

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia

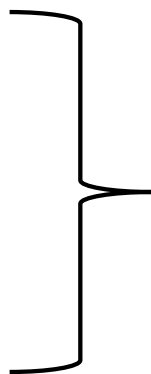


Gênero *Mycobacterium*

Profa Dra Ana Marcia de Sá Guimarães

Mycobacterium spp

- Filo *Actinobacteria*
- Classe *Actinobacteria*
- Ordem *Actinomycetales*
- Família *Mycobacteriaceae*
- Gênero *Mycobacterium*

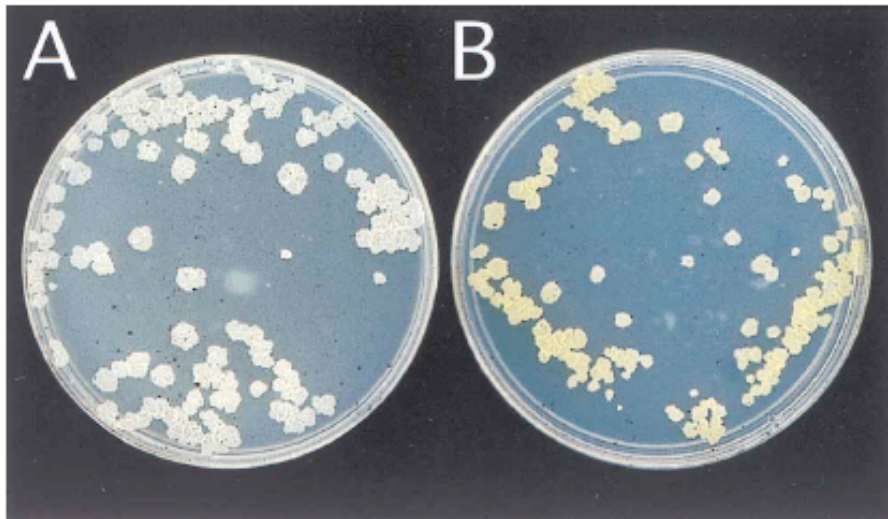


Taxonomia

- Bacilos álcool ácido resistentes (BAAR)
- Aeróbios ou anaeróbios facultativos, não móveis, catalase positivos
- Intracelulares facultativos
- **Não formadores de esporos – fazem dormência**
- **Saprófitos, oportunistas ou patógenos obrigatórios**

Mycobacterium spp

- Pigmentos amarelo-laranjados
 - Fotocromogênicos (luz): *M. kansasii*, *M. marinum*
 - Escotocromogênicos (pp na ausência de luz): *M. scrofulaceum*
 - Acromogênicos (pouco ou nenhum na ausência ou presença de luz): *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*.



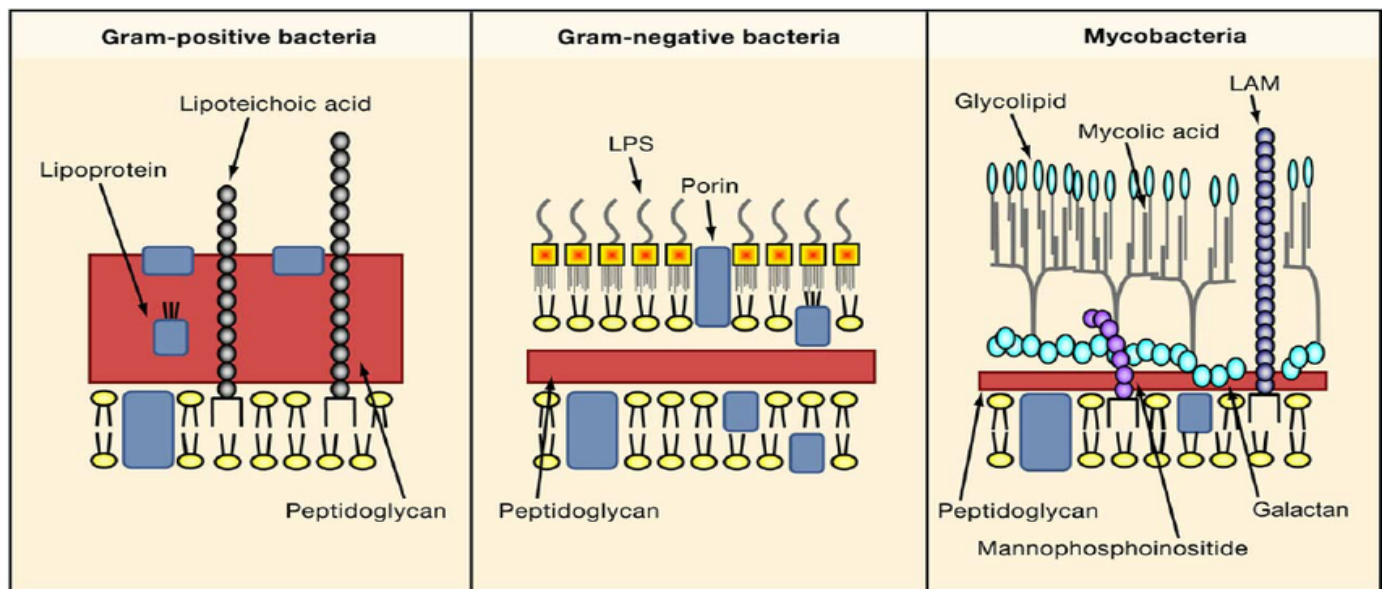
Mycobacterium marinum não exposto a luz vs exposto

Ramakrishnan et al., 1997.

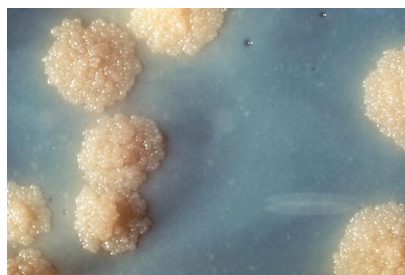
Mycobacterium spp

- Crescimento rápido
< 7 dias
Maioria das ambientais
- Crescimento lento
> 7 dias
Complexo *M. tuberculosis* (60-90 dias)
M. avium subsp. *paratuberculosis* (5 meses)

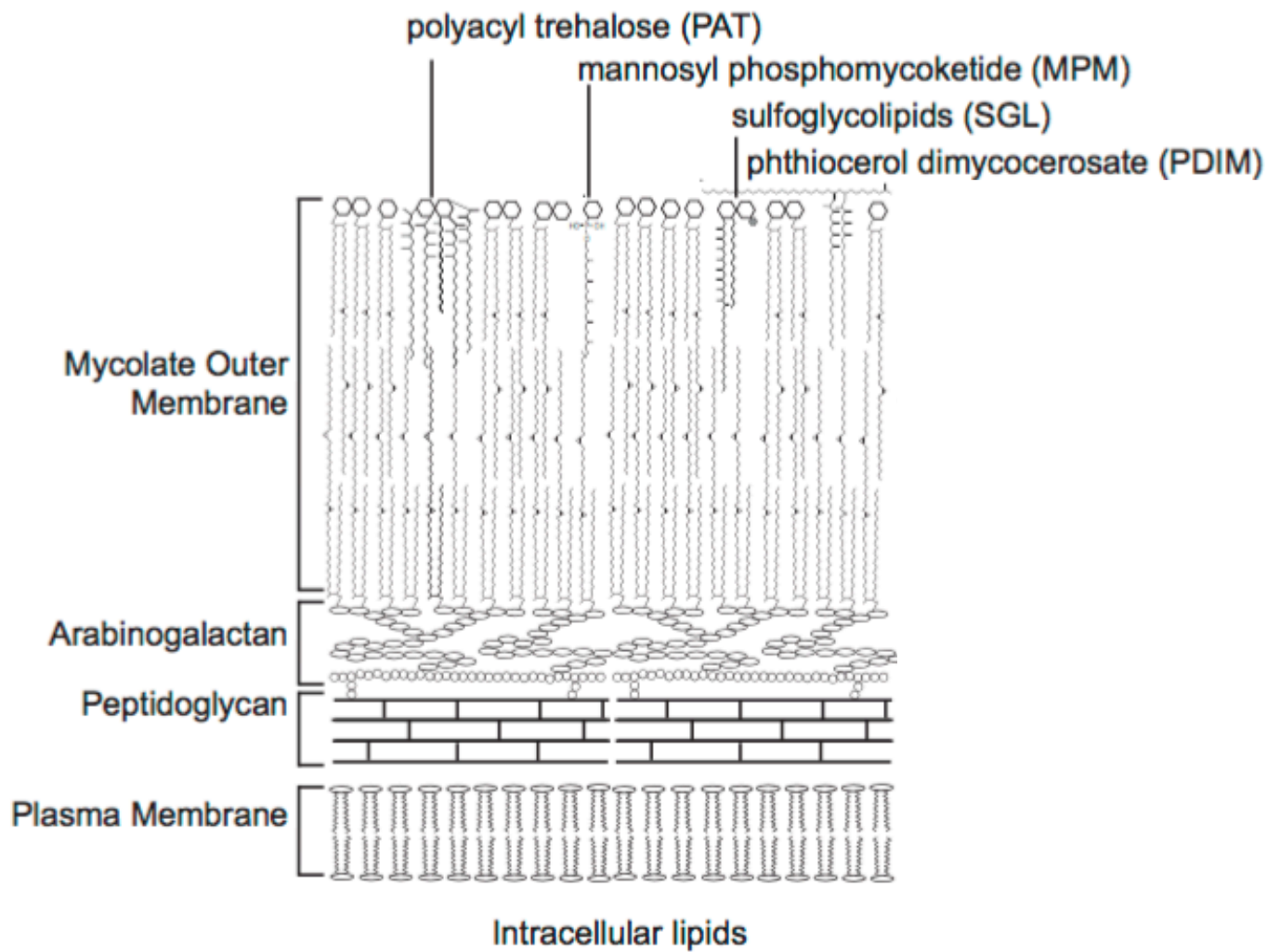
Bactéria	Tempo de replicação
<i>E. coli</i>	15-20 minutos
<i>M. tuberculosis</i>	300 minutos



- Lípidios complexos
 - Ácidos micólicos
 - Glicolípidios, ex. LAM (lipoarabinomanoose), PIM (fosfatidilinositol manose)
- Galactano (polissacarídeo de galactose)



Fonte: CDC/Dr. George Kubica e Lab de Zoonoses, FMVZ, USP



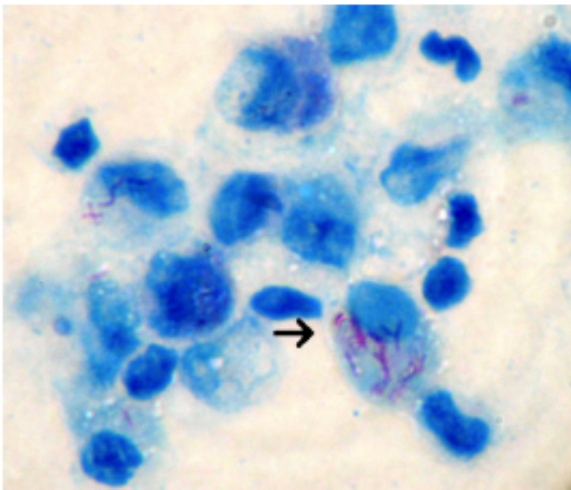
Mycobacterium spp.

Parede celular

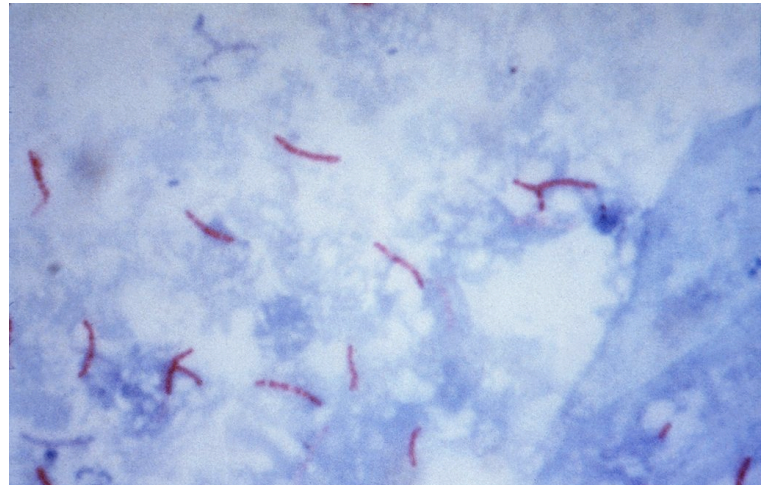
- Coloração de Ziehl Neelsen
Franz Ziehl
Friedrich Neelsen



Copyright:© Didier Ruef



Fonte: Dr Patricia Murakami et al., UFPR



Fonte: CDC/Dr. George Kubica

Ziehl- Neelsen Método

BAAR

1) Esfregaço fixado
(biossegurança)



1) Fucsina Fenicada



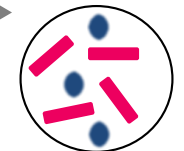
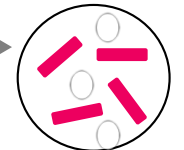
Fixar



1) Ácool-ácido 3%

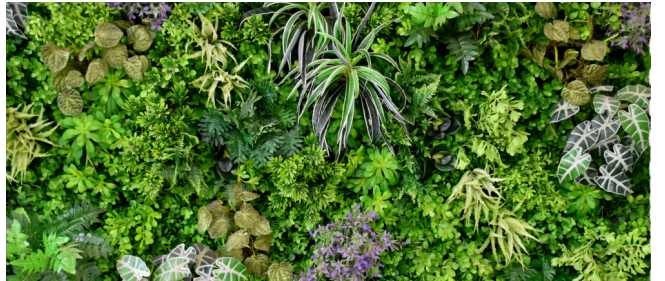
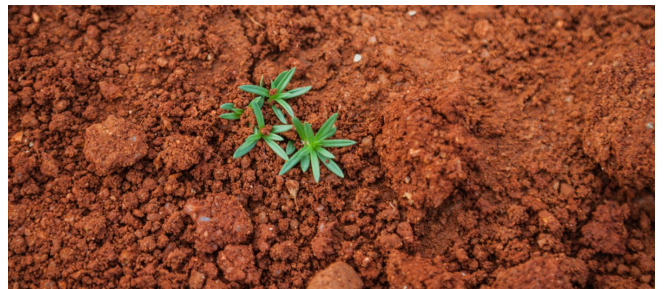


1) Azul de Metileno



Resistência no ambiente

Micobactérias ambientais



Resistência no ambiente

Patógenos obrigatórios

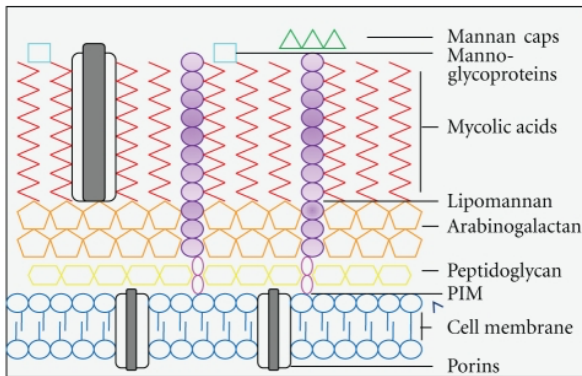
Nos animais e humanos

Exemplo: *M. bovis* sobrevive na água por até 400 dias e fezes por 2-5 meses



Podem também sobreviver no ambiente e servir como fonte de infecção

Resistência a métodos físicos e químicos



Resistente:

Dessecação
Extremos de pH
Diversos desinfetantes (ex. álcool 70%)

Sensível:

Pasteurização (72°C-75°C por 15-20 segundos)
Hipoclorito e desinfetantes fenólicos

Mycobacterium spp.

- > 60 espécies
- Maioria é ambiental (saprófita ou oportunista)
- Patógenos obrigatórios, zoonoses potenciais

Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC)

Mycobacterium leprae

Mycobacterium avium subsp *avium*

Mycobacterium avium subsp *paratuberculosis*

Mycobacterium ulcerans

Mycobacterium intracellulare

Mycobacterium marinum

Mycobacterium spp.

- > 60 espécies
- Maioria é ambiental (saprófita ou oportunista)
- Patógenos obrigatórios, zoonoses potenciais

Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC)

Mycobacterium leprae

Mycobacterium avium subsp *avium*

Mycobacterium avium subsp *paratuberculosis*

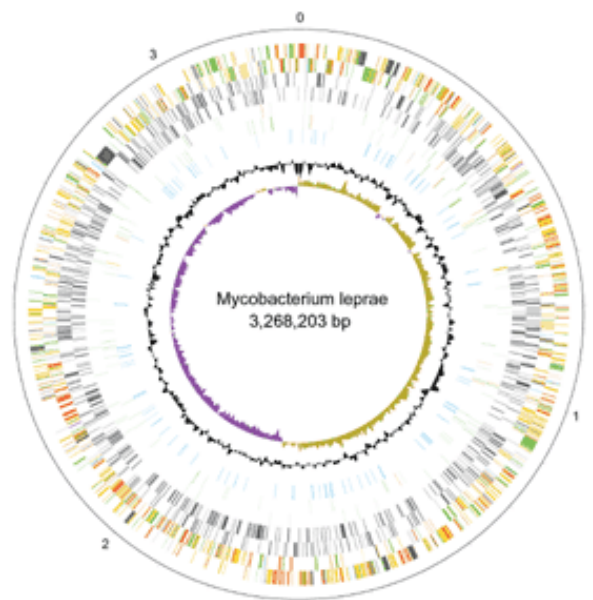
Mycobacterium ulcerans

Mycobacterium intracellulare

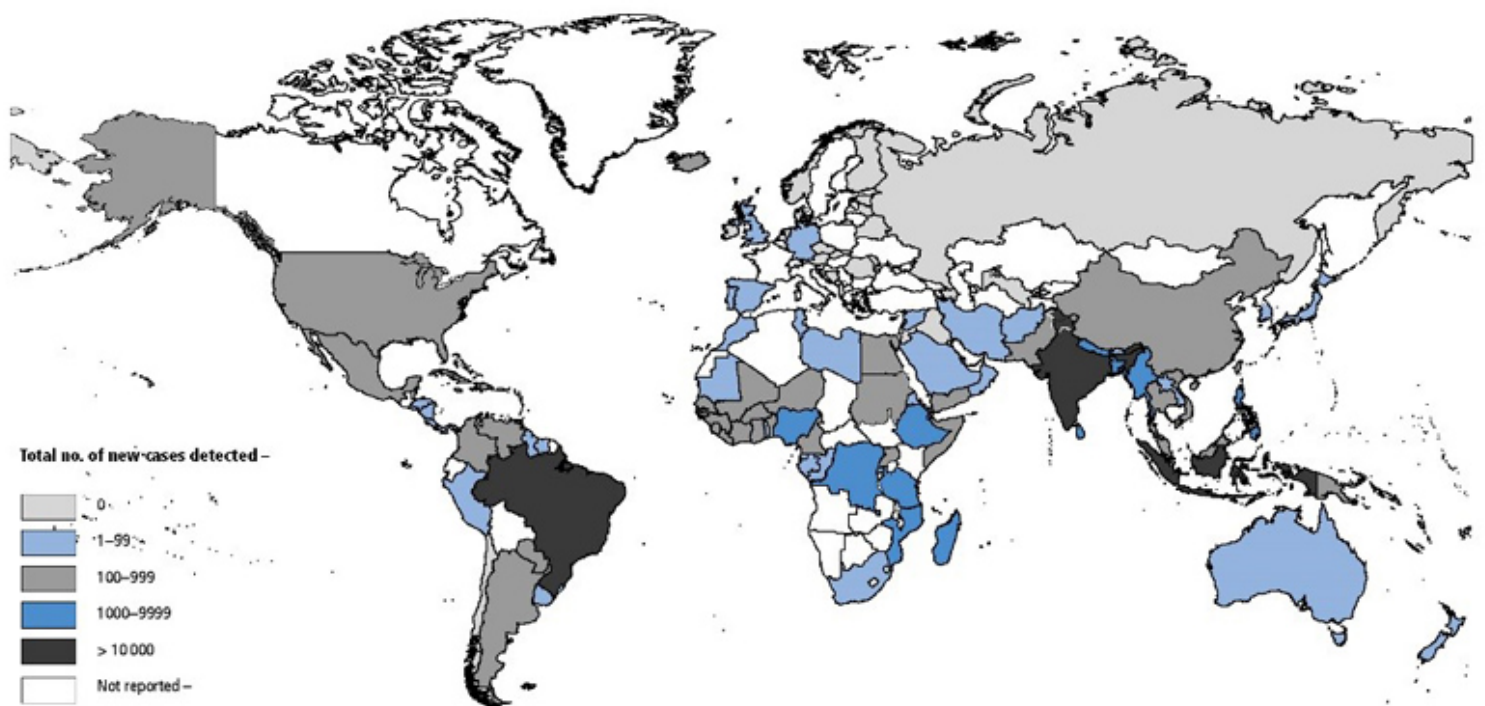
Mycobacterium marinum

Hanseníase

- *M. leprae*
 - Não cultivável
 - Transmissão: contato próximo prolongado (aerossol?)
 - Multiplicação lenta
 - Sintomas demoram
-
- Doença crônica dermatológica e neurológica: nervos, pele, olhos e mucosa nasal
 - Se não tratar - paralisia das mãos e pés, absorção óssea de dígitos, cegueira, deformidade facial.



Hanseníase



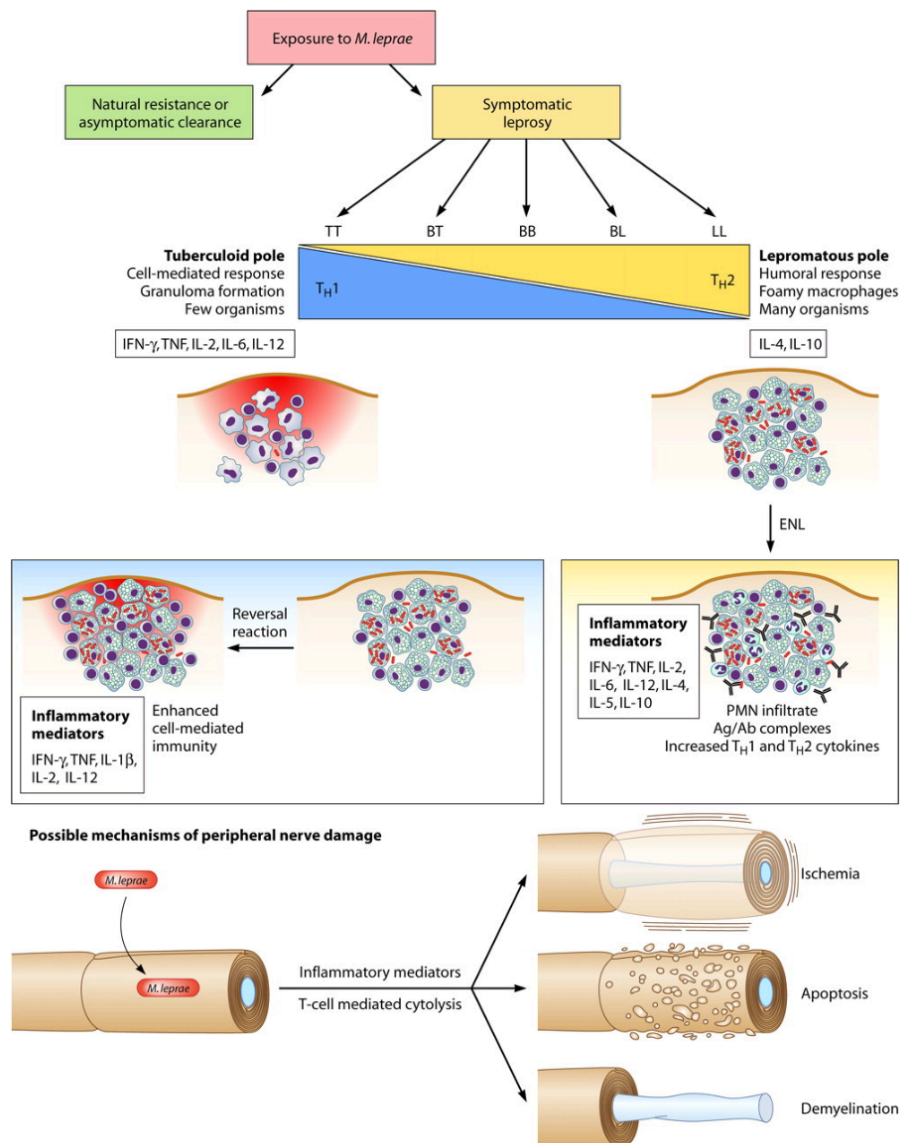
200 mil casos/ano

2 milhões de pessoas com sequelas no mundo

Índia: 127 mil casos (60% dos casos do mundo)

Brasil: 26 mil casos/ano (13% dos casos do mundo)

Manifestação, progressão, e prognóstico associado com sistema imune de cada paciente (fatores genéticos)



Misch et al., 2010.

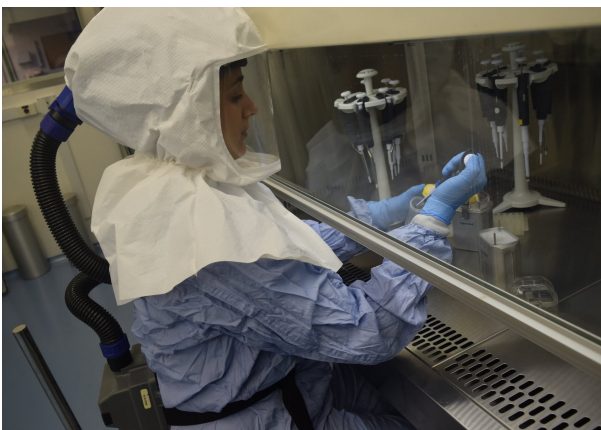
Hanseníase



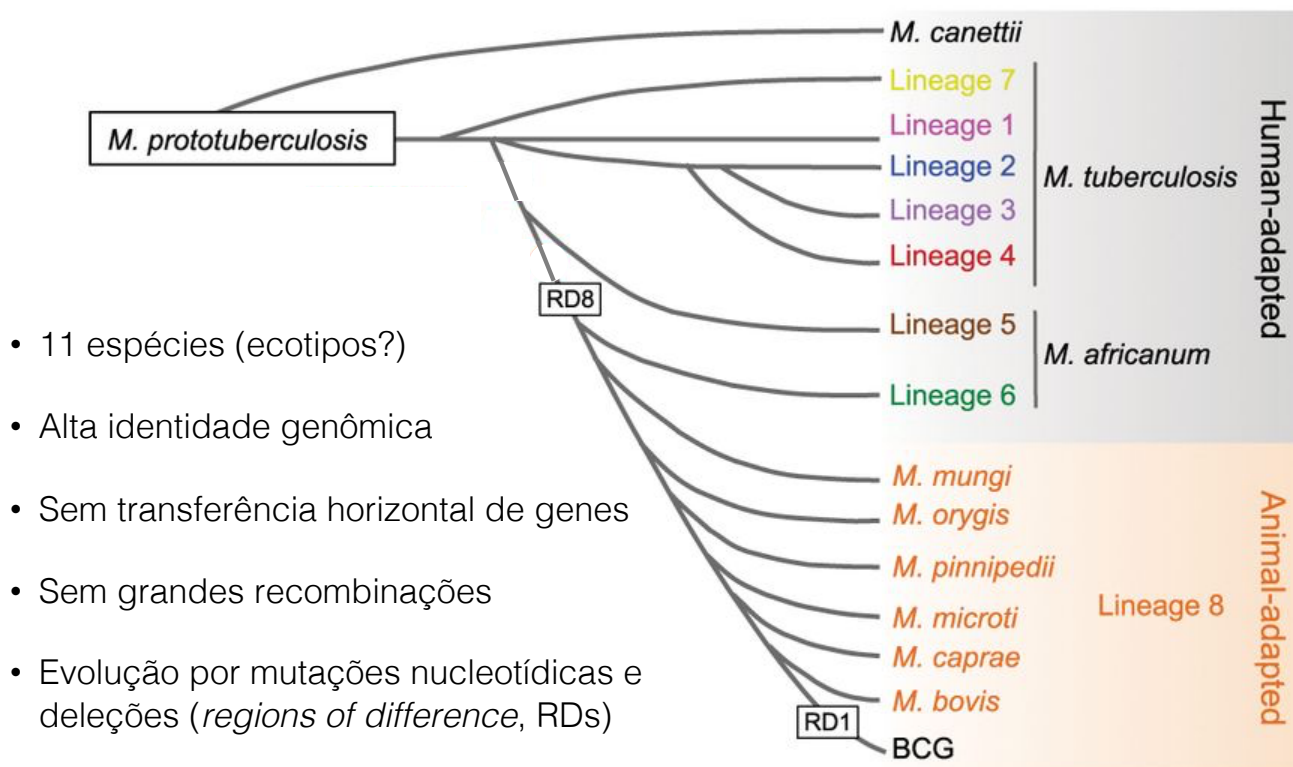
- Tratamento longo (6-12 meses)
- Dapsona, rifampicina, e clofazimina

Tuberculose

- Biossegurança de nível 3
- Transmissão via aerossol
- EPIs
- 2017 = 9,299 casos de trabalhadores da saúde com TB. China 35% e **Brasil 11%**.



MTC





M. tuberculosis



M. africanum



M. bovis



M. caprae



M. orygis



M. microti



M. pinnipedii



M. mungi



Dassie bacillus

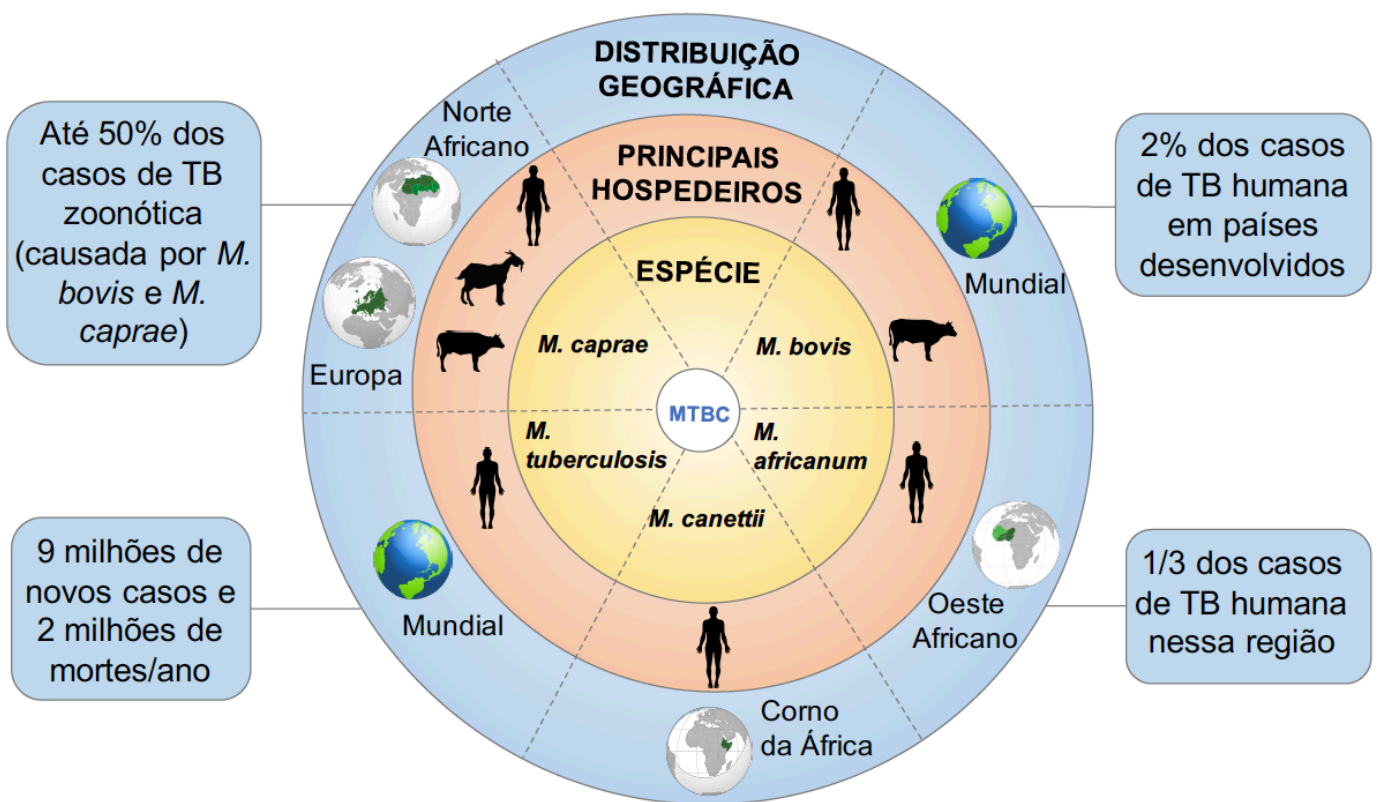
M. suricattae



Chimpanzee bacillus

M. canettii

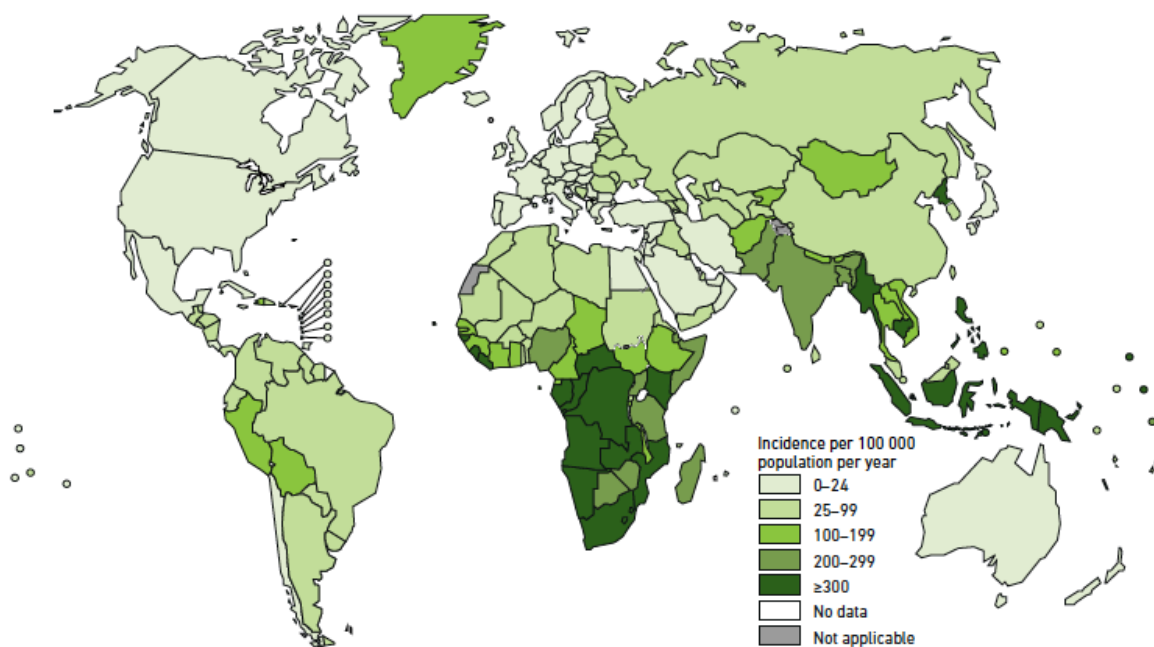






M. tuberculosis em humanos

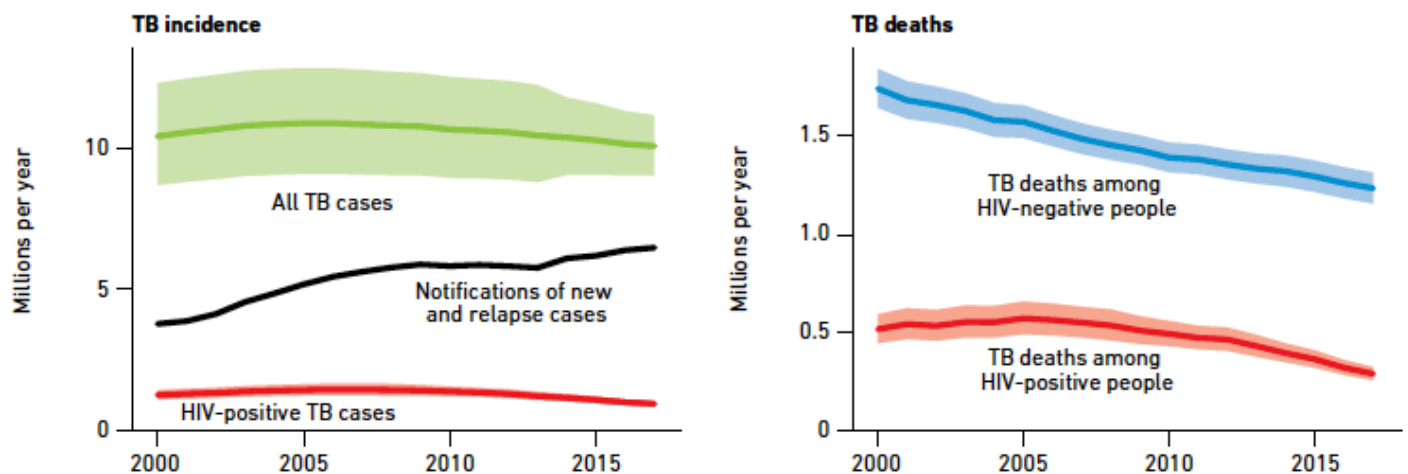
FIG. 3.4
Estimated TB incidence rates, 2017



M. tuberculosis em humanos

FIG. 3.6

Global trends in the estimated number of incident TB cases and the number of TB deaths (in millions), 2000–2017. Shaded areas represent uncertainty intervals.

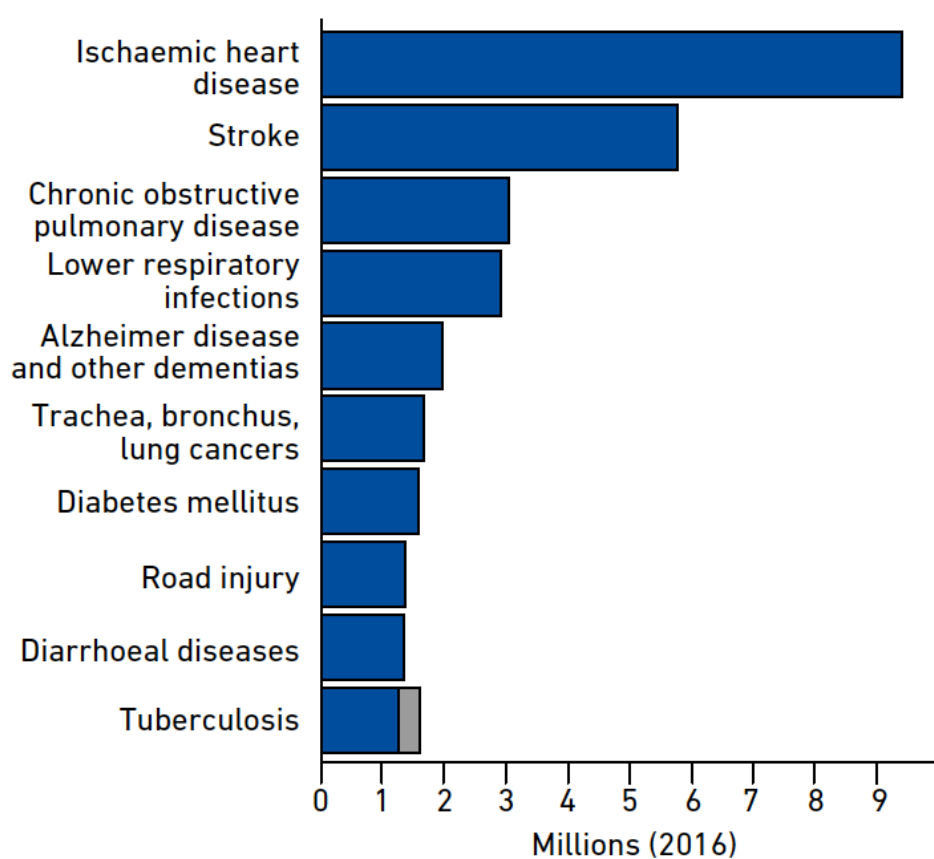


- Emergência de MDR (rifampicina e isoniazida) e XDR-TB (+ fluorquinolones, amikacina e/ou capreomicina and kanamycina)

FIG. 3.11

Top causes of death worldwide in 2016.^{a,b}

Deaths from TB among HIV-positive people are shown in grey.



M. tuberculosis em humanos

Brazil

ESTIMATES OF TB BURDEN, ^a 2017

	NUMBER (THOUSANDS)	RATE (PER 100 000 POPULATION)
Mortality (excludes HIV+TB)	5.1 (4.8–5.3)	2.4 (2.3–2.5)
Mortality (HIV+TB only)	1.9 (1.4–2.5)	0.91 (0.67–1.2)
Incidence (includes HIV+TB)	91 (78–105)	44 (37–50)
Incidence (HIV+TB only)	11 (9.3–13)	5.3 (4.5–6.3)
Incidence (MDR/RR-TB) ^b	2.4 (1.8–3.1)	1.2 (0.86–1.5)



M. tuberculosis

- Tuberculose humana
- Pode infectar animais, mas a doença não persiste na população

Animals	# of cases
Elefante asiático	66
Cães	12
<i>Macaca mulatta</i>	10
Pig-tailed Monkeys	10
Papagaio	5
Elefante africano	4
Bovino	3
Anta	2
Meerkat	1
<i>Callithrix jacchus</i>	1
Agoti	1

Adaptado de Ghodbane e Drancourt, 2013. Tuberculosis, 93:589.

Elefante asiático

Síndrome do definhamento crônico

Perda de peso, intolerância ao exercício, tosse ocasional. Normalmente subclínica até que fica muito avançado



M. bovis

- Tuberculose bovina e bubalina
- Tropismo mais amplo por hospedeiros

Bovidae

Cervideos e outros artiodactilas

Insectivora (moles, voles, hedgehogs)

Marsupiais

Mustelidae

Canidae

Suidae

Roedores

Lagomorfos

Rinocerontes

Primatas

Pinípedes

Felidae

Elefantes

Spillover versus Reservatório

M. bovis

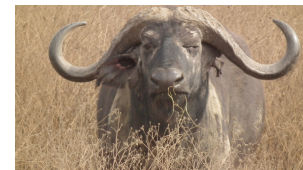
Texugo europeu no Reino Unido

Aerossol, fezes urina



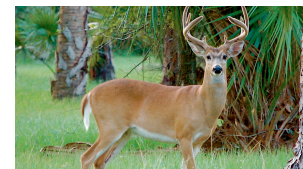
Búfalos - África do Sul

Kruger National Park – Veio de bovinos infectados



Cervídeos de cauda branca nos EUA

Michigan



Cusu-de-orelhas grandes na Nova Zelândia



Porco selvagem europeu - Península Ibérica



Tuberculose bovina

- Doença de notificação obrigatória (OIE)
- Programa Nacional de Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovina e Bubalina = vigilância ativa
- Maior prevalência = África, Ásia e parte das Américas.
- Focos podem persistir devido a reservatórios selvagens
- Brasil – Há casos todos os anos, prevalência considerada baixa ~1.3% do gado testado em 2009.
- Rebanhos leiteiros >>>>> corte

ZOONOTIC TUBERCULOSIS IS A MAJOR PUBLIC HEALTH THREAT



ACT NOW TO SAVE LIVES AND SECURE LIVELIHOODS



World Health
Organization



WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH
Protecting animals, preserving our future



Food and Agriculture
Organization of the
United Nations



International Union Against
Tuberculosis and Lung Disease
The Union

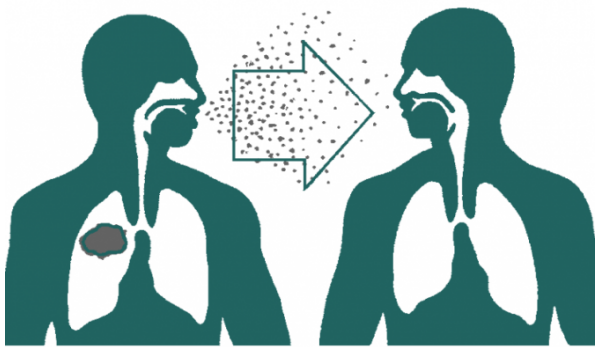
Outros fatos importantes

- Homens: mulheres (2:1)
- 90% dos casos em adultos (>15 anos)
- 86% dos casos são pulmonares
- 10% dos casos tem HIV
- 2/3 dos casos em 8 países: Índia (27%), China (9%), Indonésia (8%), Filipinas (6%) e Paquistão (5%), Nigéria (4%), Bangladesh (4%) e África do Sul (3%).
- 23% da população mundial tem TB latente (?)

Patogenia do MTC

- Eliminação varia com a espécie bacteriana e local da infecção:

M. tuberculosis



M. bovis

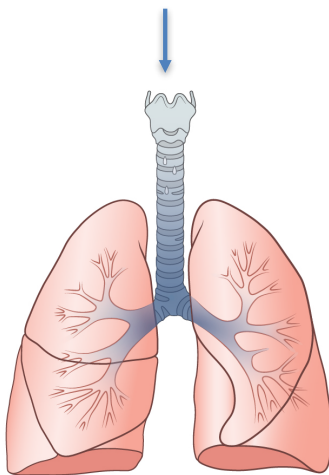


Tuberculose zoonótica (leite e carne)

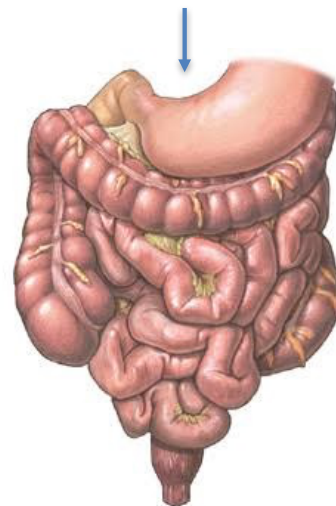
Patogenia do MTC

- Infecção depende da via de exposição, quantidade de micro-organismos e status imunológico do hospedeiro:

Aerossol (baixa dose)



Via oral (alta dose)



Bacilos atingem macrófagos alveolares e intersticiais

Patogenia do MTC

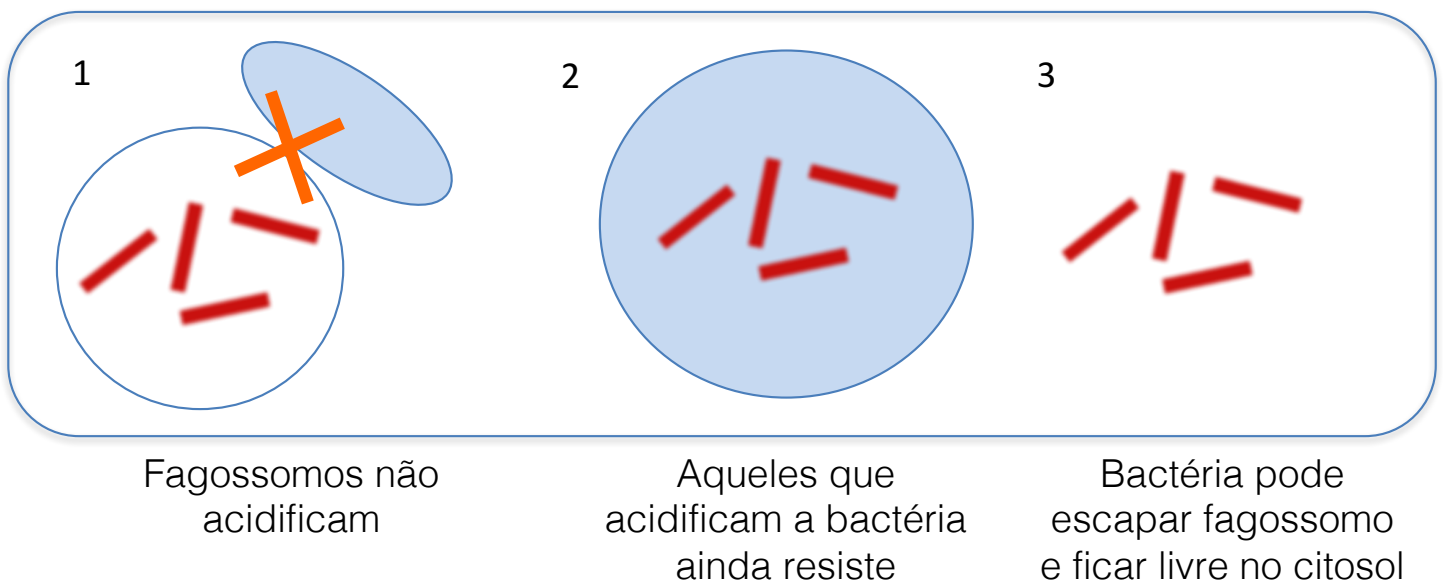
- Três possibilidades



Latência não é infeccioso – não transmissível

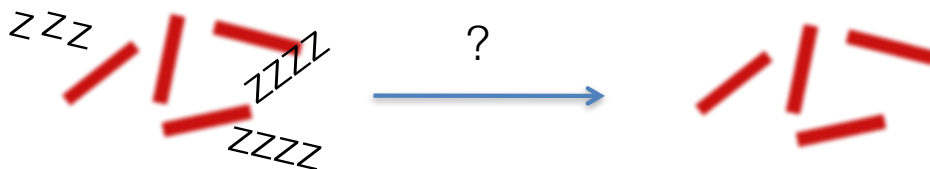
Mecanismos de virulência

- Macrófago
- Partícula estranha → fagocitose → fusão com lisossomos
- Inibição da fusão do lisossomo com fagossomo
- Micobactérias impedem fusão e resistem a ambientes ácidos

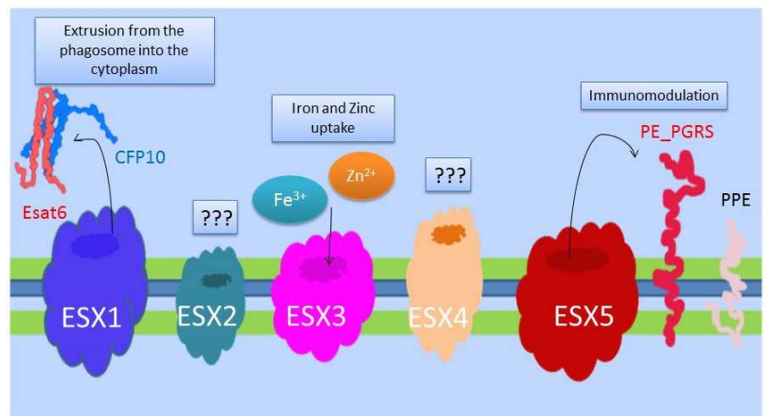
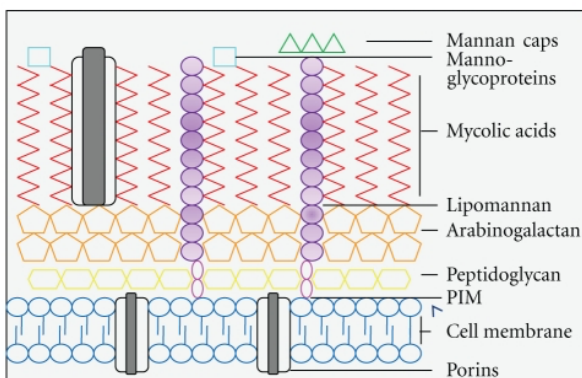


Mecanismos de virulência

- **NÃO FORMAM ESPOROS**. Entram em dormência
 - Diminui seu metabolismo
 - Pára de replicar. Associado a latência clínica.
- Gatilhos
 - Condições desfavoráveis no granuloma
 - Limitação de nutrientes e
 - Baixa tensão de oxigênio
- Em dormência – antibióticos não agem = tratamento prolongado contra TB em humanos.



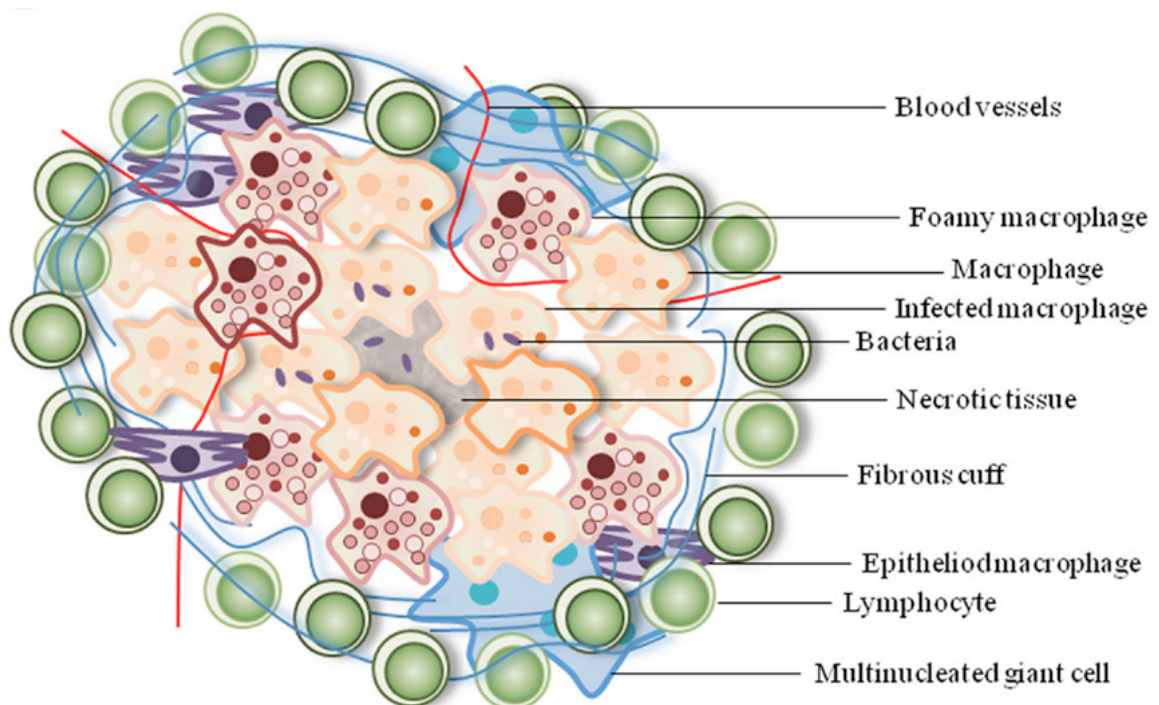
Mecanismos de virulência



- Resistência a estresse oxidativo
- Modulação da morte celular
- Etc.

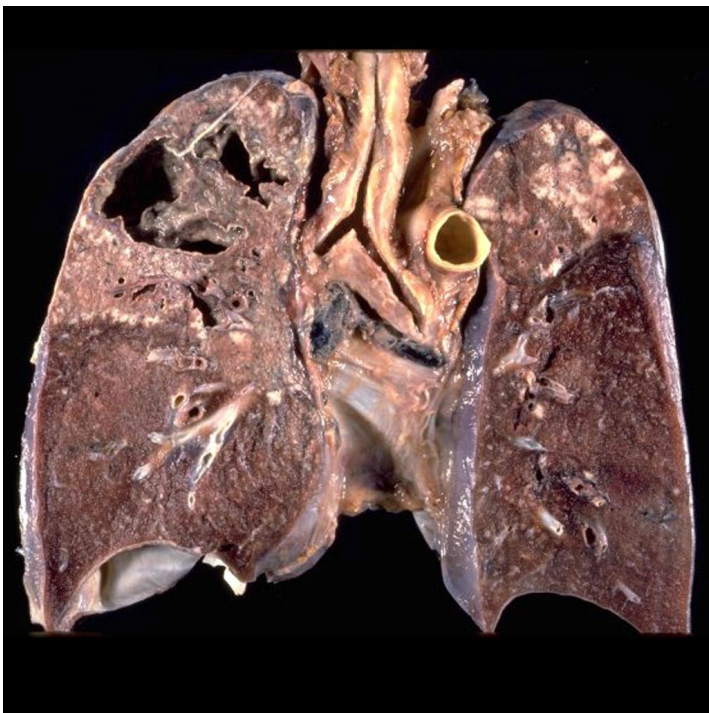
Como o hospedeiro se defende?

- Granuloma
- Uma fortaleza de células que pode eliminar o patógeno ou contê-lo

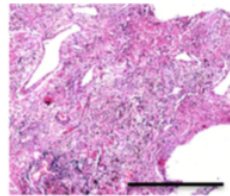


Guirado and Schlesinger, 2013. Front Immunol, 4:article 98.

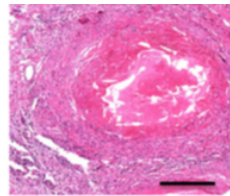
Granulomas em diferentes estágios



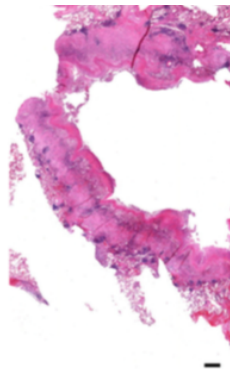
Granuloma Sólido



Granuloma Caseoso



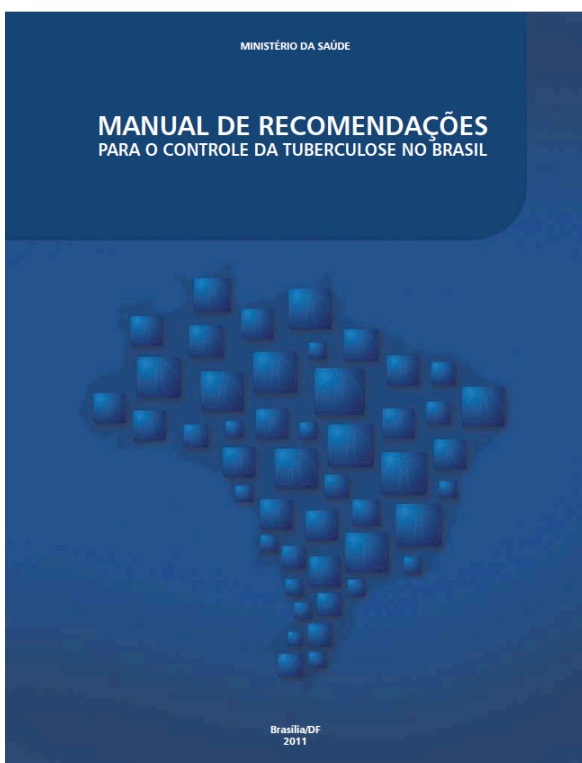
Granuloma Cavitário



→ Paciente
bacilífero

Sintomas

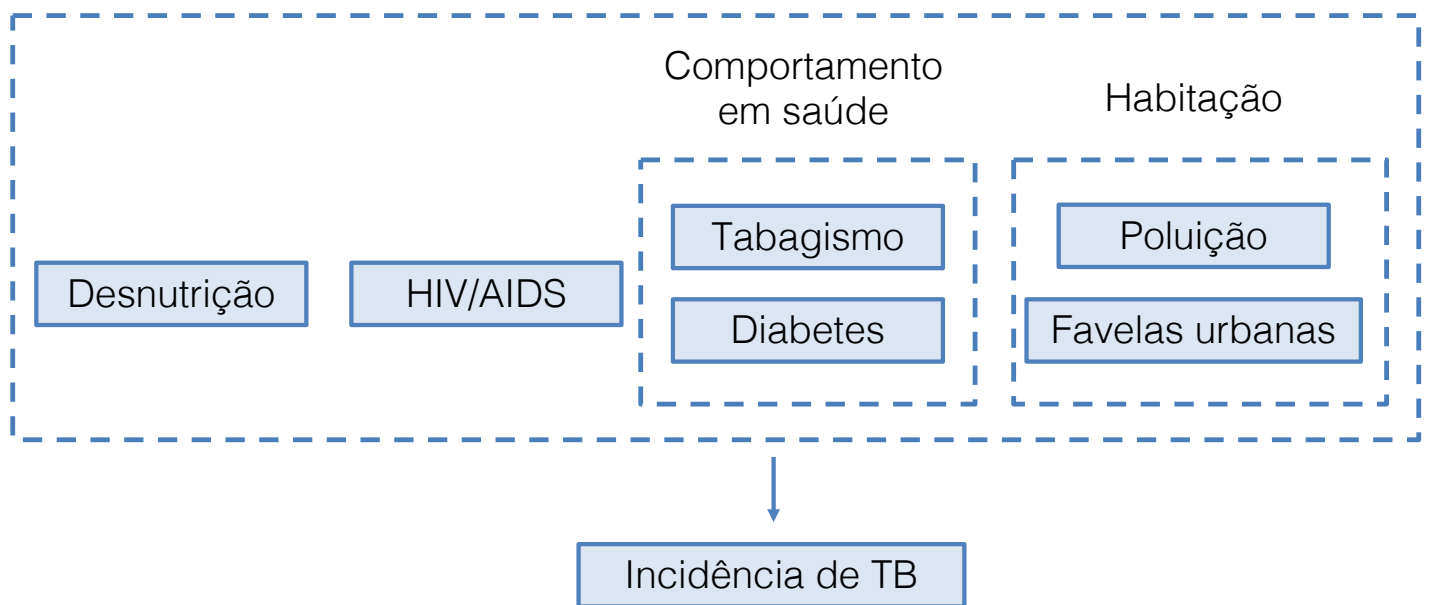
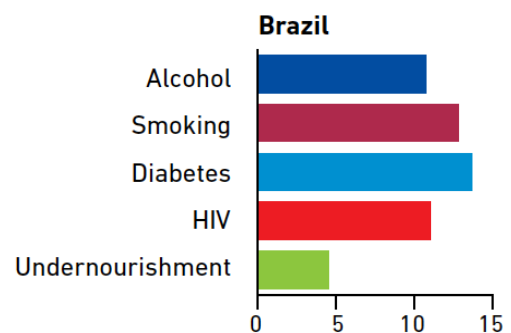
Common symptoms of Tuberculosis (TB)



Doenças extra-pulmonares terão sintomas associados ao tecido afetado.

Fatores de Risco

- HIV (20 x)
- Diabetes (2-4x)
- Desnutrição (3x)
- Alcoolismo (2-5x)
- Tabagismo (1.6-2x)



Testes diagnósticos

- Testes diretos

Coloração de Ziehl-Neelsen (histopatologia, secreções)

Isolamento

Deteção molecular (PCR)

- Testes Indiretos

Imunidade celular (Tuberculina)

Testes diretos

Teste do escarro

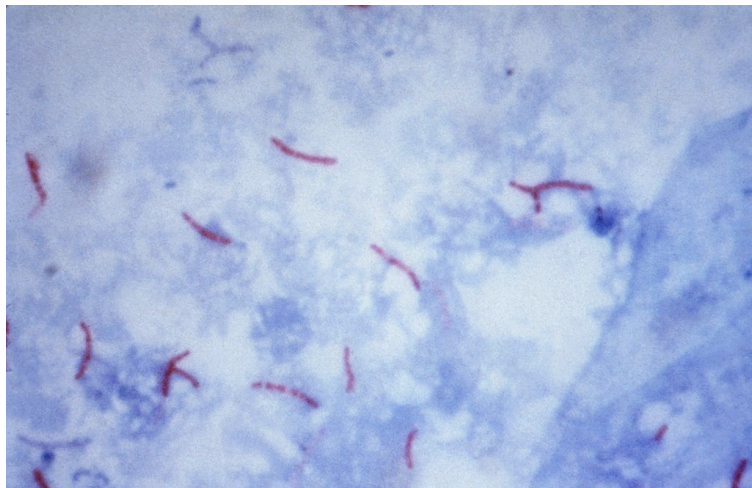
- Escarro coletado e processado em 24hs.

Processamento

- Descontaminação (2% NaOH)
- Liquefação do muco e debris orgânicos (N-acetil-L-cisteína – NALC + citrato de sódio)
- Neutraliza com PBS após 15-20 minutos

Teste do escarro

- Após processamento:
- Esfregaço e Ziehl Neelsen (baciloscopia direta)
- Cultivo (isolamento bacteriano)



Fonte: CDC/Dr. George Kubica

Baciloscopia direta

- Sensibilidade de 60 a 80%.
- 1.000 a 10.000 CFU/mL é necessário.
- Especificidade – não diferencia MTC
- Fazer coletas seriadas (até 3)
- Recomendado para:

- Sintomáticos respiratórios
- Suspeita clínica e/ou radiológica
- TB extrapulmonar

Isolamento

1) BACTEC MGIT 960 system (7H9-OADC)

2) Löwestein-Jensen

A base de ovos, asparagina, amido de batata, glicerol, com verde de malaquita (inibe gram +) e polimixina B (inibe gram -)

3) Stonebrink: *M. bovis*

Igual LJ mas não tem glicerol. Piruvato de sódio é adicionado

MGIT = Mycobacterial Growth Indicator Tubes –
indicador fluorescente ligado ao oxigênio –
crescimento consome oxigênio



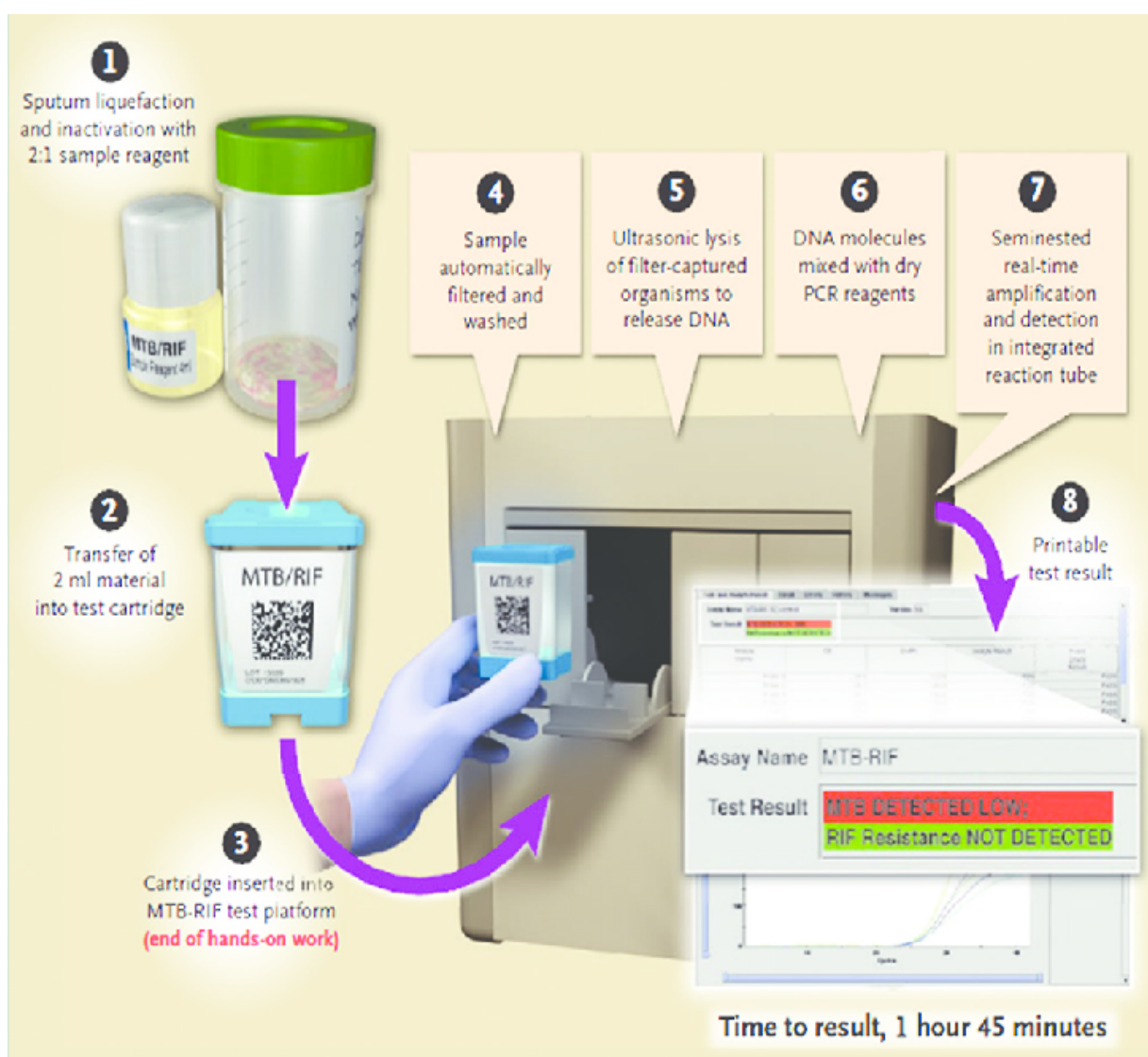
- Crescimento lento
- Sensibilidade moderada (50-80%)
- Importante para determinação de perfil de resistência, mas pouco útil para diagnóstico rápido



Testes moleculares

- 1) Real-time PCR
- 2) GeneXpert MTB/RIF





Testes indiretos

Testes Indiretos

- TB latente
 - Para contactantes, pessoas com HIV, imigrantes, trabalhadores da saúde.
1. Teste de Sensibilidade Intradérmica PPD
 2. Quantiferon TB Gold (IGRA – interferon gamma release assay)

Testes Indiretos

- Imunidade celular
- Estímulo com antígenos geram liberação de IFN-gamma por linfócitos Th1.
 - Na TST – gera inflamação
 - No IGRA – mede-se IFN-gamma

Stages of a Type IV Hypersensitivity Reaction

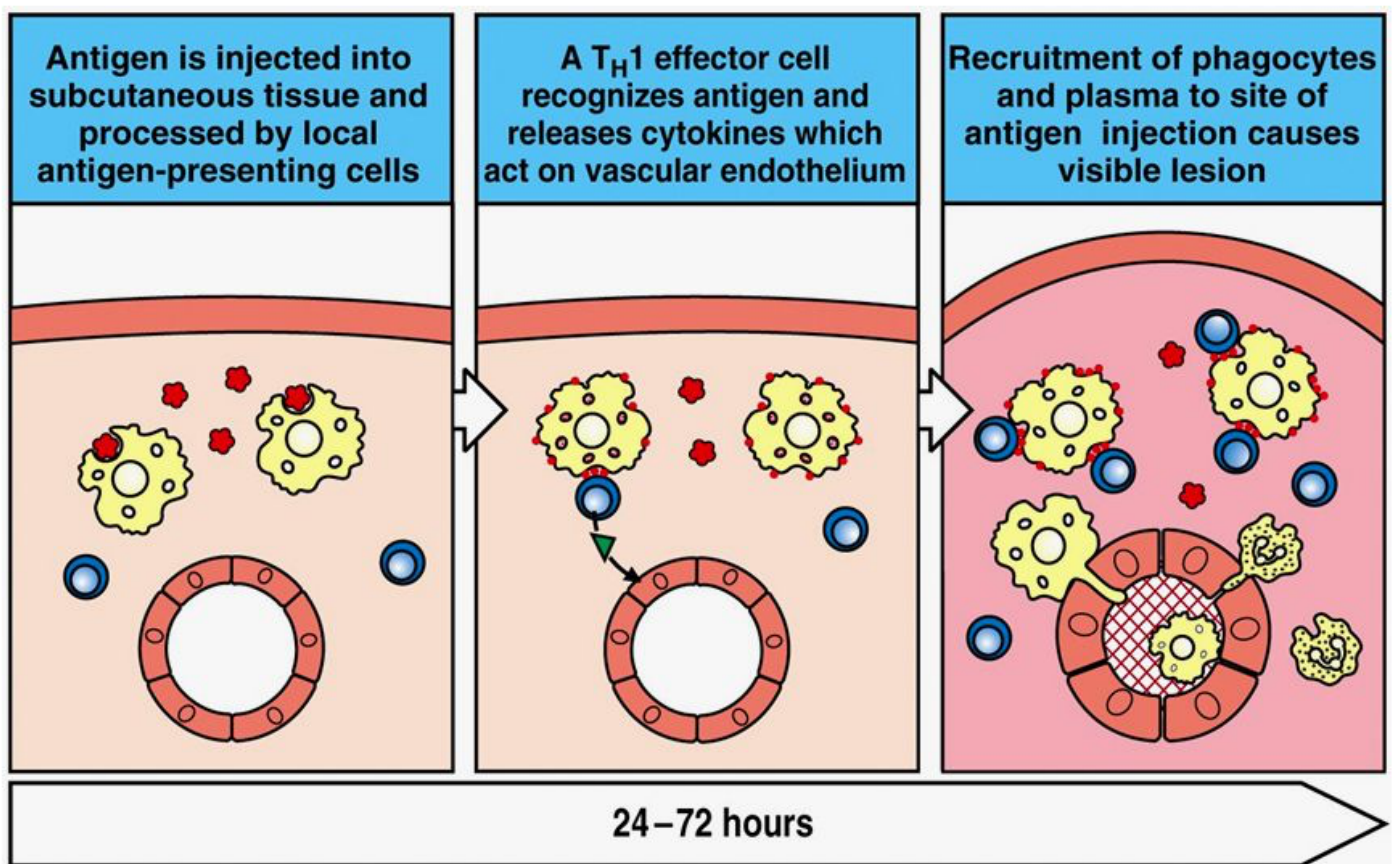
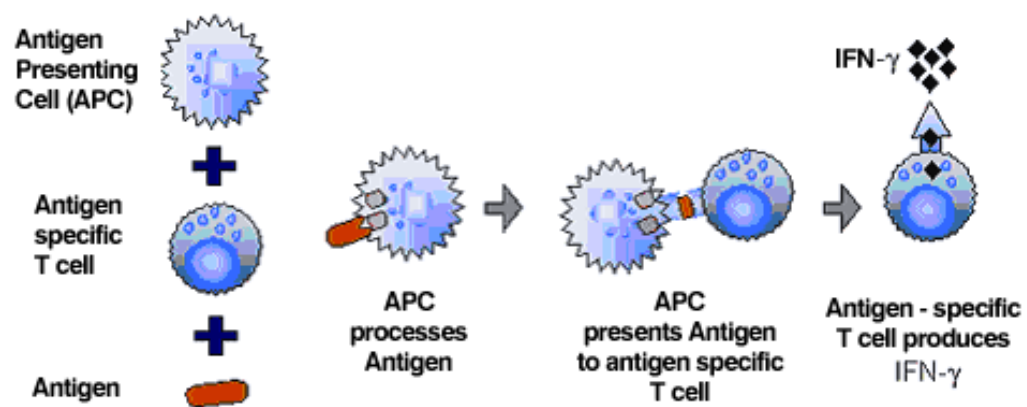
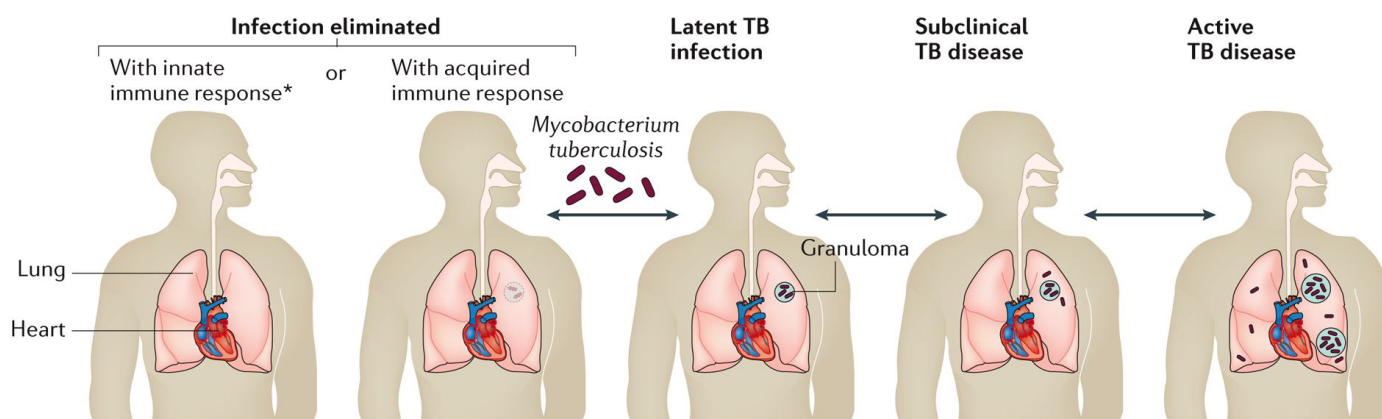


Figure 12-25 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)



IGRA Test for TB





TST	Negative	Positive	Positive	Positive	Usually positive
IGRA	Negative	Positive	Positive	Positive	Usually positive
Culture	Negative	Negative	Negative	Intermittently positive	Positive
Sputum smear	Negative	Negative	Negative	Usually negative	Positive or negative
Infectious	No	No	No	Sporadically	Yes
Symptoms	None	None	None	Mild or none	Mild to severe
Preferred treatment	None	None	Preventive therapy	Multidrug therapy	Multidrug therapy

Resistência e Tratamento

- Drogas de primeira linha:

Rifampicina (R), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z), Etambutol (E).

- Drogas de segunda linha:

Etionamida, fluorquinolonas (levofloxacina, moxifloxacina), cicloserina, linezolida, clofazimina, PAS.

Drogas injetáveis de segunda linha:
aminoglicosídeos (amikacina, capreomicina, kanamicina, estreptomicina)

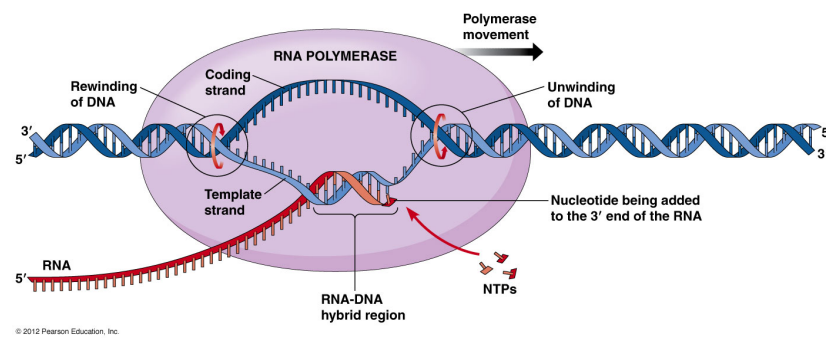
Resistência e Tratamento

Rifampicina

Bactericida

RNApol

Mutações em *rpoB*
(subun. beta RNApol)



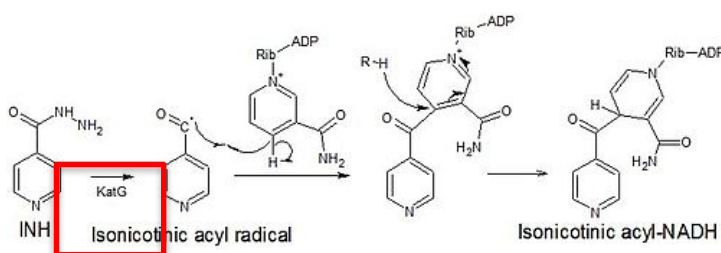
Resistência e Tratamento

Isoniazida

Bactericida

Síntese
ácidos
micólicos

22 mutações descritas.
(*inhA*, *katG*)



A droga ativada se liga a enoil-ACP (proteína carreadora de acil) redutase (**InhA**), bloqueando da síntese de ácido graxo – síntese de ácidos micólicos.

Resistência e Tratamento

Pirazinamida

Convertido em ácido
propiônico pela
pirazinamidase

Mutações em
pncA
(pirazinamidase)

Bactericida para
bactérias não
replicativas

Diminui pH
citoplasmático

Resistência e Tratamento

Etambutol

Bacteriostático

Impede a síntese de arabinogalactano por inibir a enzima arabinosil-transferase

Mutações no operon *embCAB* (arabinosil-transferases)

Aumenta permeabilidade da parede celular

Resistência e Tratamento

- Rifampicina resistente
- MDR = rifampicina e isoniazida
- XDR-TB = rifampicina e isoniazida + qualquer uma das fluorquinolonas e pelo menos uma das drogas injetáveis

Cases	Detection	
600 000	153 000	3.5% dos novos casos e 18% dos reincidentes são MDR
new cases of MDR/RR-TB estimated in 2016	patients with MDR/RR-TB detected and reported in 2016	

Resistência no Brasil

DRUG-RESISTANT TB CARE, 2017

	NEW CASES	PREVIOUSLY TREATED CASES	TOTAL NUMBER ^c
Estimated MDR/RR-TB cases among notified pulmonary TB cases			2 000 (1 600–2 400)
Estimated % of TB cases with MDR/RR-TB	1.5% (1.1–2)	8% (6–10)	
% notified tested for rifampicin resistance	30%	39%	27 716
MDR/RR-TB cases tested for resistance to second-line drugs			173
Laboratory-confirmed cases		MDR/RR-TB: 1 110, XDR-TB: 16	
Patients started on treatment ^d		MDR/RR-TB: 964, XDR-TB: 16	

Tratamento

- Bedaquilina (inibe ATPase), Delamanid (inibe a síntese de ácidos micólicos)



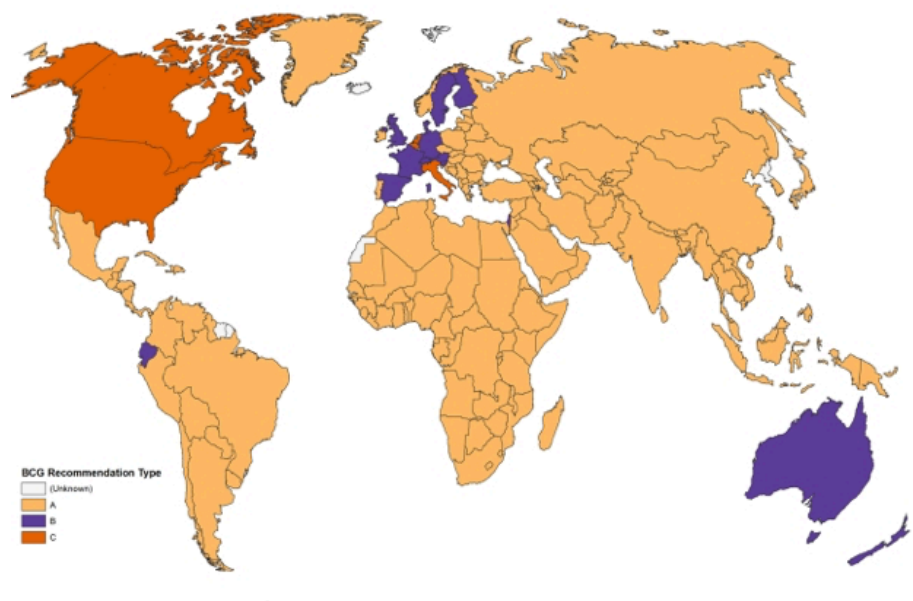
Tratamento

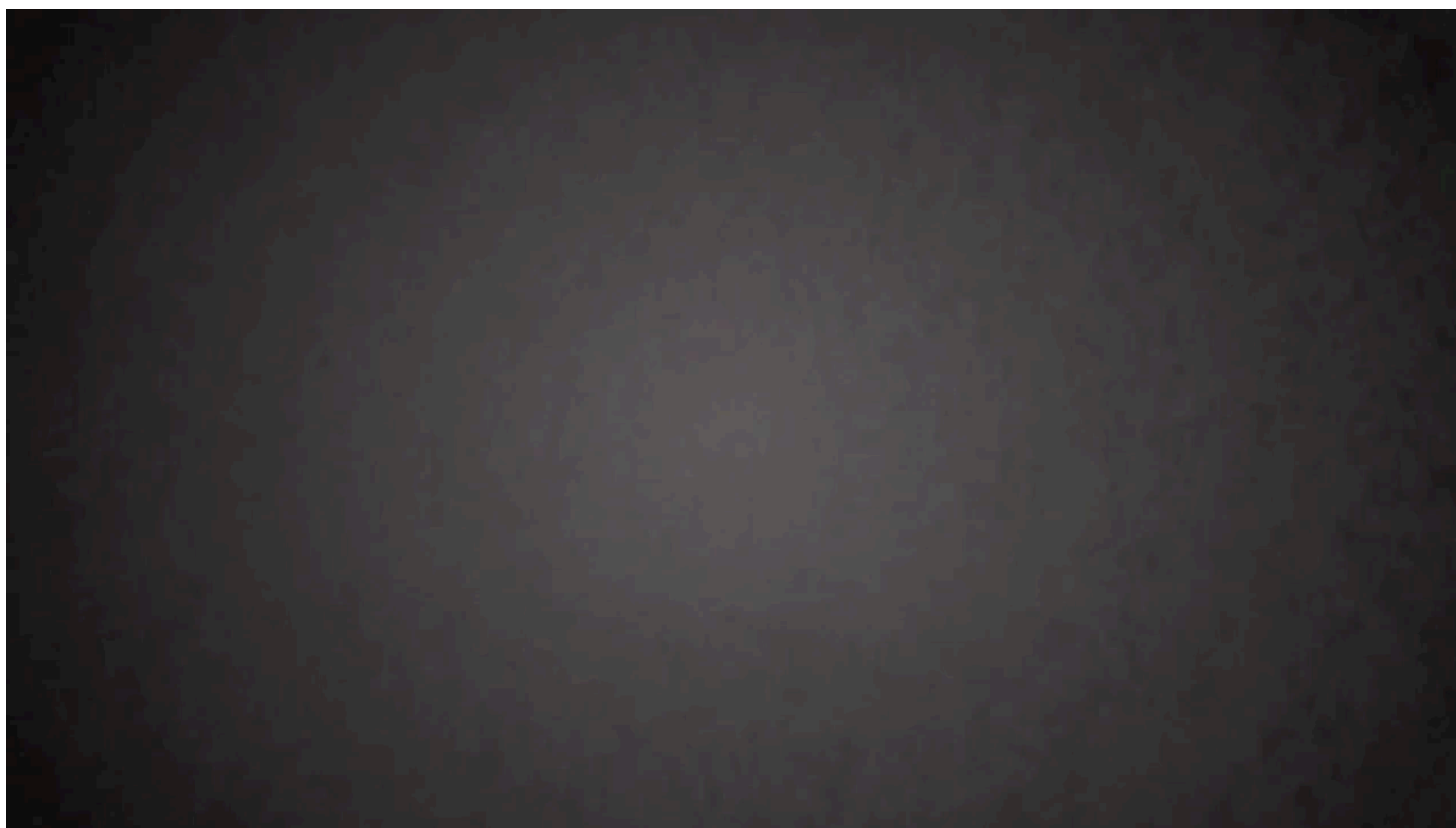
Quadro 6 - Esquema básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes

Regime	Fármacos	Faixa de peso	Unidade/dose	Meses
2 RHZE Fase Intensiva	RHZE 150/75/400/275 comprimido em dose fixa combinada	20kg a 35kg	2 comprimidos	2
		36kg a 50kg	3 comprimidos	
		> 50kg	4 comprimidos	
4 RH Fase de manutenção	RH Comprimido ou cápsula de 300/200 ou de 150/100 ou comprimidos de 150/75*	20 a 35kg	1 comprimido ou cápsula de 300/200mg ou 2 comprimidos de 150/75*	4
		36kg a 50kg	1 comprimido ou cápsula de 300/200mg + 1 comprimido ou cápsula de 150/100mg ou 3 comprimidos de 150/75*	
		> 50kg	2 comprimidos ou cápsulas de 300/200mg ou 4 comprimidos de 150/75*	

Vacina

- BCG (Bacilo de Calmette-Guérin)
- Formas severas da TB em crianças





Dúvidas

anamarcia@usp.br