (A.1.3.1) a suspensão de ovos (A.1.3.2) e transferir para um recipiente de 12 L;
- b) misturar bem até que a suspensão adquira aspecto homogêneo;
- c) verificar o pH que deve ser de 7,0 +/- 0,2;
- d) filtrar a mistura em gaze estéril disposta em recipiente de aço inoxidável, também estéril, com capacidade para aproximadamente 18 litros possuindo, na parte inferior, uma abertura conectada a uma cânula de borracha;
- e) colocar o recipiente com a suspensão sob placa de agitação para a homogeneização permanente;
- f) transferir parte da suspensão para garrafa adaptável a dispensador automático regulado para 15 mL;
- g) distribuir automaticamente volumes de 15 mL da suspensão por tubo 25 x 200 mm provido de rolha de gaze, tendo-se o cuidado de verter o meio somente em um lado do tubo e evitando a formação de bolhas.

Coagulação do meio:

- a) ligar o coagulador e aguardar até a estabilização da temperatura de 85 +/- 1°C;
- b) dispor os tubos em 4 bandejas inclinadas do coagulador e prendê-los com fita adesiva tomando-se a precaução de manter a posição do envase e de permitir a circulação do ar no interior do equipamento;
- c) depois de colocar as bandejas, esperar a temperatura atingir 85 +/- 1°C, e coagular o meio durante 45 minutos a partir dessa temperatura;
- d) retirar os tubos das bandejas e colocá-los em caixas plásticas para armazenamento (A.1.5);
- e) repetir as etapas com todos os tubos envasados mantendo-se o início da coagulação sempre a 85 +/- 1°C durante 45 minutos.

A.7 – Middlebrook ADC Enrichment (100mL)

Cloreto de sódio.....	0,85 g
Albumina bovina fração V	5,0 g

Dextrose	2,0 g
Catalase (de carne).....	0,003 g

A.8 – Soro Fetal Bovino com Glicose

Solução de Glicose a 50%.....	4 mL
Soro Fetal Bovino.....	100 mL

Preparo da solução de glicose a 50%:

Glicose.....	50 g
Água Purificada.....	100 mL

Suspender a glicose em água purificada e aquecer levemente sob agitação até completa dissolução. Filtrar a solução em filtro de 0,22 μ m.

A.9 – Tampão Fosfato com glicerol a 15% pH 7,4

Na ₂ HPO ₄	13,3 g
KH ₂ PO ₄	3,5 g
Glicerol.....	300 mL
Água purificada.....	1700 mL

Suspender os componentes da fórmula em água purificada. Ajustar o pH a 7,4.
Autoclavar por 20 minutos a 121°C.