

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

Aline da Silva Soares Souto

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Mycobacterium massiliense* ISOLADOS
DE SURTO EPIDÊMICO DE INFECÇÕES DE SÍTIO CIRÚRGICO EM HOSPITAIS
DO RIO DE JANEIRO FRENTE A DESINFETANTES**

Rio de Janeiro

2011

Aline da Silva Soares Souto

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Mycobacterium massiliense* ISOLADOS
DE SURTO EPIDÊMICO DE INFECÇÕES DE SÍTIO CIRÚRGICO EM HOSPITAIS
DO RIO DE JANEIRO FRENTE A 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

Souto, Aline da Silva Soares

Avaliação da suscetibilidade de *Mycobacterium massiliense* isolados de surto epidêmico de infecções de sítio cirúrgico em hospitais do Rio de Janeiro frente a desinfetantes/ Aline da Silva Soares Souto. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011

88f. : il, tab

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

Orientadoras: Maria Helena S. Villas Bôas, Rafael Silva Duarte e Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki (*in memoriam*)

1. Micobactérias de crescimento rápido. 2. Desinfecção de alto nível 3. Resistência a biocidas 4. *Mycobacterium massiliense*

Aline da Silva Soares Souto

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Mycobacterium massiliense* ISOLADOS
DE SURTO EPIDÊMICO DE INFECÇÕES DE SÍTIO CIRÚRGICO EM HOSPITAIS
DO RIO DE JANEIRO FRENTE A 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 memoriam*)

Aprovado em ____/____/____

Manuela da Silva (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ana Luisa de Mattos-Guaraldi (Doutor)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes (Doutor)
Fundação Oswaldo Cruz

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rafael Silva Duarte (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

À minha querida orientadora
Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki
in memoriam, saudade imensa.

AGRADECIMENTOS

Durante esta caminhada, muitas pessoas contribuíram para o meu crescimento profissional e para realização de um sonho.

Meu agradecimento inicial não poderia deixar de ser para alguém que sempre me incentivou e apoiou, mas que partiu deixando muitas saudades. À Dr^a. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki *in memoriam*, por todo carinho, amizade e dedicação. Você faz muita falta. Obrigada por ter feito parte da minha história!

À minha querida orientadora Dr^a. Maria Helena Simões Villas Bôas, por quem tenho imensa admiração e carinho. Agradeço pela amizade e por assumir a orientação deste trabalho em um momento tão difícil. Seu companheirismo e dedicação foram essenciais para a elaboração desta dissertação.

Ao meu orientador Dr. Rafael Silva Duarte, que sempre esteve solícito a ajudar no que fosse necessário, transmitindo conhecimentos técnicos imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Bruna Sabagh, pela verdadeira e valiosa amizade e por estar sempre presente na minha vida pessoal e profissional. Agradeço muito por todo o companheirismo na parte prática deste estudo. Você é muito importante pra mim!

À minha grande amiga Alessandra Abreu, por ser tão presente na minha vida, por sempre me incentivar a seguir em frente e por ter me ajudado tanto na realização desse sonho.

A todos os amigos do Setor de Saneantes, pelo carinho e ajuda em variados momentos. E pelas risadas e conversas que sempre animaram o laboratório, tornando o trabalho mais prazeroso.

Aos funcionários da Central de Esterilização e do Setor de Meio de Cultura, pela disponibilidade e prontidão sempre que solicitados, em especial à Cátia Cristina cuja disponibilidade e dedicação se tornaram fundamentais para a execução da parte prática do projeto. Agradeço por ter se tornado uma grande amiga.

Ao Mario Farias, pelo carinho e preocupação com a finalização deste trabalho, sempre me auxiliando no que fosse necessário.

Aos meus amigos Carlos, Fábio, Igor, Raquel e Simone que, mesmo indiretamente, contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida, por todo o carinho, pela torcida e por estarem sempre presentes.

Aos amigos do Setor de Saneantes e Cosméticos do Departamento de Química do INCQS, que realizaram a análise do teor dos produtos utilizados neste trabalho.

Ao Rodrigo Rollin, pela amizade e pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, sempre prestativos e educados.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida a mim durante todo o período de estudo.

Aos meus pais, por todo o amor e carinho transmitidos e pela torcida sempre favorável ao meu crescimento pessoal e profissional. Amo demais vocês!

Aos meus queridos irmãos que tanto amo, pelos momentos de descontração imprescindíveis para tornar o trabalho menos árduo.

Por fim, o agradecimento mais importante, a Deus, por permitir que eu chegasse ao final desta etapa.

RESUMO

Os surtos de infecções por micobactérias de crescimento rápido (MCR) após procedimentos médicos invasivos, ocorridos em diferentes estados do país, resultaram no surgimento de inúmeros questionamentos em relação às características dos micro-organismos envolvidos, aos procedimentos empregados na desinfecção de equipamentos e principalmente na eficácia dos produtos utilizados nesses procedimentos, até então considerados seguros para essa aplicação. *Mycobacterium massiliense*, entre outras MCRs, tem sido isolada como agente etiológico de infecções localizadas e sistêmicas, e um único clone (BRA100) se mostra prevalente em todo o país. A não evidência de transmissão de MCR através do contato entre pessoas tem levado a proposição de que a infecção possa ocorrer a partir de fontes ambientais, reforçando a suspeita de desinfecção inadequada dos artigos médicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade de MCR pelo Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes da *Association of Official Analytical Chemists*, frente aos desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído. Foram avaliadas 5 cepas clínicas de *M. massiliense* pertencentes ao clone BRA100, juntamente com as cepas de referência *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841 e *M. massiliense* INCQS 00594. Para os produtos à base de glutaraldeído, observou-se que nenhum deles foi eficaz para *M. bovis* BCG Moreau, que é a única cepa de referência preconizada pela AOAC nos ensaios de verificação da eficácia deste tipo de produto. *M. chelonae* foi destruído pelos três desinfetantes testados, enquanto *M. fortuitum* apenas por dois desses. Os três desinfetantes foram ineficazes frente à *M. abscessus* e *M. massiliense*. Os desinfetantes à base de ácido peracético demonstraram eficácia para todas as micobactérias empregadas (nenhum crescimento), embora as cepas de *M. massiliense* tenham demonstrado uma suscetibilidade reduzida ao Ácido peracético B. O produto à base de ortoftalaldeído foi eficaz frente a *M. bovis* BCG Moreau e *M. chelonae*. Todas as outras micobactérias estudadas foram tolerantes a esse desinfetante. A alta tolerância das cepas de *M. massiliense* ao glutaraldeído foi um fator determinante para a recente inclusão da cepa, referente a essa espécie bacteriana, como obrigatória nos ensaios da avaliação da atividade micobactericida para comprovação da eficácia dos produtos visando registro junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Visando a redução de infecções nosocomiais e, conseqüentemente, a promoção da saúde da população, sugere-se que o uso de produtos à base de glutaraldeído deve ser suspenso para quaisquer fins no que diz respeito à desinfecção de alto nível, já que todas as cepas de *M. massiliense* provenientes de surto e pertencentes ao clone prevalente no país foram tolerantes a esse desinfetante.

Palavras-chave: Micobactérias de crescimento rápido; desinfecção de alto nível; resistência a biocidas; *Mycobacterium massiliense*.

ABSTRACT

The outbreaks caused by rapidly growing mycobacteria (RGM) after invasive medical procedures, occurred in different regions of the country, resulted in the emergence of many questions related to the characteristics of microorganisms associated with these events, the procedures used in equipment disinfection and, mainly, the effectiveness of the products used, considered safe for this application up to now. *Mycobacterium massiliense*, among others RGM, has been isolated as etiologic agent of localized and systemic infections, and a single clone (BRA100) is prevalent in the whole country. The non-evidence of RGM transmission through human contact has led to the proposition that the infection can occur from environmental sources, reinforcing the suspicion of inadequate disinfection of medical articles. The aim of this study was to evaluate the RGM susceptibility by Confirmative *in vitro* Test for Determining Mycobactericidal Activity of Disinfectants, from Association of Official Analytical Chemists, to glutaraldehyde, peracetic acid and orthophtalaldehyde-based disinfectants. Five *M. massiliense* clinical strains belonging to the clone BRA100, and the reference strains *M. bovis* BCG Moreau, *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. massiliense* INCQS 00594 were evaluated. For glutaraldehyde-based disinfectants, it was observed that none of them was effective for *M. bovis* BCG Moreau, the only reference strain recommended by AOAC in the effectiveness examination assay of this kind of product. *M. chelonae* was killed by the three tested disinfectants, while *M. fortuitum* was killed only by two of them. The three disinfectants were ineffective for *M. abscessus* and *M. massiliense*. The peracetic acid-based disinfectants showed effectiveness for all mycobacteria used (absence of growth), although *M. massiliense* isolates had presented a reduced susceptibility to peracetic acid B. Orthophtalaldehyde-based product was effective to *M. bovis* BCG Moreau and *M. chelonae*, and all the others mycobacteria studied were tolerant to this disinfectant. The high tolerance of *M. massiliense* isolates to glutaraldehyde was a determinant factor for the recent mandatory inclusion of the strain referent to this bacterial species in mycobactericidal activity evaluation assay for effectiveness verification of products in order to register them on *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. In order to reduce the nosocomial infections and, consequently, to promote human health, it is suggested that the use of glutaraldehyde-based products must be suspended for whatever purpose, in relation to high level disinfection, since all *M. massiliense* isolates from outbreaks and belonging to the prevalent clone in the country were tolerant to this disinfectant.

Key-words: Rapidly growing mycobacteria; high level disinfection; biocide resistance; *Mycobacterium massiliense*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura da parede celular de micobactérias	15
Figura 2	Infecção por Micobactérias de Crescimento Rápido após lipoaspiração	18
Figura 3	Esquema da transferência dos cilindros entre os tubos utilizados no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida, da “Association of Official Analytical Chemists” – AOAC, conforme descrito no Procedimento Operacional Padronizado – POP INCQS nº 65.3210.004	44
Figura 4	Atividade micobactericida do Glutaraldeído A frente aos micro-organismos empregados no estudo	58
Figura 5	Atividade micobactericida do Glutaraldeído A1 frente aos micro-organismos empregados no estudo	59
Figura 6	Atividade micobactericida do Glutaraldeído B frente aos micro-organismos empregados no estudo	60
Figura 7	Atividade micobactericida do OPA frente aos micro-organismos empregados no estudo	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Casos de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido nos estados brasileiros	22
Tabela 2	Dados sobre cinco cepas de <i>Mycobacterium massiliense</i>	35
Tabela 3	Dados sobre a análise do teor dos produtos estudados	36
Tabela 4	Avaliação da qualidade dos desinfetantes utilizando <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau	51
Tabela 4A	Repetição dos ensaios de avaliação da qualidade dos produtos à base de Glutaraldeído e OPA, utilizando <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau	52
Tabela 5	Avaliação da qualidade dos desinfetantes utilizando <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº00594	53
Tabela 6	Avaliação da suscetibilidade de micobactérias frente ao produto denominado Glutaraldeído A	55
Tabela 7	Avaliação da suscetibilidade de micobactérias frente ao produto denominado Glutaraldeído A1	56
Tabela 8	Avaliação da suscetibilidade de micobactérias frente ao produto denominado Glutaraldeído B	57
Tabela 9	Avaliação da suscetibilidade de micobactérias frente ao produto denominado Ácido peracético A	62
Tabela 10	Avaliação da suscetibilidade de micobactérias frente ao produto denominado Ácido peracético A1	63
Tabela 11	Avaliação da suscetibilidade de micobactérias frente ao produto denominado Ácido peracético B	64
Tabela 11A	Repetição dos ensaios da avaliação da suscetibilidade de micobactérias frente ao produto denominado Ácido peracético B	65
Tabela 12	Avaliação da suscetibilidade de micobactérias frente ao Ortoftalaldeído	67
Tabela 12A	Repetição dos ensaios da avaliação da suscetibilidade de micobactérias frente ao Ortoftalaldeído	68
Tabela 12B	Repetição dos ensaios da avaliação da suscetibilidade da cepa de <i>Mycobacterium massiliense</i> CRM 0019 e de <i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977 frente ao Ortoftalaldeído	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

µg	Micrograma
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (EUA)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (EUA)
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DISAD	Divisão Nacional de Produtos Saneantes Domissanitários
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
IMPPG	Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPEC	Instituto de Pesquisa Evandro Chagas
L	Litro
LASIK	<i>Laser in Situ Keratomileusis</i>
mL	Mililitro
MCL	Micobactéria de Crescimento Lento
MCR	Micobactéria de Crescimento Rápido
OPA	Ortoftalaldeído
POP	Procedimento Operacional Padrão
RENISS	Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 MICOBACTÉRIAS	14
1.2 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO	16
1.2.1 Infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido	17
1.2.2 Casos e surtos no Brasil	19
1.2.3 Tratamento e diagnóstico	22
1.2.4 Identificação de MCR	23
1.2.5 Mecanismo de tolerância	24
1.2.6 Fonte de infecções e transmissão	26
1.3 MEDIDAS PREVENTIVAS DE INFECÇÕES	27
1.4 HISTÓRICO DAS LEGISLAÇÕES E AÇÕES DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.	30
1.5 JUSTIFICATIVA	32
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 CEPAS BACTERIANAS	35
3.2 DESINFETANTES	36
3.3 MANUTENÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS	37
3.3.1 Manutenção de <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau	37
3.3.2 Manutenção de <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594	37
3.3.3 Manutenção das cepas do <i>American Type Culture Collection</i> , das Micobactérias de Crescimento Rápido e das cepas clínicas de <i>Mycobacterium massiliense</i>	38
3.4 MÉTODO CONFIRMATÓRIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DOS DESINFETANTES	38
3.4.1 Preparo da cultura teste de <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau	38
3.4.2 Preparo da cultura teste de <i>Mycobacterium massiliense</i> INCQS nº 00594	39
3.4.3 Realização do método	39
3.4.4 Controles da resistência do micro-organismo	40
3.4.5 Controles de esterilidade	41

3.4.6	Controle da viabilidade dos meios de cultura PB, K, 7H9 em relação a <i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau	42
3.4.7	Leitura dos resultados	43
3.4.8	Interpretação dos resultados	43
3.5	TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN	45
3.6	AVALIAÇÃO DO TEOR DOS PRODUTOS	45
3.7	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO AOS DESINFETANTES	45
3.7.1	Procedimento do ensaio	45
3.7.2	Controles de esterilidade	46
3.7.3	Controle de viabilidade dos meios de cultura PB, K e 7H9	46
3.7.4	Controle da resistência das cepas do <i>American Type Culture Collection</i> de Micobactérias de Crescimento Rápido e das cepas clínicas de <i>Mycobacterium massiliense</i>	46
4	RESULTADOS	48
4.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DOS DESINFETANTES À BASE DE GLUTARALDEÍDO, DE ÁCIDO PERACÉTICO E DE ORTOFTALALDEÍDO ATRAVÉS DO MÉTODO CONFIRMATÓRIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA	48
4.1.1	Produtos à base de glutaraldeído a 2%	48
4.1.2	Produtos à base de ácido peracético	49
4.1.3	Produtos à base de ortoftalaldeído	50
4.2	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO AOS DESINFETANTES	54
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

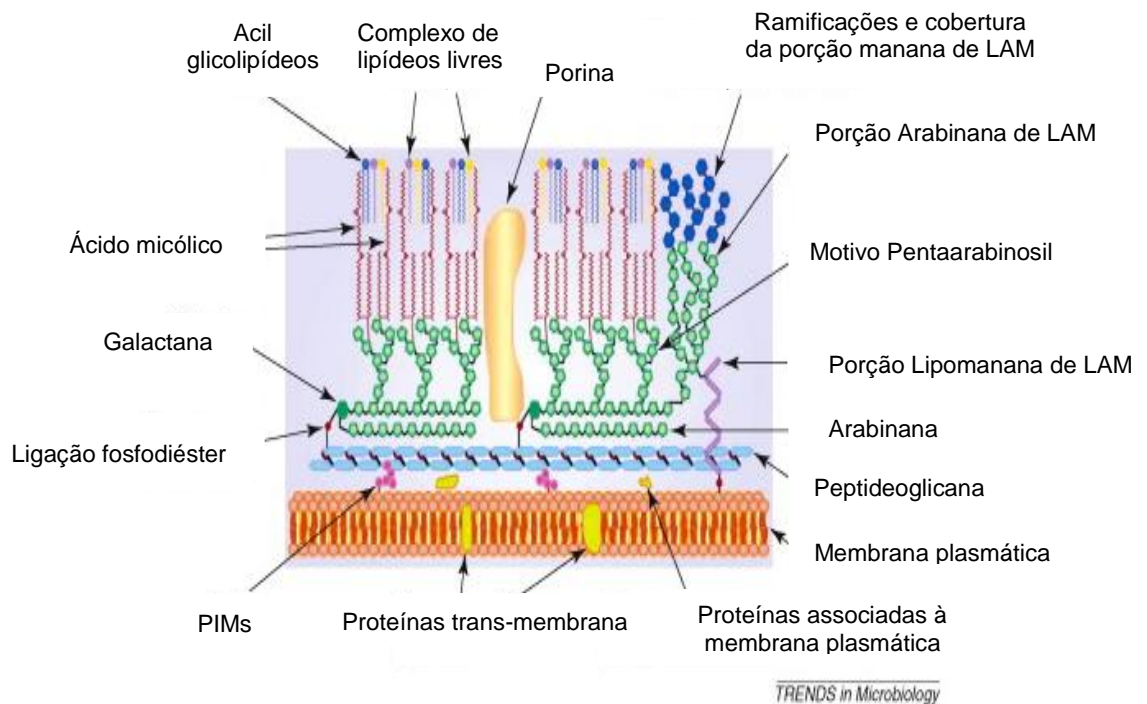
1.1 MICOBACTÉRIAS

As micobactérias pertencem ao filo *Actinobacteria*, gênero *Mycobacterium*, família *Micobacteriaceae*, e constam de 149 espécies e 11 subespécies descritas na lista de espécies bacterianas com nomes aprovados. São micro-organismos caracterizados como bastonetes aeróbios ou microaerófilos, imóveis, não encapsulados e não esporulados (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, BRITO, 2008, EUZÉBY, 2011). Apresentam outras características como patogenicidade, coloração álcool-ácido resistente, resistência a drogas e a estresses ambientais, como o ressecamento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Nas micobactérias, uma camada espessa de ácido micólico substitui a camada externa de lipopolissacarídeos encontradas na parede celular de bactérias, o que contribui no seu processo de resistência a agentes químicos e físicos e a sua taxa de crescimento lento, já que os nutrientes entram por essa camada bem lentamente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, BRITO, 2008). Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa que se ligam covalentemente aos polissacarídeos designados arabinogalactanos, e estes fazem a ligação por pontes fosfodiéster com as peptidoglicanas, resultando numa parede rica em lipídeos e, conseqüentemente, numa barreira impermeável a moléculas hidrofílicas, permitindo a maior resistência das micobactérias a várias substâncias, inclusive desinfetantes e antibióticos, quando comparadas às outras bactérias (**FIGURA 1**) (FRAUD et al., 2003, HINRICHSEN, 2007).

Runyon, em 1959, classificou as micobactérias atípicas com base no tempo de crescimento “in vitro” e na produção de pigmentos carotenóides em: crescimento lento composto por três grupos, e um grupo formado por micobactérias de crescimento rápido (MCR). Dentre as micobactérias de crescimento lento, no grupo I encontram-se as fotocromogênicas, que produzem pigmento laranja ou amarelo quando expostas à luz; o grupo II é composto pelas escotocromogênicas que são semelhantes ao grupo anterior, porém podem produzir os pigmentos mesmo na ausência de luz e no grupo III estão as acromogênicas que não produzem

pigmentos. As micobactérias de crescimento rápido formam o grupo IV, podendo apresentar-se pigmentadas ou não, e geralmente são saprófitas, porém podem estar associadas a casos de patologia humana (PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004, FONTANA, 2008).



Fonte: Adaptado de Medjahed, Gaillard & Reytrat (2010)

FIGURA 1. Estrutura da parede celular de micobactérias. LAM, Lipoarabinomanana; PIM, manosídeos Fosfatidilinositol

As micobactérias foram classificadas também quanto ao tempo de crescimento em meio sólido, e são geralmente divididas em dois grupos denominados, atualmente, como micobactérias de crescimento lento (MCL) e micobactérias de crescimento rápido (MCR). As MCLs incluem a maioria das micobactérias patogênicas como o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) e o complexo *Mycobacterium avium* e produzem colônias visíveis em meio sólido após 7 dias de incubação, apresentando tempo de geração acima de 16 horas. As MCRs podem ser observadas até mesmo antes de completar 7 dias de incubação, sendo de 3 a 4 horas o seu tempo de geração, sendo que meios de cultura simples contendo sais minerais, glicerol e aminoácidos podem ser utilizados

para o crescimento da maioria das espécies. As MCR são referidas algumas vezes como micobactérias atípicas, micobactérias não causadoras de tuberculose ou micobactérias ambientais. 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).

1.2 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

As MCRs podem ser encontradas em uma variedade de reservatórios ambientais como água, solo, aerossóis, em protozoários, em animais e em seres humanos (HOWARD; BYRD, 2000). São organismos capazes de formar biofilme e sobreviver em ambientes com níveis baixos de nutrientes (PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004). Aproximadamente cinquenta diferentes espécies de micobactérias têm sido consideradas agentes etiológicos de doenças humanas e várias novas espécies de micobactérias não tuberculosas patogênicas têm sido descritas (WAGNER & YOUNG, 2004).

Entre as principais espécies de MCR relacionadas às doenças no homem encontram-se *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium fortuitum* (SHINNICK; GOOD, 1994). Porém essas infecções geralmente estão associadas a pessoas com fatores predisponentes ou imunocomprometidas, já que são micro-organismos que geralmente apresentam baixa virulência (WAGNER; YOUNG, 2004, CHO et al., 2010).

Em 2004, *Mycobacterium massiliense* foi sugerida como uma nova espécie, dentro do grupo *M. chelonae* - *M. abscessus* (ADÉKAMBI et al., 2004; LEÃO et al., 2009), sendo aceita em 2006 (VIANA-NIERO et al., 2008, EUZÉBY, 2011). Essa espécie tem sido isolada de surtos de infecções após processos de laparoscopia e procedimentos estéticos (VIANA-NIERO et al., 2008), enquanto *M. abscessus* é considerada a mais patogênica e resistente a tratamentos quimioterápicos, sendo freqüentemente isolada de pacientes com fibrose cística (PETRINI, 2006).

Um micro-organismo de potencial patogênico teoricamente baixo, mas de importância crescente é o *M. fortuitum*. Está amplamente distribuído na natureza e é

frequentemente encontrado no ambiente hospitalar, podendo contaminar materiais cirúrgicos e até mesmo os reservatórios de água. Essa micobactéria pode causar infecções cutâneas através de lesão pós-cirúrgica ou no local de uma lesão penetrante na pele (HINRICHSEN, 2007).

M. chelonae também tem sido considerada, há muitos anos, como um importante patógeno presente em hospitais, sendo associada a fluidos de hemodiálise e a soluções de desinfetantes (CARSON et al, 1978). Recentemente têm sido descritos casos de infecções envolvendo essa bactéria como agente etiológico em pacientes imunocomprometidos, cirurgias por laparoscopia e cirurgia ocular através do laser in situ keratomieusis (LASIK) (JANKOVIC et al., 2010).

1.2.1 Infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido

A primeira associação de MCR como agente etiológico de patologias humanas foi feita em 1904, por Ophüls, que observou a presença de micobactérias em abscesso crônico em humanos. Entretanto o reconhecimento da importância dessas bactérias na patologia humana como causadores de doenças, associadas aos quadros nosológicos, ocorreu em 1950 (TIMERMAN, 2005).

As MCR estão envolvidas em infecções que vão desde abscessos localizados até doenças pulmonares; podem afetar vários tecidos causando osteomielite, artrite, linfadenite, otite média crônica, infecções da córnea provocando até mesmo a remoção do tecido infectado, e tem emergido como um dos principais causadores de infecções respiratórias (FALKINHAM, 1996, HOWARD; BYRD, 2000, PHYLLIPS; VON REYN, 2001, SHIN et al., 2007, CARDOSO et al., 2008).

As infecções cutâneas e subcutâneas ocasionadas por essas micobactérias são caracterizadas na forma de abscessos piogênicos, indicando uma reação inflamatória aguda. Pode ainda haver evolução lenta do caso com inflamação crônica, formando nódulos, fístulas e ulceração (FONTANA, 2008).

Um relato foi registrado por Vijayaraghavan e colaboradores (2006), onde foram detectados 145 casos de infecções por *M. chelonae* em pacientes que foram submetidos à cirurgia de videolaparoscopia em um mesmo hospital num período de seis meses. A água utilizada na etapa de rinsagem dos instrumentos a serem

submetidos a processo de desinfecção foi reconhecida como a fonte de contaminação. Os micro-organismos se proliferavam no biofilme formado nos recipientes contendo os desinfetantes.



FIGURA 2. Infecção por Micobactérias de Crescimento Rápido após lipoaspiração. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-89102008000100020&script=sci_arttext

Nos Estados Unidos, somente em 2007, ocorreu o primeiro relato descrevendo a identificação de isolados de *M. massiliense* associados a infecções ocorridas em dois pacientes que foram submetidos a procedimentos invasivos, porém há suspeitas de que esse micro-organismo já era comum anteriormente e classificado incorretamente como *M. abscessus*. A identificação foi realizada através do sequenciamento dos genes *rpoB*, *sodA* e *hsp65* (SIMMON et al., 2007).

Um caso foi registrado na Itália de infecção letal causada também por *M. massiliense* em uma paciente de 63 anos. O tratamento correto não foi realizado de imediato, levando a paciente a óbito. Posteriormente, identificaram a bactéria como *M. massiliense* através do sequenciamento do gene *rpoB*. O isolado clínico era sensível somente a claritromicina e amicacina, indicando seu alto potencial patogênico (TORTOLI et al., 2008).

Em 2010, outro estudo norte-americano relatou casos de infecções por *M. fortuitum* associados à cirurgia de Banda Gástrica por laparoscopia, indicando que novas fontes de infecções relacionadas a esta micobactéria estão surgindo, já que esta MCR está tipicamente envolvida em infecções cutâneas e, ocasionalmente,

pulmonar. Sendo assim, *M. fortuitum* tem sido considerado um patógeno ambiental relevante, capaz de causar um amplo espectro de doenças (CALLEN; KESSLER, 2010).

1.2.2 Casos e surtos no Brasil

Há alguns anos as investigações e relatos de casos e surtos por MCR eram pouco frequentes, no Brasil, porém esse quadro foi sendo modificado ao longo do tempo conforme descrito a seguir. Em 1988, no Rio de Janeiro, foram descritos 2 casos de ceratite por *M. abscessus* após cirurgia a laser para correção de miopia; em 1999, casos semelhantes foram observados em São Paulo e nesse mesmo ano, 22 casos de pacientes submetidos à cirurgia ocular através do LASIK, em uma clínica do Rio de Janeiro, também apresentaram ceratite por *M. chelonae* (ALVARENGA et al., 2002, SAMPAIO et al., 2006).

Em São Paulo, no ano de 2000 mais 10 casos de ceratite envolvendo *M. chelonae* foram diagnosticados após o tratamento por LASIK em uma mesma clínica. No mesmo ano, *M. chelonae* foi também isolado de abscessos cutâneos em 10 pacientes submetidos à mesoterapia. Em 2002, fato semelhante a esse foi observado em outra clínica de estética na cidade de São Paulo (SAMPALIO et al., 2006). Em 2004, em Belém, foram diagnosticados 111 casos de infecções por *M. abscessus* em pacientes submetidos à mesoterapias e laparoscopias. Caso semelhante foi também verificado no Rio de Janeiro, São Paulo e Teresina, com mais de 115 pacientes envolvidos (ANVISA, 2005b).

De 2003 a 2008, foram registrados vários surtos significativos por MCR após cirurgias por videolaparoscopia em 16 diferentes estados brasileiros, com estimativa de mais de 2.000 casos suspeitos (ANVISA, 2008). Foi observado que o aspecto comum em todos os surtos foi o relato de que diferentes cirurgiões utilizaram seu próprio equipamento de laparoscopia desinfetado em solução de glutaraldeído a 2% entre uma cirurgia e outra (VIANA-NIERO et al., 2008). Esse procedimento pode se tornar um grande problema, já que as MCR podem sobreviver sobre equipamentos desinfetados de forma inadequada, que posteriormente sendo utilizados em

diagnósticos clínicos ou em cirurgias, podem conseqüentemente causar infecções nosocomiais (SHIN et al., 2007).

Em Belém, no Instituto Evandro Chagas, de 1999 a 2003 foram diagnosticados a cada ano entre 4 a 12 casos de infecções por MCR, sendo que a maioria era oriunda de infecções respiratórias. Porém entre 2004 e 2005 foram isolados MCR de pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos, os quais foram inicialmente descritos como *M. abscessus* e mais recentemente caracterizados como *M. massiliense* e *M. bolletii*, que diferem apenas em 3 nucleotídeos, em relação ao gene *hsp65* (VIANA-NIERO et al., 2008). Foi o primeiro surto significativo por *M. massiliense* no país, onde cinquenta e oito isolados pertencentes ao mesmo clone, BRA100, foram detectados em pacientes submetidos a cirurgias de videolaparoscopia, em dezesseis hospitais privados. 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 (DUARTE et al., 2009). Já os isolados oriundos de biópsia após mesoterapia foram identificados como *M. bolletii*, pertencentes a vários clones (VIANNA-NIERO et al., 2008).

Após este primeiro surto de infecções pós-cirúrgicas por *M. massiliense*, vários outros foram descritos em aproximadamente quinze estados brasileiros e associados também a um único clone (CARDOSO et al., 2008, DUARTE et al., 2009). Como é o caso do surto ocorrido em Goiânia, onde 18 isolados de *M. massiliense* pertencentes a um mesmo clone foram provenientes de infecções geradas após procedimentos videocirúrgicos, principalmente artroscopia (CARDOSO et al., 2008).

Em 2007, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou um alerta sobre infecções por micobactérias não tuberculosa após videocirurgia, informando dados sobre a presença, principalmente, de *M. abscessus* em estabelecimentos ligados à saúde, em várias localidades de Norte ao Sul do País. E, a Rede Nacional de Investigação de Surto e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (RENISS) confirmou a ocorrência, em várias localidades dos Estados brasileiros, de infecções pós-cirúrgicas por MCR representados por *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* em pacientes submetidos a processos invasivos, devido principalmente à utilização de instrumentais ou artigos médicos que sofreram desinfecção de alto nível em solução de glutaraldeído, o que na prática clínica

constitui uma das medidas para prevenir a disseminação de bactérias em ambientes relacionados à saúde (ANVISA, 2007a).

A ANVISA divulgou em 2008 uma nota técnica sobre infecções hospitalares por MCR, informando que de 2003 até abril de 2008 haviam sido notificados mais de 2.000 casos em hospitais particulares do país. O maior número de casos de infecções ocorreu no Rio de Janeiro, com quase 1.000 casos, seguido do Pará, onde foram confirmados 314 casos. No estado do Espírito Santo também foram confirmados mais de 200 casos. Houve ocorrências também nos estados de Pernambuco, Roraima, Bahia, Mato Grosso do Sul, Piauí, Minas Gerais, Mato Grosso, Distrito Federal, São Paulo, Goiás, Paraná, e no Rio Grande do Sul (**TABELA 1**). Desses casos confirmados, 74% era representado por pacientes do sexo feminino, onde a maioria havia sido submetida à cirurgias na região abdominal (72%), sendo o vídeo a principal via de acesso do procedimento (82%) (ANVISA, 2008).

No estado do Rio de Janeiro, somente nos anos de 2006 e 2007, em 63 hospitais, foram identificados 1.051 casos suspeitos de infecções relacionadas a procedimentos videolaparoscópicos. Essas infecções acometeram principalmente a pele e o tecido celular subcutâneo e foram causadas por *M. massiliense*, pertencente ao clone BRA100, o mesmo encontrado nos surtos de Belém e Goiânia. As principais manifestações clínicas eram a formação de abscessos, nódulos e ulcerações nos sítios de incisão (LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009, DUARTE et al., 2009).

A contaminação por *M. massiliense* nos recentes surtos tem sido prevalente, provavelmente devido à sobrevivência atípica desse micro-organismo em diferentes ambientes, sua resistência à biocidas e sua capacidade de formar biofilmes (CHO et al., 2010).

TABELA 1. Casos de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido em alguns estados brasileiros

UF	ANO									SI	Total
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008			
PE							1				1
RO								1			1
BA							5	1			6
MS							8				8
PI				9							9
MG							13	3			16
MT				1	16	4					21
DF					1	10	3	9			23
SP			29	14				1			44
GO					2	22	22			25	71
PR						1	127			15	143
RS						8	34	43		61	146
ES				1		4	219			36	260
PA	3	1	7	248	27		3			25	314
RJ					10	527	416			16	969
Total	3	1	36	273	56	576	851	58	178	2032	

SI, sem informação ou sob investigação; PE, Pernambuco; RO, Roraima; BA, Bahia; MS, Mato Grosso do Sul; PI, Piauí; MG, Minas Gerais; MT, Mato Grosso; DF, Distrito Federal; SP, São Paulo; GO, Goiás; PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; ES, Espírito Santo; PA, Pará; RJ, Rio de Janeiro.

Fonte: ANVISA (2008)

1.2.3 Tratamento e diagnóstico

O tratamento das doenças por MCR é dificultado não somente por apresentarem resistência à maioria das drogas de primeira linha, como também por exibirem diferentes perfis de sensibilidade aos antibióticos disponíveis, mas também pelo fato do tratamento envolver meses de terapia com esses medicamentos (HOWARD; BYRD, 2000).

Para infecções causadas por *M. fortuitum* e *M. abscessus* é recomendado tratamento intravenoso com amicacina e cefoxitina. O imipenem é indicado como alternativa às cepas que são resistentes a esses fármacos. A antibioticoterapia é aconselhada por no mínimo quatro meses, em caso de infecções consideradas graves, e seis meses para as infecções ósseas (LUNA, 2001).

De acordo com Cho e colaboradores (2010), *M. massiliense* proveniente de infecção cutânea associada com procedimento cirúrgico se apresentou sensível frente à claritromicina (CIM \leq 0.5 $\mu\text{g/mL}$), amicacina (CIM = 4 $\mu\text{g/mL}$) e cefoxitina (CIM = 16 $\mu\text{g/mL}$), sendo resistente à doxaciclina (CIM = 32 $\mu\text{g/mL}$).

O diagnóstico da doença é realizado através da análise microbiológica de tecidos e secreções causadas pelas infecções para comprovar a presença do micro-organismo. A pesquisa de BAAR (Bacilos Álcool-ácido Resistentes) nessas secreções é importante para auxiliar no diagnóstico da doença. Os testes de sensibilidade também são indicados para as cepas clínicas de MCR, por causa das diferenças na suscetibilidade aos antimicrobianos entre as espécies desses micro-organismos e até mesmo entre cepas do mesmo clone (WAGNER; YOUNG, 2004, ANVISA, 2007c).

1.2.4 Identificação de MCR

A identificação de MCR em nível de espécie através de provas bioquímicas convencionais é bastante dificultada não somente por consumir muito tempo até a leitura dos resultados, como também por apresentar limitações quanto ao seu poder discriminatório, já que essas micobactérias apresentam padrões fenotípicos muito semelhantes. Atualmente a identificação é complementada por técnicas de biologia molecular a fim de auxiliar na acurácia dos resultados ou mesmo na caracterização e descrição de novas espécies (LUNA, 2001, SHIN et al., 2007).

A identificação correta de espécies de MCR é imprescindível para a descrição exata das infecções ocasionadas por essas bactérias. O sequenciamento do gene 16S rRNA era o método principal para identificação de isolados de micobactérias, porém resultados ambíguos podem ser obtidos devido à possível presença de duas cópias do gene 16S rRNA com sequências diferentes no mesmo micro-organismo. O sequenciamento do gene *rpoB* tem se mostrado mais eficiente para caracterização de novas espécies, como *Mycobacterium bolleti*, que foi identificado a partir desse método molecular (ADÉKAMBI et al., 2006, LEÃO et al., 2009).

M. massiliense, por exemplo, é um micro-organismo difícil de ser identificado fenotipicamente utilizando métodos convencionais, além disso, apresenta grande

semelhança com *M. abscessus*, uma vez que apresentam a mesma sequência do gene 16S rRNA. A diferenciação desses patógenos pode ser facilitada a partir do sequenciamento dos genes *rpoB*, *hsp65*, *sodA* e *recA* (CHO et al., 2010).

1.2.5 Mecanismo de tolerância

O mecanismo de tolerância das micobactérias a desinfetantes não está bem elucidado, porém sabe-se que a baixa permeabilidade da parede externa das micobactérias certamente contribui para a resistência intrínseca desses organismos a diversos agentes, inclusive antibióticos (STEPHAN et al., 2004).

O grande conteúdo lipídico e a camada tripla da parede celular confere às micobactérias mais tolerância aos desinfetantes, a temperaturas elevadas e à luz ultra-violeta quando comparadas às outras bactérias patogênicas (FONTANA, 2008). Além disso, são capazes de formar biofilme que além de dar suporte ao crescimento micobacteriano, protege o organismo dificultando a desinfecção (LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009).

Alguns estudos demonstram que micobactérias de crescimento rápido, como *M. fortuitum* e *M. chelonae*, são capazes não somente de sobreviver, mas também de se multiplicar em água destilada, atingindo níveis de 10^4 a 10^6 células por mL, sendo mais resistentes a alguns desinfetantes do que bactérias Gram-negativas tipicamente encontradas em equipamentos hospitalares (CARSON et al., 1978).

Em um hospital universitário no Japão, em 1999, foram isoladas 18 cepas de *M. chelonae* de máquinas para lavagem de broncoscópios, dentre as quais 50% se apresentavam tolerantes ao biocida à base de glutaraldeído e a alguns antibióticos, gerando um alerta sobre a existência de cepas resistentes em hospitais (NOMURA et al., 2004).

Deficiências nas porinas, que são proteínas expostas na superfície da célula bacteriana e que geralmente transportam moléculas como os antibióticos para o interior da célula, podem representar um importante papel no mecanismo de tolerância de *M. chelonae* e *M. smegmatis* frente ao glutaraldeído e ortoftalaldeído, sugerindo que possa haver similaridades no mecanismo de outras micobactérias e bactérias Gram-negativas em relação aos desinfetantes à base de aldeído

(SVETLÍKOVÁ et al., 2009) Outro estudo utilizou uma cepa de *M. smegmatis* que sofreu mutação e não continha a principal porina MspA, e foi observado que essa deleção aumentou o nível de resistência dessa bactéria a alguns antibióticos. Com base nesse estudo verificou-se que há relação entre a via das porinas e o mecanismo de resistência desse micro-organismo, já que houve modificações na permeabilidade da membrana externa desta micobactéria (STEPHAN et al., 2004).

Outra evidência que pode explicar a tolerância de micobactérias a biocidas são as mudanças nos monossacarídeos das porções arabinogalactana e arabinomanana, o que pode provocar uma redução da permeabilidade da parede celular, impedindo a penetração do desinfetante na bactéria e, conseqüentemente, sua ação (MANZLOOR et al., 1999). Hidrofobicidade e impermeabilidade são certamente fatores que contribuem para que as micobactérias sejam tolerantes a processos de desinfecção (BRENNAN; NIKAIDO, 1995). Agentes hidrofílicos possuem grande dificuldade para penetrar na parede celular em concentrações suficientemente altas para ter uma ação micobactericida (FRAUD; MAILLARD; RUSSEL, 2001).

Uma alternativa para a redução da carga micobacteriana, já que essas bactérias têm se mostrado tolerantes a alguns mecanismos de desinfecção, seria a combinação de desinfetantes com agentes surfactantes a fim de aumentar a penetração nas células e biofilmes, eliminando uma carga superior de micobactérias (FALKINHAM, 2003).

Alguns autores cogitaram a possibilidade do mecanismo dificultado de eliminação das micobactérias estar relacionado ao possível processo de esporulação realizado por essas bactérias para se adaptarem em condições de estresse (GHOSH, 2009). Porém esse mecanismo ainda não está bem esclarecido, já que Traag e colaboradores (2010) concluíram que é improvável que as micobactérias sejam capazes de formar endosporos.

Outros fatores de virulência identificados em micobactérias de crescimento lento podem ser importantes na elucidação do mecanismo de patogenicidade de MCR. Mudanças na estrutura da parede celular bacteriana, que afetam a morfologia da colônia, alteram a virulência de *Mycobacterium avium*, por exemplo, e o mesmo pode ocorrer com algumas MCR (HOWARD; BYRD, 2000).

1.2.6 Fonte de infecções e transmissão

Segundo Shin e colaboradores (2007) a não evidência de transmissão de MCR de pessoa a pessoa leva à proposição de que os seres humanos são infectados por fontes ambientais que podem incluir aerossóis, solo, alimentos, equipamentos e água. Alguns estudos relatam a persistência desses micro-organismos em ambientes hospitalares pelo fato de não serem destruídos por desinfetantes e tolerarem variações de pH e temperaturas.

O mecanismo de transmissão mais aceito seria a formação de aerossóis dos micro-organismos, no caso de infecções respiratórias, e sua ingestão por via digestiva, em linfadenites. Em pacientes com infecções cutâneas, é provável que aconteça a inoculação direta do patógeno através da água e outros materiais cirúrgicos (LUNA, 2001).

Não há explicações claras para a definição da fonte de infecções causadas por micobactérias atípicas. Tal questão pode envolver uma possível contaminação da água, falhas no processo de limpeza do instrumental cirúrgico ou até mesmo a ineficácia dos produtos esterilizantes na total eliminação dos micro-organismos (ANVISA, 2009).

A tolerância a altas temperaturas e aos desinfetantes químicos tais como glutaraldeído e compostos clorados contribuem para o isolamento de algumas espécies em sistemas de fornecimento de água e superfícies expostas à água durante o procedimento de limpeza. Em estabelecimentos de saúde as MCR têm sido encontradas em água encanada, máquinas de gelo, equipamentos dentários, broncoscópios, injetores, água de rinsagem para máquinas de hemodiálise, provavelmente devido à hidrofobicidade das paredes das células micobacterianas, e em desinfetantes (HOWARD; BYRD, 2000).

Em alguns casos a fonte de infecções pode estar associada com a limpeza inadequada de equipamentos médicos, onde pode ser acumulada matéria orgânica, levando à formação de biofilmes e assim dificultando a ação dos desinfetantes. Além também, das irregularidades em relação ao tempo de exposição do produto sobre o artigo a sofrer desinfecção de alto nível (CARDOSO et al, 2008).

1.3 MEDIDAS PREVENTIVAS DE INFECÇÕES

Infecção hospitalar é definida como aquela a qual não há qualquer evidência de que a infecção estivesse presente ou incubada na época da admissão do paciente no hospital. Estudos epidemiológicos revelam que tais infecções são decorrentes de procedimentos e técnicas praticadas de forma inadequada pelos profissionais de saúde e, com o objetivo de reduzir a exposição do hospedeiro suscetível ao micro-organismo, medidas preventivas têm sido empregadas 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. A desinfecção por esses agentes pode ser de caráter físico ou químico (RUSSEL, 1991, NOGUCHI et al., 1999, MCDONNELL, 2007).

A eficácia dos desinfetantes contra as micobactérias depende de vários fatores como a composição e concentração do agente ativo, a presença de material orgânico e o tempo de contato com o desinfetante. Instrumentos médicos que entram em contato com membranas mucosas requerem desinfecção de alto nível, no qual são utilizados agentes químicos como glutaraldeído e ácido peracético por apresentarem atividade micobactericida comprovada (BLOCK, 2001).

Os desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos e esterilizantes podem conter em suas formulações princípios ativos tais como glutaraldeído, ortoftalaldeído e ácido peracético (BLOCK, 2001).

A solução de glutaraldeído a 2%, em pH alcalino, é amplamente utilizada para desinfecção de alto nível e esterilização de objetos sensíveis ao calor, como endoscópios e equipamentos de plásticos e, não é corrosiva para a maioria dos materiais (FRAUD; MAILLARD; RUSSEL, 2001, ANVISA, 2007b). Sua escolha é pautada devido sua ação biocida e por seus benefícios se apresentarem maiores que suas desvantagens, além de agir na presença de matéria orgânica. Após a ativação do produto seu prazo de validade varia entre 14 e 28 dias conforme o fabricante, devendo haver, na prática, um monitoramento da concentração da solução por meio de fitas indicadoras da sua concentração. E essas fitas não devem ser usadas para ampliar a vida útil do glutaraldeído após seu prazo de validade, ou seja, não devem ser utilizadas após a data de vencimento do produto (RODRIGUES et al., 1997, ANVISA, 2007b).

É recomendado o manuseio de glutaraldeído em ambientes bem ventilados, já que seus vapores são considerados irritantes e tóxicos para a pele, mucosas e trato respiratório (MCDONNELL, 2007). Porém é classificado como agente não mutagênico, não cancerígeno e sem toxicidade sistêmica pela Agência de Saúde Ocupacional dos USA e Agência Internacional para a investigação do Câncer (ANVISA, 2007b).

O principal mecanismo de ação do glutaraldeído ocorre através da reação cruzada com proteínas da superfície celular e da inibição da síntese de DNA, RNA e outras macromoléculas presentes no micro-organismo. O glutaraldeído é mais ativo com a alcalinização, pois 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 possui também atividade micobactericida, porém nenhum estudo crítico foi ainda desenvolvido para avaliar a natureza dessa ação (MCDONNELL, 2007).

Entretanto, há vários anos, alguns estudos têm apontado problemas em relação ao uso desse produto para desinfecção de equipamentos, como máquinas de lavagem e desinfecção de endoscópios. Van Klingeren e Pullen (1993) mostraram que a desinfecção constante de equipamentos com glutaraldeído, possibilitou a seleção de cepas de *M. chelonae* com reduzida suscetibilidade a esse agente. O mesmo ocorreu em outro estudo, onde cepas da mesma bactéria foram isoladas de dois endoscópios e se comportaram bastante tolerantes à solução de glutaraldeído a 2% (GRIFFITHS et al., 1997). E, mais recentemente, surtos de infecções por *M. massiliense* foram associados com o desenvolvimento de resistência a esse biocida (DUARTE et al., 2009).

Outro aldeído, que tem sido proposto como uma possível alternativa ao uso do glutaraldeído para desinfecção de alto nível para endoscópios (WALSH; MAILLARD; RUSSEL, 1999) é o ortoftalaldeído (OPA), um dialdeído aromático, que apresenta uma formulação comercial pronta para uso, com concentração igual a 0.55%, pH 7,5, sendo usado para desinfecção de artigos termo-sensíveis. Apresenta características favoráveis, quando comparado ao glutaraldeído, como maior estabilidade, menor irritação para os usuários e é menos insalubre por sua pressão de vapor ser menor. Ortoftalaldeído demonstra rápida atividade micobactericida, provavelmente devido a sua natureza lipofílica, que facilita a sua penetração na parede celular micobacteriana (BLOCK, 2001, MCDONNELL, 2007).

Gregory e colaboradores (1999) confirmaram a eficácia do OPA e demonstraram que sua ação é aproximadamente seis vezes mais rápida que a do glutaraldeído em suas respectivas concentrações mínimas efetivas. Além de ser menos corrosivo e apresentar odor reduzido. Essa maior velocidade de ação do OPA pode ser explicada mediante a natureza lipofílica de sua molécula, facilitando sua penetração na parede celular das micobactérias com mais eficiência do que o glutaraldeído (FRAUD et al., 2003).

Por outro lado, não é recomendado o uso do OPA quando o processo de esterilização é exigido, sendo indicado, porém, em sistemas onde micro-organismos resistentes ao glutaraldeído têm se desenvolvido (WALSH; MAILLARD; RUSSELL, 1999).

Existem ainda as formulações com ácido peracético, que possui atividade rápida contra micro-organismos, inclusive os esporulados, e é eficaz mesmo na presença de matéria orgânica. Sua principal vantagem é a decomposição em compostos não-tóxicos, porém é um produto corrosivo e considerado instável particularmente quando diluído (RODRIGUES et al., 1997). O largo espectro de atividade antimicrobiana do ácido peracético e a relativa ausência de resíduos tóxicos levou à ampla aplicação desse tipo de produto. Dessa forma, é aceito para utilização em indústrias alimentícias e de bebidas, na desinfecção ou esterilização terminal de reservatórios de aço inoxidável, encanamentos, reservatórios de vidro, no tratamento de água, no reprocessamento de hemodialisadores, entre outras (BLOCK, 2001, WOLFF; ZYDNEY, 2005).

O mecanismo de ação atribuído ao ácido peracético é a desnaturação de proteínas e enzimas, aumentando a permeabilidade da parede celular através do rompimento das cadeias sulfidril (-SH) e das pontes dissulfeto (S-S) (RUSSEL; MCDONNELL, 1999).

O ácido peracético possui atividade bactericida, esporocida e fungicida. Apesar de seu mecanismo de ação não estar amplamente estudado contra outros micro-organismos, seu efeito mediante vários alvos sugere que também possa inativar micobactérias (RUSSEL, 2003).

Alguns artigos científicos relatam sobre a tolerância de MCR aos desinfetantes (VAN KLINGEREN; PULLEN, 1993, GRIFFITHS et al., 1997, MANZOOR et al., 1999, NOMURA et al., 2004, MAILLARD, 2007). A eficácia do desinfetante contra as micobactérias depende da composição e da concentração do

agente ativo, da presença de material orgânico, do tempo de contato com o desinfetante, da duração da potência do princípio ativo, da manipulação correta do produto, e do pH e da temperatura adequados durante o procedimento de desinfecção. Na prática, o glutaraldeído a 2% é utilizado por mais de 14 dias tanto na desinfecção manual, quando os artigos médicos são mergulhados no produto contido em um recipiente, como também na desinfecção automatizada, porém a presença de cepas resistentes pode ser determinante na ineficácia da atividade antimicrobiana do produto (VIJAYARAGHAVAN et al., 2006, ANVISA, 2007b).

Uma das medidas preventivas contra infecções por MCR, é que o uso de desinfetantes deve estar de acordo com as orientações dos fabricantes, seguindo o tempo de exposição do instrumental médico ao produto, o tempo de estabilidade e as concentrações indicadas. E só devem ser usados produtos com registro na ANVISA/MS (ANVISA, 2005b).

Outra medida é que não haja reprocessamento de material de uso único, conforme estabelecido na Resolução RE nº 2.606, de 11 de agosto de 2006 (BRASIL, 2006) e de acordo com os materiais contidos na Resolução RE nº 2.605, de 11 de agosto de 2006, havendo assim uma prevenção na disseminação das micobactérias (HINRICHSEN, 2007).

1.4 HISTÓRICO DA LEGISLAÇÃO E AÇÕES DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

No Brasil, a Portaria da Divisão Nacional de Saneantes Domissanitários (DISAD) nº 15, de 23 de agosto de 1988 continha a descrição do procedimento para registro de agentes químicos como os desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da comprovação da eficácia frente a vários micro-organismos, inclusive micobactérias (BRASIL, 1988).

Essa portaria já havia sido revogada em alguns itens pela Resolução nº 14, de 28 de fevereiro de 2007, com exceção somente ao que diz respeito aos desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos e aos esterilizantes (BRASIL, 2007). E, em 16 de agosto de 2010, foi publicada no Diário Oficial da União a

Resolução RDC nº 35, que revoga totalmente a Portaria DISAD nº 15 (BRASIL, 2010).

Essa Resolução dispõe sobre o regulamento técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizados em artigos críticos e semicríticos, sendo assim, define, classifica e regulamenta as condições para o registro e rotulagem de produtos com ação antimicrobiana de uso em assistência à saúde para artigos críticos e semicríticos a serem comercializados (BRASIL, 2010). Segundo essa Resolução, os desinfetantes de alto nível são definidos como produtos que destroem todos os micro-organismos em um período de tempo comprovado, exceto um número elevado de esporos bacterianos. E os esterilizantes são produtos que têm a capacidade de destruir todas as formas de vida microbiana, em um período de tempo comprovado, incluindo os esporos bacterianos.

A Resolução nº 2.606, de 11 de agosto de 2006, define os artigos semicríticos como aqueles que entram em contato com mucosas íntegras e que exigem desinfecção de alto nível ou esterilização para assegurar a sua qualidade, enquanto que os artigos críticos são aqueles utilizados em procedimentos invasivos, entrando em contato com a pele e mucosas adjacentes, sistema vascular, e tecidos subepiteliais e por isso devem ser esterilizados (BRASIL, 2006).

Os vários surtos de infecções por MCR no país, levaram a ANVISA a publicar a Resolução nº 75, de 23 de outubro de 2008, que dispõe sobre a comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos e de esterilizantes frente a duas outras micobactérias, além da *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau. Em seu artigo 1º cita que o registro desses tipos de produtos fica condicionado à apresentação de laudos de eficácia antimicrobiana frente a *Mycobacterium abscessus* e a *Mycobacterium massiliense*. Descreve ainda que os laudos devem seguir a metodologia estabelecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (BRASIL, 2008). Porém uma nova resolução foi criada revogando esta RDC nº 75 (BRASIL, 2009).

A resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009, estabelece os critérios para comprovação de eficácia de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente à micobactéria *Mycobacterium massiliense*, seguindo metodologia do INCQS. Esta resolução, portanto, não exige mais a cepa de

Mycobacterium abscessus como obrigatória na comprovação da eficácia antimicrobiana (BRASIL, 2009).

A fim de conter os surtos, foi publicada também a Resolução RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009, a qual dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por MCR em serviços de saúde, incluindo a suspensão da esterilização química por imersão, utilizando agentes esterilizantes líquidos para o instrumental cirúrgico e produtos para saúde utilizados nos procedimentos cirúrgicos e diagnósticos por videoscopias, com exceção do instrumental óptico utilizado nos procedimentos endoscópicos para acesso às cavidades corporais por orifícios naturais (BRASIL, 2009).

Outra medida implantada pela ANVISA foi a adoção da RDC nº 33, de 16 de agosto de 2010, que proíbe o registro de novos produtos saneantes na categoria “esterilizantes” para aplicação sob a forma de imersão (BRASIL, 2010).

1.5 JUSTIFICATIVA

Priorizar a saúde foi o objetivo destacado a partir da criação da Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, a Lei Orgânica da Saúde que regulamenta o Sistema Único de Saúde – SUS, onde fica definido que a promoção, a proteção e recuperação da saúde é um dever do Estado, cabendo a ele assegurar condições para garantir o bem-estar da população e controlar situações de risco para a saúde pública. Nessa Lei também fica definido o conceito de Vigilância Sanitária como um conjunto de ações capaz de prevenir, diminuir ou eliminar riscos à saúde, abrangendo o “controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde” (COSTA; ROZENFELD, 2001, BRASIL, 1990).

Segundo a Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, é de competência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, executar e acompanhar as políticas, diretrizes e ações de vigilância sanitária, estabelecendo normas e coordenando o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999).

Assim, os recentes surtos de infecções por MCR no país junto à falta de elucidação sobre a fonte real de contaminação por esses micro-organismos levaram a ANVISA a publicar resoluções citadas anteriormente, a fim de auxiliar na

prevenção e no controle dessas doenças. Portanto, são imprescindíveis estudos que analisem o comportamento dessas micobactérias de crescimento rápido envolvidas nos casos de infecções, principalmente o clone BRA100 pertencente à espécie *M. massiliense*, já que este é o clone predominante em todo o território nacional. Além disso, esta MCR foi inserida como micro-organismo de referência na legislação pertinente à comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o comportamento de *M. massiliense* provenientes de surto e pertencentes ao mesmo clone frente aos desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído, a fim de dar subsídios aos ensaios oficiais quanto à adaptação da metodologia utilizando essa MCR.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade micobactericida dos desinfetantes à base de glutaraldeído, de ácido peracético e de ortoftalaldeído por meio do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida, conforme Procedimento Operacional Padronizado (POP) INCQS nº 65.3210.004, utilizando *M. bovis* cepa BCG Moreau e *M. massiliense* INCQS 00594, como cepas de referência preconizadas pela legislação vigente;
- Verificar a suscetibilidade de MCRs aos desinfetantes, incluindo cepas de *M. massiliense* do clone BRA100, provenientes de surto epidêmico ocorrido no Rio de Janeiro, e cepas de referência de outras espécies, através do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida conforme POP INCQS nº 65.3210.004;
- Subsidiar a adaptação do Método Confirmatório para Avaliar a Atividade Micobactericida (POP INCQS nº 65.3210.004) de desinfetantes utilizando cepa de *M. massiliense* preconizada pela legislação vigente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas as cepas *Mycobacterium bovis* INCQS 00062 (BCG Moreau), que é a bactéria de referência de crescimento lento preconizado no Método para Avaliação da Atividade Micobactericida de desinfetantes pela *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC) (TOMASINO, 2006), e *M. massiliense* INCQS nº 00594, que foi incluída na metodologia estabelecida pelo INCQS, e aceita oficialmente, para avaliar a qualidade dos desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos de acordo com a recente publicação da RDC nº 33, de 16 de agosto de 2010 (BRASIL, 2010). Essa cepa foi depositada no INCQS em 2010 e foi proveniente de um surto ocorrido no Pará. 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. As cinco cepas clínicas de *M. massiliense* estudados, pertencentes ao mesmo clone, BRA100 (CRM 0001, CRM 0002, CRM 0018, CRM 0019, CRM 0020) foram provenientes de surto epidêmico ocorrido em hospitais do Rio de Janeiro entre 2006 e 2007, e foram caracterizados e identificados através de métodos fenotípicos e genotípicos pelo Laboratório de micobactérias, do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG) / UFRJ, e pelo Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC) / FIOCRUZ (**TABELA 2**).

As cepas de referência de micobactérias de crescimento rápido e as cinco cepas clínicas de *M. massiliense* foram cedidas pelo Laboratório de Micobactérias do IMPPG/UFRJ.

TABELA 2. Dados sobre as cinco cepas de *Mycobacterium massiliense*

CRM	Tipo de Procedimento	Hospital	ID recebida	<i>rpoB</i>	<i>hsp65</i>
0001	Colecistectomia	Privado	<i>M. abscessus</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>
0002	Colecistectomia	Privado	<i>M. abscessus</i>	<i>M. massiliense</i>	
0018	Colecistectomia	Público	<i>M. abscessus</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>
0020	Colecistectomia	Público	<i>M. abscessus</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>
0019	Ressecção de Tumor Cístico	Público	<i>M. abscessus</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>

M, *Mycobacterium*; ID, identificação.

3.2 DESINFETANTES

Foram utilizados sete desinfetantes distribuídos entre três diferentes princípios ativos, sempre na concentração recomendada pelo fabricante do produto:

- Três produtos à base de glutaraldeído, sendo dois da mesma marca com lotes diferentes, que foram denominadas Glutaraldeído A e Glutaraldeído A1, os quais foram ativados imediatamente antes do ensaio, obedecendo à recomendação de uso do fabricante. O terceiro produto pertence à outra marca e foi denominada Glutaraldeído B e é comercializado pronto para uso, sem necessidade de ativar;
- Três produtos contendo ácido peracético em suas formulações, sendo dois pertencentes à mesma marca com lotes distintos, denominados Ácido peracético A e Ácido peracético A1. O produto com marca diferente foi denominado Ácido peracético B;
- Um produto a base de ortoftalaldeído.

TABELA 3. Dados sobre a análise do teor dos produtos estudados

Análise química do teor (POP INCQS nº 65.3110.026)		
Produtos	Teor	Faixa de aprovação
Glutaraldeído A	81%	± 15%
Glutaraldeído A1	83%	± 15%
Glutaraldeído B	89%	± 15%
Ácido peracético A	NR	-
Ácido peracético A1	250%	± 15%
Ácido peracético B	102%	± 10%
OPA	22%	± 15%

NR, Não realizado; OPA, Ortoftalaldeído.

3.3 MANUTENÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS

3.3.1 Manutenção de *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau

O conteúdo de uma ampola contendo o micro-organismo liofilizado foi reconstituído com aproximadamente 0,5 mL de meio Middlebrook 7H9. Alíquotas de 0,2 mL foram transferidas para três tubos contendo ágar Middlebrook 7H9 inclinado. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 20 dias. Após esse tempo, foi verificada a pureza da cultura e realizado o estoque mantido a $2-5^\circ \text{C}$. No caso de contaminação, a cultura seria desprezada e nova ampola com o micro-organismo liofilizado seria aberta novamente.

A manutenção da cultura estoque foi realizada a partir de repiques mensais em três tubos contendo ágar Middlebrook 7H9 inclinado; o repique permaneceu incubado por 20 dias a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ e estocado a $2-5^\circ \text{C}$.

A cultura estoque foi renovada a cada 6 meses com a abertura de uma nova ampola contendo o micro-organismo liofilizado (TOMASINO, 2006, INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.3.2 Manutenção de *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594

O conteúdo de uma ampola contendo o micro-organismo liofilizado foi reconstituído com aproximadamente 0,5 mL de meio Middlebrook 7H9 e alíquotas de 0,2 mL foram transferidas para três tubos com ágar Löwestein-Jensen inclinado. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por um período entre 5 e 7 dias. Após verificação da pureza, esses tubos foram mantidos a $2-5^\circ \text{C}$.

A manutenção da cultura estoque foi realizada a partir de repiques mensais em três tubos com ágar Löwestein-Jensen, incubando os tubos a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por um período entre 5 e 7 dias; o estoque foi mantido a $2-5^\circ \text{C}$.

A cultura estoque foi renovada a cada 6 meses com a abertura de uma nova ampola contendo o micro-organismo liofilizado (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.3.3 Manutenção das cepas do *American Type Culture Collection*, das Micobactérias de Crescimento Rápido e das cepas clínicas de *Mycobacterium massiliense*

A manutenção mensal foi realizada a partir da inoculação de uma alçada do micro-organismo estoque em um tubo contendo 1mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato onde foram acrescentadas pérolas de vidro. O conteúdo deste tudo foi agitado em vórtex e uma alíquota de 0,2 mL dessa suspensão foi transferida para um tubo contendo meio Löwestein-Jensen que permaneceu incubado por 7 dias a $36 \pm 1^\circ \text{C}$.

A manutenção em glicerol foi realizada a partir da transferência de uma alçada do micro-organismo estoque para um tubo contendo pérolas de vidro, que foi levado a agitação por 15 segundos no vórtex. Uma alíquota de 4 mL de tampão Glicerol 15% pH 7,4 foi adicionada ao tubo e novamente levado a agitação. A suspensão permaneceu em repouso durante 10 minutos, sendo distribuídas posteriormente alíquotas de 1,2 mL para criotubos que foram estocados a -20°C e -70°C .

3.4 MÉTODO CONFIRMATÓRIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBACTERICIDA DOS DESINFETANTES

3.4.1 Preparo da cultura teste de *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau

A partir da cultura estoque, foram inoculados 10 tubos contendo 10 mL de caldo Proskauer-Beck modificado e esses tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 21-25 dias. Após esse período, foram adicionados, em cada tubo, 1 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato 80 estéril e pérolas de vidro estéreis, o conteúdo foi homogeneizado em agitador de tubos. Essa suspensão foi transferida para tubos de 25 mm x 150 mm, sendo deixada em repouso para que as partículas maiores sedimentassem. O sobrenadante foi transferido para erlenmeyer de 250 mL e a suspensão foi ajustada a 20% de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm, utilizando o mesmo meio de cultura. Essa suspensão bacteriana final foi utilizada para contaminar os cilindros de porcelana (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.4.2 Preparo da cultura teste de *Mycobacterium massiliense* INCQS nº 00594

A partir da cultura estoque, foram inoculados de 5 a 6 tubos contendo 10 mL de caldo Proskauer-Beck modificado e esses tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5-7 dias. Após esse período, foram adicionados aos tubos pérolas de vidro estéreis para, então, serem homogeneizados em agitador de tubos. O mesmo procedimento foi posteriormente realizado para a cultura teste *M. bovis* (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.4.3 Realização do Método

A avaliação da eficácia dos desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído foi verificada através do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, segundo a AOAC (TOMASINO, 2006) e o POP INCQS nº 65.3210.004 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a). Quinze a vinte mL da suspensão a 20% de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm, da cultura do micro-organismo teste (*M. bovis* cepa INCQS nº 00062 (BCG Moreau) e *M. massiliense*

INCQS nº 00594), anteriormente preparada, foram empregados para contaminar 10-12 cilindros de porcelana durante 15 minutos. Após esse tempo, os cilindros foram transferidos, com auxílio de um gancho flambado, e colocados verticalmente em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro e levados a incubação em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, para secagem. No ensaio propriamente dito, a intervalos de tempos de 1 minuto, cada um dos dez cilindros foi transferido, de forma cronometrada, para cada um dos 10 tubos contendo o desinfetante a ser testado. Após 30 minutos de contato com o desinfetante, os cilindros foram transferidos, obedecendo ao mesmo intervalo de tempo (1 minuto entre cada transferência), para os respectivos tubos contendo 10 mL de soro de cavalo e depois para os tubos contendo 20 mL de caldo Proskauer-Beck (PB) modificado. A partir do tubo contendo soro de cavalo foram retiradas alíquotas de 4 mL, das quais 2mL foram transferidos para dois meios de subcultura adicionais: meio Middlebrook 7H9 e meio de Kirchners (K), distribuídos em porções de 20 mL (**FIGURA 3**). Os tubos contendo os meios de cultura (caldo Proskauer-Beck modificado, meio Middlebrook 7H9 e meio de Kirchner) foram incubados inicialmente por 60 dias em estufa a 37°C , e no caso de ausência de crescimento ou crescimento tênue, os tubos eram re-incubados por um tempo adicional de 30 dias (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.4.4 Controle da resistência do micro-organismo

A resistência do micro-organismo foi determinada frente às soluções de fenol 1:75 e 1:50, preparadas a partir da solução estoque de fenol a 5%, utilizando-as no ensaio de acordo com o procedimento semelhante ao realizado com os desinfetantes (item 3.4), alterando porém o tempo de contato para 10 minutos.

Critério de avaliação: o micro-organismo 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 micro-organismo foi considerado resistente, sensível ou dentro do padrão desejado.

3.4.5 Controles de esterilidade

Todo material utilizado no ensaio foi analisado quanto a sua esterilidade conforme descrito abaixo:

- Esterilidade dos cilindros de porcelana

Um cilindro estéril, do lote utilizado no ensaio, foi adicionado a um tubo contendo caldo Proskauer-Beck modificado e incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60 – 90 dias, conforme descrito no procedimento do ensaio. Não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

- Esterilidade dos meios de cultura PB, K e 7H9

A esterilidade dos meios de cultura foi verificada através da incubação de um tubo de cada meio de cultura, a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio e não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

- Esterilidade da água purificada

Uma alíquota de 0,2 mL da água purificada utilizada para diluir o desinfetante e/ ou preparar as soluções de fenol foi adicionada a um tubo contendo caldo Proskauer-Beck modificado e incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio, e não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

- Esterilidade da solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato

Uma alíquota de 0,2 mL da solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato, utilizada no preparo da suspensão bacteriana da cultura teste, foi

adicionada a um tubo contendo caldo Proskauer-Beck modificado e incubado a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio, e não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

- Esterilidade dos lotes de pipetas

Com o auxílio de um pipetador automático, uma pipeta de cada lote utilizado no ensaio foi utilizada para aspirar o caldo Proskauer-Beck modificado contido no tubo de ensaio, até acima da marcação da graduação e recolocado no tubo. Esse procedimento foi repetido três vezes e os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio, e não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

- Esterilidade do soro de cavalo

Uma alíquota de 2 mL de soro de cavalo estéril foi inoculada em um tubo de cada um dos meios de cultura. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio, e não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.4.6 Controle da viabilidade dos meios de cultura PB, K, 7H9 em relação a *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau

Um cilindro contaminado e seco foi adicionado a cada meio de cultura utilizado no ensaio. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio. Após esse tempo de incubação a evidência de crescimento deve ser observada (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.4.7 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 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009a).

3.4.8 Interpretação dos resultados

O desinfetante deve ser capaz de matar o micro-organismo 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).

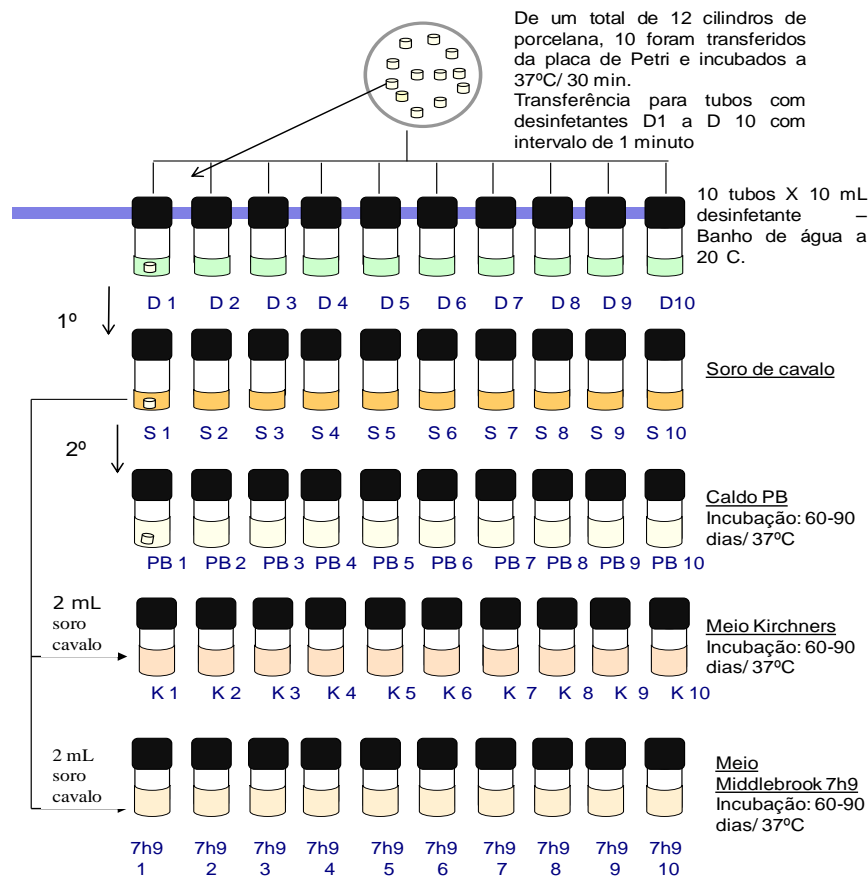


FIGURA 3. Esquema da transferência dos cilindros entre os tubos utilizados no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida, da Association of Official Analytical Chemists (AOAC), conforme descrito no Procedimento Operacional Padronizado – POP INCQS nº 65.3210.004. D1 a D10, tubos numerados de 1 a 10 contendo desinfetante; S1 a S10, tubos numerados de 1 a 10 contendo o neutralizante (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 Kirchner; 7h9 1 a 7h9 10, tubos numerados de 1 a 10 contendo meio Middlebrook 7H9.

3.5 TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

No caso de ocorrer crescimento, esta técnica foi utilizada para confirmar a presença de BAAR. Uma alçada do micro-organismo foi transferida para a superfície de uma lâmina limpa e desengordurada. Após a secagem, o material foi fixado por meio de 04 passagens lentas em chama de bico de Bunsen. A lâmina foi coberta com solução de fucsina fenicada e aquecida até a emissão de vapores, com cuidado para não ferver. Após esse procedimento, a lâmina foi lavada abundantemente com água corrente e descorada com solução de álcool-ácido, lavando novamente com água corrente. Cobriu-se a lâmina com solução de azul de metileno por aproximadamente 30 segundos, lavando em seguida com água corrente e secando à temperatura ambiente. As micobactérias se apresentam coradas em vermelho pela fucsina, contra um fundo azul claro (KANTOR, 1979).

3.6 AVALIAÇÃO DO TEOR DOS PRODUTOS

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).

3.7 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO AOS DESINFETANTES

3.7.1 Procedimento do ensaio

Foi realizado conforme descrito no item 3.4 Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida dos Desinfetantes, utilizando como micro-

organismos teste *M. chelonae* ATCC 35572, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. abscessus* ATCC 19977 e as cepas clínicas de *M. massiliense* CRM 0001, CRM 0002, CRM 0018, CRM 0019, CRM 0020.

3.7.2 Controles de esterilidade

Os controles de esterilidade dos cilindros de porcelana, dos meios de cultura PB, K e 7H9, da solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato, dos lotes de pipetas, da água purificada estéril e do soro de cavalo foram realizados conforme descrito no item 3.4 Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida dos Desinfetantes.

3.7.3 Controle de viabilidade dos meios de cultura PB, K e 7H9

O controle de viabilidade dos meios de cultura PB, K, 7H9 foi realizado para cada uma das cepas ATCC de MCR e para as cepas clínicas de *M. massiliense*, conforme descrito no item 3.4 Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida dos Desinfetantes.

3.7.4 Controle da resistência das cepas do *American Type Culture Collection* de Micobactérias de Crescimento Rápido e das cepas clínicas de *Mycobacterium massiliense*

Para cada uma das MCRs de referência e cepas clínicas de *M. massiliense* foi realizado o ensaio de controle da resistência frente às soluções de fenol, conforme descrito no item 3.4 Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida dos Desinfetantes.

A leitura dos resultados e suas interpretações foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 3.4 Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida dos Desinfetantes, sendo confirmada a presença de BAAR, em caso de crescimento, pela mesma técnica, a coloração de Ziehl-Neelsen.

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

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA DOS DESINFETANTES À BASE DE GLUTARALDEÍDO, DE ÁCIDO PERACÉTICO E DE ORTOFTALALDEÍDO ATRAVÉS DO MÉTODO CONFIRMATÓRIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICOBACTERICIDA

4.1.1 Produtos à base de Glutaraldeído a 2%

Na avaliação da atividade micobactericida do Glutaraldeído A, foi observado crescimento de *M. bovis* em um tubo de cada meio de cultura (Proskauer-Beck modificado, Kirchnners e Middlebrook 7H9), porém a micobactéria se mostrou sensível na avaliação da resistência frente às diluições do fenol. Foi necessária, então, a repetição do ensaio e o crescimento observado foi de 2 tubos de cada meio de cultura, perfazendo um total de 6 tubos entre os 30 tubos empregados, entretanto o micro-organismo continuou apresentando comportamento sensível frente ao fenol (**TABELAS 4 e 4A**). Não foi realizada a avaliação da atividade micobactericida deste produto frente a *M. massiliense* INCQS nº00594. Como a resolução, que incluiu esta bactéria como cepa obrigatória na comprovação da eficácia antimicrobiana, foi publicada recentemente, não foi possível realizar este experimento, pois além da cepa INCQS nº 00594 ter sido depositada há poucos meses na Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS, já não havia quantidade suficiente do produto do mesmo lote para realização deste experimento. Na análise do teor do princípio ativo, o produto se apresentou insatisfatório, já que o resultado foi de apenas 81% do declarado (**TABELA 4**). De acordo com os dados apresentados na **TABELA 4**, durante a avaliação da atividade micobactericida do produto Glutaraldeído A1 utilizando *M. bovis*, não houve crescimento no primeiro ensaio realizado, porém este foi repetido já que a bactéria se mostrou sensível frente ao fenol. No segundo ensaio, então, o micro-organismo continuou apresentando sensibilidade frente às diluições de fenol, porém o produto não foi capaz de destruí-lo, ocorrendo crescimento em 7 tubos do caldo Proskauer-Beck, 7 tubos do meio de Kirchnners e em 6 tubos do meio Middlebrook 7H9 (**TABELA 4A**). Na avaliação da atividade

micobactericida desse mesmo produto utilizando a cepa INCQS nº 00594 de *M. massiliense*, foi observado crescimento em todos os 30 tubos de meio de cultura empregados, verificando assim um micro-organismo altamente tolerante ao produto (**TABELA 5**). Além disso, na análise do teor do princípio ativo, o resultado foi de 83% do declarado, tornando-o insatisfatório, conforme indicado na **TABELA 4**.

Em contrapartida, o Glutaraldeído B foi o único desinfetante à base de glutaraldeído que apresentou resultado satisfatório em relação à análise do teor (89% do declarado). Porém quando sua atividade micobactericida foi avaliada, o produto não foi capaz de eliminar *M. bovis*. No primeiro ensaio, de acordo com os dados da **TABELA 4**, houve crescimento em um tubo contendo Proskauer-Beck e em um tubo com meio Middlebrook 7H9. Durante a repetição o número de tubos positivos foi ainda maior, ocorreu crescimento em 4 tubos de cada meio de cultura, mesmo diante do comportamento sensível da micobactéria frente ao fenol (**TABELA 4A**). Utilizando *M. massiliense* para essa análise, o crescimento foi observado nos 30 tubos de meio de cultura empregados, semelhante ao ocorrido nas análises com o produto Glutaraldeído A1 (**TABELA 5**).

Os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

4.1.2 Produtos à base de Ácido peracético

Os desinfetantes contendo ácido peracético demonstraram eficácia frente ao *M. bovis* INCQS nº00062 (BCG Moreau) e *M. massiliense* INCQS nº 00594, com exceção do Ácido peracético A, cuja avaliação da atividade micobactericida não foi realizada com *M. massiliense*, pelo mesmo motivo exposto para o Glutaraldeído A. O Ácido peracético A e o Ácido peracético A1 pertencem à mesma marca, porém provêm de lotes diferentes. A realização do estudo com outro produto de mesma marca ocorreu devido à falta de dados com relação ao teor do princípio ativo do primeiro produto e também porque todos os micro-organismos analisados se mostraram sensíveis frente às diluições de fenol, gerando incertezas sobre a real eficácia do produto, já que este poderia estar agindo devido à sensibilidade das cepas. Com relação ao Ácido peracético B, foram realizados dois ensaios com *M.*

massiliense em dias diferentes. No primeiro teste foi observado crescimento da micobactéria, conforme dados mostrados na **TABELA 5**, então um novo ensaio foi proposto alterando o tempo de contato do micro-organismo com o produto para uma hora, em vez de 30 minutos. Neste segundo experimento, o micro-organismo foi destruído, não ocorrendo crescimento em nenhum tubo. Com relação à análise do teor desses produtos, somente o Ácido peracético B foi satisfatório (102% do declarado), já o mesmo não ocorreu com o Ácido peracético A1 que apresentou um desvio na qualidade, com um resultado de 250% do declarado (**TABELA 4**).

Foram realizados todos os controles de esterilidade e viabilidade, obtendo-se resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela técnica.

4.1.3 Produto à base de Ortoftalaldeído

De acordo com os dados apresentados na **TABELA 4**, foi necessário repetir o ensaio utilizando *M. bovis* INCQS nº00062 (BCG Moreau) para avaliação da atividade micobactericida do produto contendo ortoftalaldeído (OPA), já que no primeiro teste o micro-organismo se apresentou sensível no controle da resistência frente às diluições do fenol. Na repetição, não foi observado crescimento em nenhum dos tubos contendo os meios de cultura, porém ainda assim o micro-organismo não se comportou dentro do padrão no controle de resistência frente ao fenol (**TABELA 4A**). O mesmo não ocorreu no ensaio utilizando *M. massiliense* INCQS nº00594, onde a micobactéria apresentou comportamento dentro do padrão frente às diluições do fenol, porém o produto não eliminou a micobactéria, já que foi observado crescimento em alguns tubos, conforme os dados mostrados na **TABELA 5**. Além disso, o produto apresentou resultado insatisfatório na análise do teor do princípio ativo, com apenas 22% do declarado (**TABELA 4**).

Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

TABELA 4. Avaliação da atividade micobactericida dos diferentes desinfetantes utilizando *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau

<i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau											
Produtos	Nº TUBOS POSITIVOS			FENOL 1:50			FENOL 1:75			Análise química do teor	
	Nº TUBOS POSITIVOS			Nº TUBOS POSITIVOS			Nº TUBOS POSITIVOS				
	<i>Meios de Cultura</i>			<i>Meios de Cultura</i>			<i>Meios de Cultura</i>				
	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>		
Glutaraldeído A	1	1	1	0	0	0	0	0	0	81%	Insatisfatório
Glutaraldeído A1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	83%	Insatisfatório
Glutaraldeído B	1	0	1	1	1	0	6	0	0	89%	Satisfatório
Ácido peracético A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NR	NR
Ácido peracético A1	0	0	0	0	0	0	6	0	0	250%	Insatisfatório
Ácido peracético B	0	0	0	0	0	0	6	0	0	102%	Satisfatório
OPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22%	Insatisfatório

NR, Não realizado; PB - Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9; OPA, Ortoftalaldeído; As linhas em negrito correspondem aos ensaios que foram repetidos.

TABELA 4A. Repetição dos ensaios de avaliação da atividade micobactericida dos produtos à base de Glutaraldeído e OPA, utilizando *Mycobacterium bovis* cepa BCG Moreau

<i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG Moreau(REPETIÇÃO)										
Produtos	Nº TUBOS POSITIVOS			FENOL 1:50			FENOL 1:75			Análise química do teor
	Nº TUBOS POSITIVOS			Nº TUBOS POSITIVOS			Nº TUBOS POSITIVOS			
	<i>Meios de Cultura</i>			<i>Meios de Cultura</i>			<i>Meios de Cultura</i>			
	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>	
Glutaraldeído A	2	2	2	0	0	0	0	0	0	81% Insatisfatório
Glutaraldeído A1	7	7	6	0	0	0	0	0	0	83% Insatisfatório
Glutaraldeído B	4	4	4	0	0	0	0	0	0	89% Satisfatório
OPA	0	0	0	0	0	0	6	0	0	22% Insatisfatório

NR, Não realizado; PB - Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9; OPA, Ortoftalaldeído

TABELA 5. Avaliação da atividade micobactericida dos diferentes desinfetantes utilizando *Mycobacterium massiliense* INCQS nº00594

<i>Mycobacterium massiliense</i>									
Produtos	Nº TUBOS POSITIVOS			FENOL 1:50			FENOL 1:75		
				Nº TUBOS POSITIVOS			Nº TUBOS POSITIVOS		
	<i>Meios de Cultura</i>			<i>Meios de Cultura</i>			<i>Meios de Cultura</i>		
	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>
Glutaraldeído A	NR			NR			NR		
Glutaraldeído A1	10	10	10	0	0	0	10	9	5
Glutaraldeído B	10	10	10	0	0	0	10	9	5
Ácido peracético A	NR			NR			NR		
Ácido peracético A1	0	0	0	0	0	0	10	10	10
Ácido peracético B	3	1	1	0	0	0	10	10	10
OPA	10	8	7	0	0	0	10	10	10

Repetição dos ensaios

Produto	Nº TUBOS POSITIVOS			FENOL 1:50			FENOL 1:75		
				Nº TUBOS POSITIVOS			Nº TUBOS POSITIVOS		
	<i>Meios de Cultura</i>			<i>Meios de Cultura</i>			<i>Meios de Cultura</i>		
	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>	<i>PB</i>	<i>K</i>	<i>7H9</i>
Ácido peracético B*	0	0	0	0	0	0	10	10	10

* Tempo de contato = 60 minutos; NR, Não realizado; PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9; OPA, Ortoftalaldeído

4.2 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO AOS DESINFETANTES

Quanto à verificação da suscetibilidade das MCRs frente aos produtos à base de glutaraldeído, *M. chelonae* foi eliminado pelos três desinfetantes, enquanto *M. fortuitum* por apenas dois desses, se classificando como médio tolerante, já que no ensaio utilizando o Glutaraldeído A houve crescimento do micro-organismo em 3 tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado, em 9 contendo meio de Kirchners e em um tubo com meio Middlebrook 7H9. Já *M. abscessus* se mostrou médio tolerante ao Glutaraldeído A, fracamente tolerante ao Glutaraldeído A1 e altamente tolerante ao Glutaraldeído B, de acordo com o número de tubos positivos. As cepas de *M. massiliense* pertencentes ao clone BRA100 apresentaram comportamento altamente tolerante aos três desinfetantes, uma vez que ocorreu crescimento nos trinta tubos de meios de cultura empregados no experimento, em um tempo de incubação inferior (15-20 dias) ao preconizado pela técnica para a primeira leitura. Nos testes utilizando o Glutaraldeído A, por exemplo, todas as cepas clínicas se mostraram sensíveis frente ao fenol e ainda assim, o produto não foi capaz de destruí-las (**TABELAS 6, 7 e 8**). Nas **FIGURAS 4, 5 e 6** estão representados graficamente o número de tubos de meio de cultura com crescimento positivo de acordo com cada um dos micro-organismos utilizados neste estudo frente aos produtos à base de glutaraldeído.

Os ensaios de esterilidade e viabilidade foram realizados em todos os ensaios com os diferentes desinfetantes e os resultados obtidos foram satisfatórios, de acordo com o preconizado pela metodologia.

TABELA 6. Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido e de *Mycobacterium bovis* frente ao produto denominado Glutaraldeído A

PRODUTO - GLUTARALDEÍDO A											
Ensaio Micobactericida					Controle do Micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50			FENOL 1:75			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. bovis</i> BCG Moreau	60 dias	1 / 2*	1 / 2*	1 / 2*	0	0	0	0	0	0	Sensível
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	60 dias	3	9	1	0	4	6	0	6	10	Fora do padrão
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	8	0	3	0	0	0	0	0	0	Sensível
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	60 dias	0	0	0	0	0	0	1	1	1	Sensível
CRM 0001	20 dias **	10	10	10	0	0	0	0	0	0	Sensível
CRM 0002	20 dias **	10	10	10	0	0	0	0	0	0	Sensível
CRM 0018	20 dias **	10	10	10	0	0	0	0	0	0	Sensível
CRM 0019	20 dias **	10	10	10	0	0	0	0	0	0	Sensível
CRM 0020	20 dias **	10	10	10	0	0	0	0	0	0	Sensível

*Ensaio realizado em dois dias diferentes; ** Ensaio que apresentou crescimento em todos os tubos antes dos 60 dias foram retirados da estufa e desprezados; PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9

TABELA 7. Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido e de *Mycobacterium bovis* frente ao produto denominado Glutaraldeído A1

PRODUTO - GLUTARALDEÍDO A1											
Ensaio Micobactericida					Controle do Micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50 Nº Tubos Positivos			FENOL 1:75 Nº Tubos Positivos			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. bovis</i> BCG Moreau	60 dias	0 / 7*	0 / 7*	0 / 6*	0 / 0*	0 / 0*	0 / 0*	1 / 0*	1 / 0*	0 / 0*	Sensível
<i>M. massiliense</i> INCQS 00594	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	9	5	Fora do padrão
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	4	3	Fora do padrão
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	3	1	0	0	0	0	2	0	1	Sensível
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	1	4	Sensível
CRM 0001	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	10	7	Fora do padrão
CRM 0002	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	8	10	Fora do padrão
CRM 0018	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
CRM 0019	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	2	0	Fora do padrão
CRM 0020	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	6	6	Fora do padrão

*Ensaio realizado em dois dias diferentes; ** Ensaio que apresentou crescimento em todos os tubos antes dos 60 dias foram retirados da estufa e desprezados; PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9

TABELA 8. Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido e de *Mycobacterium bovis* frente ao produto denominado Glutaraldeído B

PRODUTO - GLUTARALDEÍDO B											
Ensaio micobactericida					Controle do micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50			FENOL 1:75			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. bovis</i> BCG Moreau	60 dias	1 / 4*	0 / 4*	1 / 4*	1 / 0*	1 / 0*	0 / 0*	6 / 0*	0 / 0*	0 / 0*	Sensível
<i>M. massiliense</i> INCQS 00594	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	9	5	Fora do padrão
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	4	3	Fora do padrão
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	10	6	7	0	0	0	2	0	1	Sensível
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	1	4	Sensível
CRM 0001	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	10	7	Fora do padrão
CRM 0002	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	8	10	Fora do padrão
CRM 0018	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
CRM 0019	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	2	0	Fora do padrão
CRM 0020	15 dias **	10	10	10	0	0	0	10	6	6	Fora do padrão

*Ensaio realizado em dois dias diferentes; ** Ensaio que apresentou crescimento em todos os tubos antes dos 60 dias foram retirados da estufa e desprezados; PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9

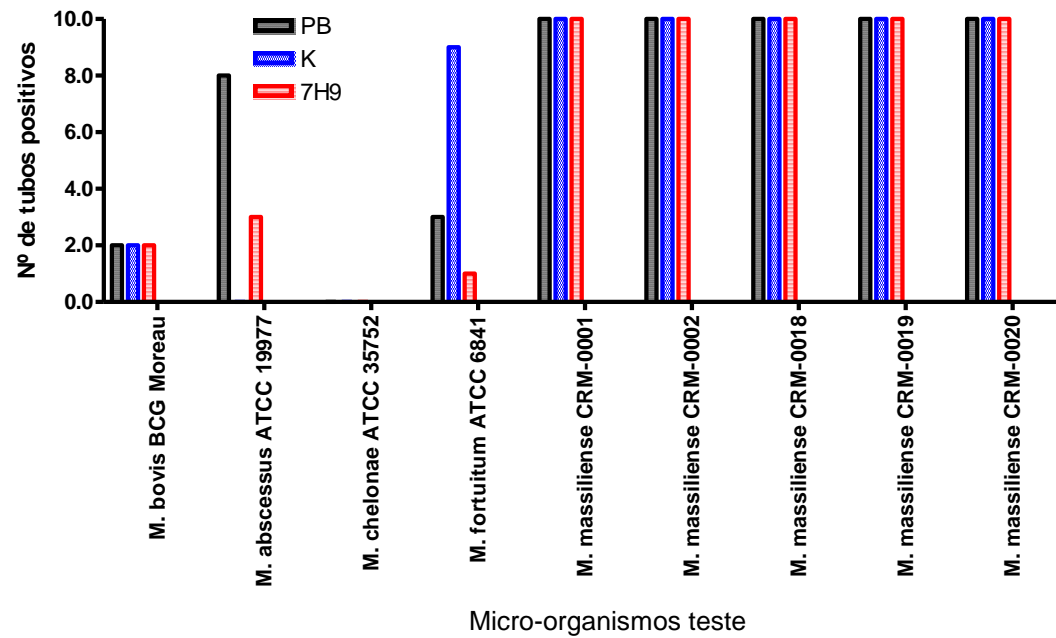


Figura 4. Atividade micobactericida do Glutaraldeído A frente aos micro-organismos empregados no estudo. PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, ATCC – American Type Culture Collection, M – *Mycobacterium*.

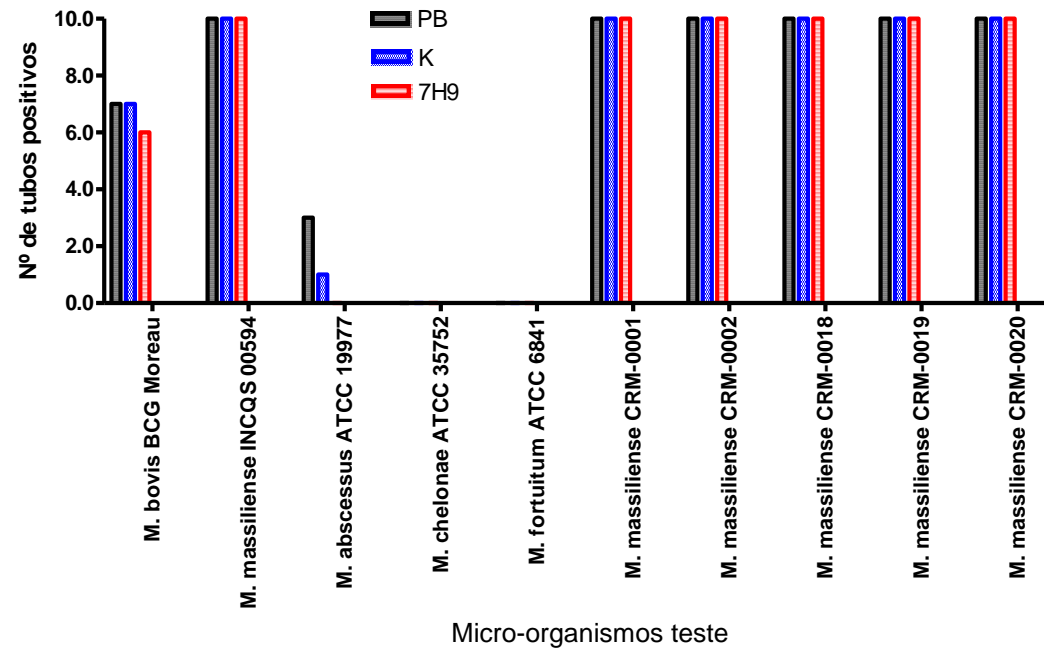


Figura 5. Atividade micobactericida do Glutaraldeído A1 frente aos micro-organismos empregados no estudo. PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, ATCC – American Type Culture Collection, M – *Mycobacterium*

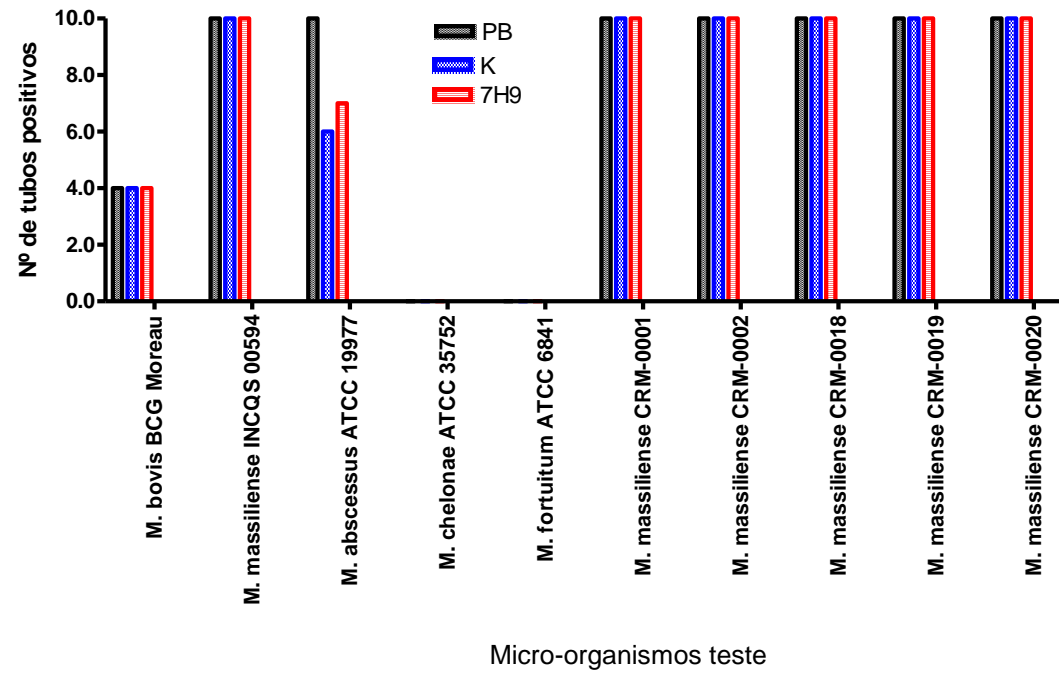


Figura 6. Atividade micobactericida do Glutaraldeído B frente aos micro-organismos empregados no estudo. PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, ATCC – American Type Culture Collection, M – *Mycobacterium*.

Com relação aos produtos contendo ácido peracético, conforme demonstrado nas **TABELAS 9, 10 e 11**, todas as micobactérias empregadas no estudo foram destruídas. Porém com o Ácido peracético A, todas se mostraram sensíveis no controle de resistência frente ao fenol, com exceção de *M. fortuitum*, que se apresentou resistente e ainda assim o produto foi capaz de eliminá-lo. Devido a essa sensibilidade no controle de resistência dos micro-organismos, foram realizados outros ensaios utilizando outro produto de mesma marca, mas de lote diferente, denominado Ácido peracético A1. Este produto foi eficaz até mesmo contra micobactérias que se mostraram resistentes frente ao fenol, porém é importante ressaltar seu resultado insatisfatório na avaliação do teor de princípio ativo (250% do declarado).

Quanto ao Ácido peracético B, as cepas de referência se mostraram sensíveis frente ao produto, porém houve a necessidade de um segundo ensaio para *M. abscessus*, que no primeiro se mostrou sensível frente ao fenol (**TABELA 11A**). Em contrapartida, nos testes com as cepas clínicas de *M. massiliense*, foi observado crescimento em um tubo contendo Proskauer-Beck nos ensaios com CRM 0001 e 0018 e em dois tubos com Proskauer-Beck e em um contendo Middlebrook 7H9 no ensaio com CRM 0019. Porém destaca-se o fato de que as duas últimas micobactérias se apresentaram resistentes frente ao fenol. As cepas CRM 0002 e CRM 0020 foram destruídas pelo produto. Houve necessidade de repetição dos ensaios em que se observou crescimento das cepas clínicas, onde CRM 0001, CRM 0018 e CRM 0019 se mostraram dessa vez sensíveis frente ao produto, mesmo havendo tolerância de CRM 0019 no controle de resistência frente às diluições de fenol (**TABELA 11A**).

Todos os ensaios de esterilidade e viabilidade foram realizados, apresentando resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

TABELA 9. Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido e de *Mycobacterium bovis* frente ao produto denominado Ácido peracético A

PRODUTO - ÁCIDO PERACÉTICO A											
Ensaio Micobactericida					Controle do Micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50 Nº Tubos Positivos			FENOL 1:75 Nº Tubos Positivos			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. bovis</i> BCG Moreau	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sensível
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	60 dias	0	0	0	0	4	6	0	6	10	Fora do padrão
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sensível
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	60 dias	0	0	0	0	0	0	1	1	1	Sensível
CRM 0001	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sensível
CRM 0002	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sensível
CRM 0018	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sensível
CRM 0019	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sensível
CRM 0020	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sensível

PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9

TABELA 10. Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido e de *Mycobacterium bovis* frente ao produto denominado Ácido peracético A1

PRODUTO - ÁCIDO PERACÉTICO A1											
Ensaio Micobactericida					Controle do Micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50 Nº Tubos Positivos			FENOL 1:75 Nº Tubos Positivos			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. bovis</i> BCG Moreau	60 dias	0	0	0	0	0	0	6	0	0	Sensível
<i>M. massiliense</i> INCQS00594	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	60 dias	0	0	0	0	0	0	7	1	1	Fora do padrão
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	0	0	0	0	0	0	3	1	1	Sensível
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	60 dias	0	0	0	0	0	0	3	7	7	Fora do padrão
CRM 0001	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
CRM 0002	60 dias	0	0	0	3	2	1	10	9	8	Fora do padrão
CRM 0018	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
CRM 0019	60 dias	0	0	0	9	5	4	10	10	10	Resistente
CRM 0020	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão

PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9

TABELA 11. Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido e de *Mycobacterium bovis* frente ao produto denominado Ácido peracético B

PRODUTO - ÁCIDO PERACÉTICO B											
Ensaio Micobactericida					Controle do Micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50 Nº Tubos Positivos			FENOL 1:75 Nº Tubos Positivos			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. bovis</i> BCG Moreau	60 dias	0	0	0	0	0	0	6	0	0	Sensível
<i>M. massiliense</i> INCQS00594	60 dias	3	1	1	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	60 dias	0	0	0	0	0	0	7	1	1	Fora do padrão
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Sensível
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	60 dias	0	0	0	0	0	0	3	7	7	Fora do padrão
CRM 0001	60 dias	1	0	0	0	0	0	10	7	8	Fora do padrão
CRM 0002	60 dias	0	0	0	1	0	0	9	7	9	Fora do padrão
CRM 0018	60 dias	1	0	0	5	3	4	10	10	10	Resistente
CRM 0019	60 dias	2	0	1	7	4	5	10	4	4	Fora do padrão
CRM 0020	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão

PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9; As linhas em negrito correspondem aos ensaios que foram repetidos.

TABELA 11A. Repetição dos ensaios da avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido e de *Mycobacterium bovis* frente ao produto denominado Ácido peracético B

PRODUTO - ÁCIDO PERACÉTICO B (Repetição)											
Ensaio Micobactericida					Controle do Micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50 Nº Tubos Positivos			FENOL 1:75 Nº Tubos Positivos			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. massiliense</i> INCQS00594	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	0	0	0	0	0	0	3	1	1	Sensível
CRM 0001	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
CRM 0018	60 dias	0	0	0	0	0	0	10	1	2	Fora do padrão
CRM 0019	60 dias	0	0	0	9	5	4	10	10	10	Resistente

PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9;

Na avaliação da suscetibilidade das micobactérias utilizando o produto contendo ortoftalaldeído (OPA), conforme a **TABELA 12**, *M. fortuitum* se mostrou fracamente tolerante ao produto, ocorrendo a presença de crescimento em dois tubos com Proskauer-Beck e em um contendo Middlebrook 7H9. *M. chelonae* se apresentou sensível frente ao desinfetante, porém esse mesmo comportamento foi observado frente ao fenol, havendo assim a necessidade da repetição do ensaio. No segundo ensaio o resultado foi o mesmo, mas com um aumento do número de tubos positivos frente à diluição 1:75 do fenol (**TABELA 12A**). Na verificação da suscetibilidade de *M. abscessus*, foram realizados três ensaios em dias diferentes, já que nos dois primeiros a MCR se comportou de maneira sensível frente ao fenol. No terceiro ensaio, foi observado crescimento da micobactéria em um tubo contendo caldo Proskauer-Beck e em um com Kirchners, se classificando como fracamente tolerante ao desinfetante, já o controle de resistência não se apresentou conforme o padrão, porém houve um aumento do número de tubos positivos na diluição 1:75 do fenol (**TABELAS 12, 12A e 12B**).

Quanto às cepas clínicas de *M. massiliense*, a CRM 0001 foi classificada como altamente tolerante ao produto, enquanto as cepas CRM 0002 e CRM 0020 se mostraram médio tolerantes, visto que foi observado crescimento em alguns tubos contendo os meios de cultura, em um período de 30 dias após a incubação do ensaio. As CRMs 0018 e 0019 também se apresentaram tolerantes, porém como o resultado do controle de resistência do micro-organismo não foi obtido dentro do padrão, ou seja, houve crescimento em tubos contendo os meios de cultura relacionados com a diluição 1:50 de fenol, indicando que a micobactéria estivesse resistente, esses ensaios foram então realizados novamente. No resultado final, essas cepas clínicas de *M. massiliense* foram classificadas como altamente tolerantes frente ao OPA (**TABELAS 12, 12A e 12B**).

Na **FIGURA 7** está representado graficamente o número de tubos de meio de cultura com crescimento positivo de acordo com cada um dos micro-organismos utilizados neste estudo frente ao OPA.

Os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados em todos os ensaios apresentados e foi obtido resultado satisfatório, conforme o preconizado pela metodologia.

TABELA 12. Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido e *M. bovis* frente ao Ortoftalaldeído

PRODUTO - ORTOFTALALDEÍDO											
Ensaio Micobactericida					Controle do Micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50 Nº Tubos Positivos			FENOL 1:75 Nº Tubos Positivos			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. bovis</i> BCG Moreau	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Sensível
<i>M. massiliense</i> INCQS00594	30 dias *	10	3	2	0	0	0	10	6	5	Fora do padrão
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	60 dias	2	0	1	0	0	0	7	1	1	Fora do padrão
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Sensível
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	60 dias	0	0	0	0	0	0	1	1	1	Sensível
CRM 0001	30 dias*	8	2	2	0	0	0	10	7	8	Fora do padrão
CRM 0002	30 dias *	5	0	1	0	0	0	9	7	9	Fora do padrão
CRM 0018	30 dias *	10	10	9	5	3	4	10	10	10	Resistente
CRM 0019	30 dias *	5	3	2	7	4	5	10	4	4	Fora do padrão
CRM 0020	30 dias *	7	1	0	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão

* Os ensaios continuaram incubados até o fim do tempo preconizado pela técnica; PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9; As linhas em negrito correspondem aos ensaios que foram repetidos.

TABELA 12A. Repetição dos ensaios da avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido e *M. bovis* frente ao Ortoftalaldeído

PRODUTO - ORTOFTALALDEÍDO (Repetição)											
Ensaio Micobactericida					Controle do Micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50 Nº Tubos Positivos			FENOL 1:75 Nº Tubos Positivos			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. bovis</i> BCG Moreau	60 dias	0	0	0	0	0	0	6	0	0	Sensível
<i>M. massiliense</i> INCQS00594	20 dias *	10	8	7	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Sensível
<i>M. chelonae</i> ATCC 35752	60 dias	0	0	0	0	0	0	3	7	7	Fora do padrão
CRM 0018	30 dias *	10	4	5	0	0	0	10	10	10	Dentro do padrão
CRM 0019	30 dias *	7	1	1	9	5	4	10	10	10	Resistente

* Os ensaios continuaram incubados até o fim do tempo preconizado pela técnica; PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9; As linhas em negrito correspondem aos ensaios que foram repetidos.

TABELA 12B. Repetição dos ensaios de avaliação da suscetibilidade da cepa de *M. massiliense* CRM 0019 e de *M. abscessus* ATCC 19977 frente ao Ortoftalaldeído

PRODUTO - ORTOFTALALDEÍDO (2ª Repetição)											
Ensaio Micobactericida					Controle do Micro-organismo						
Micro-organismos	Tempo de incubação até a 1ª leitura	Nº Tubos Positivos			FENOL 1:50 Nº Tubos Positivos			FENOL 1:75 Nº Tubos Positivos			Classificação do controle
		Meios de Cultura			Meios de Cultura			Meios de Cultura			
		PB	K	7H9	PB	K	7H9	PB	K	7H9	
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	1	1	0	0	0	0	3	1	1	Sensível
CRM 0019	30 dias *	9	3	2	0	0	0	10	9	8	Fora do padrão

* Os ensaios continuaram incubados até o fim do tempo preconizado pela técnica; PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9

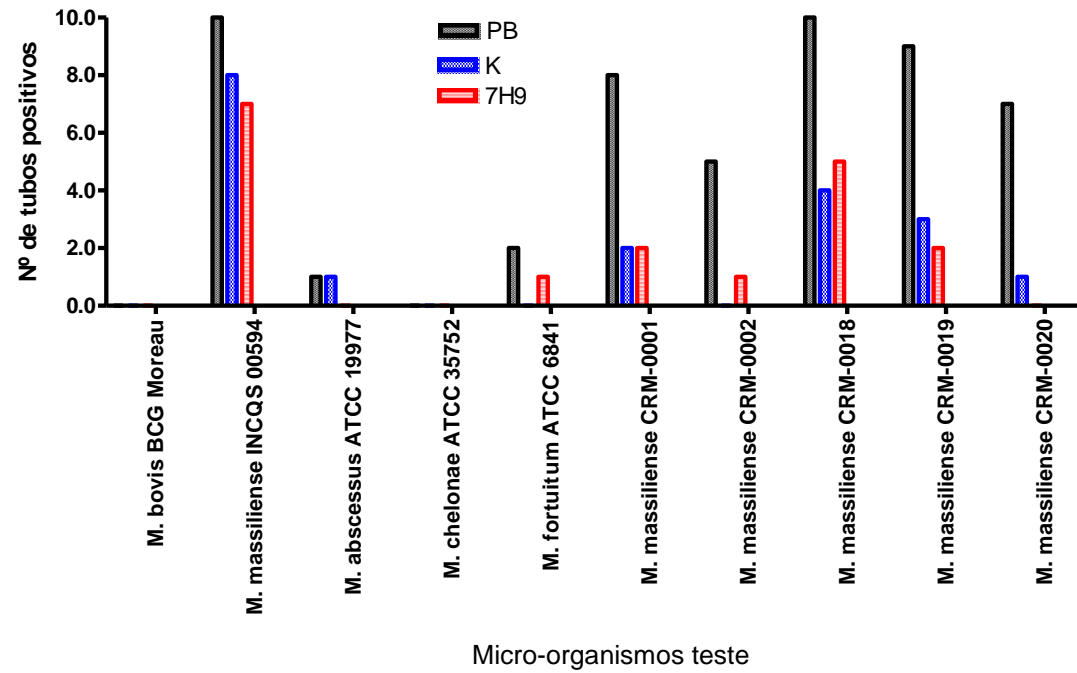


Figura 7. Atividade micobactericida do OPA frente aos micro-organismos empregados no estudo. PB – caldo Proskauer-Beck modificado, K – meio de Kirchners, 7H9 – meio Middlebrook 7H9, ATCC – American Type Culture Collection, M – *Mycobacterium*.

5 DISCUSSÃO

As Micobactérias de Crescimento Rápido estão amplamente distribuídas no ambiente e têm emergido como importantes patógenos causadores de doenças humanas, provocando inúmeros tipos de infecções como doenças cutâneas e infecções pulmonares (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002). Recentemente vários casos e surtos causados por MCR têm sido registrados no Brasil, relacionados em sua maioria com procedimentos cirúrgicos e estéticos, como videocirurgias, lipoaspiração, injeções subcutâneas de compostos sem registro com finalidade na área estética, implante de próteses mamárias e mesoterapia (HINRICHSEN, 2007).

Diante dos surtos ocorridos no país de infecções por *M. massiliense* pertencentes ao mesmo clone, clone BRA100 prevalente em todo território nacional, surtos esses relacionados principalmente às falhas nos processos de limpeza e desinfecção de produtos médicos (ANVISA, 2008), houve a necessidade da realização deste estudo em que um dos objetivos principais fosse a avaliação do comportamento dessas cepas clínicas frente a três diferentes tipos de desinfetantes hospitalares para artigos semi-críticos.

Uma das práticas de controle de infecções que auxiliam na prevenção de infecções nosocomiais é o uso de produtos antimicrobianos como antissépticos e desinfetantes (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Desinfetantes à base de glutaraldeído são ainda amplamente utilizados na desinfecção de alto nível de artigos médicos, porém vários relatos têm sido divulgados alertando sobre a tolerância de micobactérias a esse biocida (VAN KLINGEREN; PULLEN, 1993, GRIFFITHS et al., 1997, NOMURA et al., 2004).

Mais recentemente, estudos mostraram que cepas de *M. massiliense* pertencentes ao clone BRA100 apresentaram resistência a altas concentrações de glutaraldeído, em um tempo que varia entre 30 minutos e 10 horas de exposição da solução comercial do produto, o que pode estar contribuindo para a disseminação do micro-organismo tolerante ao biocida em diferentes hospitais (DUARTE et al., 2009, LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009).

No presente estudo, as cepas de *M. massiliense* clone BRA100 se comportaram altamente tolerantes à solução de glutaraldeído a 2%, quando aplicado o Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida, baseado na

utilização de cilindros carreadores, seguindo a metodologia oficial descrita no POP INCQS nº 65.3210.004. Tal tolerância foi observada frente aos três produtos à base de glutaraldeído, quando foi detectado crescimento em todos os tubos contendo os diferentes meios de cultura em um tempo curto (20 dias ou menos) de incubação do ensaio. O tempo preconizado pela técnica é de 60 dias e mais 30 dias em caso de não ocorrer crescimento ou este se apresentar tênue, pelo fato do crescimento de micobactérias acontecer num tempo maior quando comparado a outras bactérias.

Fato semelhante ocorreu quando a cepa de referência *M. massiliense* INCQS nº 00594 foi testada frente aos produtos Glutaraldeído A1 e B, onde os produtos não foram capazes de eliminar a micobactéria.

Lorena e colaboradores (2010) indicaram que a tolerância a altas concentrações de glutaraldeído é uma característica peculiar de *M. massiliense* pertencente ao clone BRA100, sugerindo que esse clone específico pode conter um mecanismo biológico de resistência não encontrado em outras cepas ou até mesmo em outras espécies.

Nos testes realizados no presente trabalho, a única cepa que se comportou de forma sensível frente aos três produtos à base de glutaraldeído a 2% foi *M. chelonae* ATCC 35572. O mesmo não ocorreu com *M. bovis* cepa BCG Moreau, *M. abscessus* ATCC 19977 e *M. fortuitum* ATCC 6841, já que não foram eliminados totalmente, como determina a técnica oficial.

Tais resultados se apresentam em concordância com vários estudos citados anteriormente, sugerindo que cepas altamente tolerantes ao glutaraldeído estão disseminadas em ambientes hospitalares e estão presentes, principalmente, nos surtos de infecções por *M. massiliense* após procedimentos invasivos, já que o clone BRA100 se apresenta altamente tolerante a esse desinfetante (VAN KLINGEREN; PULLEN, 1993, GRIFFITHS et al., 1997, DUARTE et al., 2009).

O mecanismo de tolerância dessas micobactérias ao glutaraldeído não está elucidado, porém um fator relacionado à resistência podem ser as mudanças na superfície da parede celular bacteriana, resultando na diminuição da ligação ou penetração do biocida na mesma. E o uso difundido de glutaraldeído em ambientes hospitalares pode resultar na seleção de bactérias resistentes a drogas e desinfetantes (SVETLÍKOVÁ et al., 2009).

O glutaraldeído a 2% sempre foi muito utilizado para desinfecção de endoscópios e, na prática, faz-se o reuso da solução por até 14 dias, o que pode

gerar numa diminuição de até 50% da concentração e, conseqüentemente, numa menor atividade micobactericida (PHILLIPS; VON REYN, 2001). Além disso, sem uma limpeza adequada, os equipamentos médicos podem acumular material orgânico, possibilitando a formação de biofilmes e, conseqüentemente, prejudicando a ação do biocida (VIANA-NIERO et al., 2008).

Cepas tolerantes a glutaraldeído representam situação de emergência em saúde pública, já que essas cepas estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência cruzada a vários antibióticos, inclusive aos que são usados no tratamento de infecções por MCR (SVETLÍKOVÁ et al., 2009). Apesar disso, essa técnica de desinfecção com glutaraldeído ainda é empregada, já que a RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009, não suspende o uso desse produto para o instrumental óptico utilizado nos procedimentos endoscópicos (BRASIL, 2009).

Sabe-se também que o uso regular de um mesmo desinfetante pode selecionar e, conseqüentemente, possibilitar a proliferação de micobactérias que sejam resistentes a esse agente (GRIFFITHS et al., 1997). Além disso, problemas relacionados à formulação dos produtos foram observados no presente estudo, já que foi detectado um desvio na qualidade com relação ao teor de princípio ativo dos desinfetantes Glutaraldeído A e A1, para os quais resultados insatisfatórios foram apresentados mesmo sendo da mesma marca.

Outros dois desinfetantes hospitalares indicados para desinfecção de artigos semicríticos são o ácido peracético e o OPA (MCDONNELL, 1999; BLOCK, 2001). Um estudo recente sugere como alternativa imediata para a prevenção de novos surtos a substituição do glutaraldeído por um desses dois produtos no processo de desinfecção de alto nível, já que foi observada suscetibilidade das cepas clínicas de *M. massiliense* do clone BRA100 aos desinfetantes à base de glutaraldeído, quando um teste em suspensão foi aplicado, com tempos de 15 e 30 minutos de contato do micro-organismo com o desinfetante (LORENA et al., 2010). Walsh, Maillard e Russell (1999) já haviam também sugerido essa substituição, uma vez que o OPA consegue inativar cepas resistentes ao glutaraldeído.

Outro estudo também comparou a atividade micobactericida do OPA e do glutaraldeído e concluiu que o primeiro produto se mostrou mais eficiente, quando comparado ao glutaraldeído, contra micobactérias num teste quantitativo em suspensão na concentração de 0,5% (p/v) (FRAUD; MAILLARD; RUSSELL, 2001). O ortoftalaldeído apresenta molécula de caráter lipofílico, o que sugere facilitar a

penetração do biocida na parede celular, diminuindo a probabilidade de uma redução na concentração efetiva do produto e, conseqüentemente, sua ação (FRAUD et al., 2003).

Porém os micro-organismos teste em outros trabalhos têm se mostrado suscetíveis ao OPA a 0,5% quando é utilizado o teste em suspensão, onde o produto entra em contato direto com a bactéria. Quando o teste com carreador é aplicado, o mesmo não ocorre (WALSH; MAILLARD; RUSSELL, 1999). No teste com carreador, as bactérias permanecem mais aderidas a uma superfície, se tornando menos acessíveis aos biocidas quando comparadas a uma suspensão homogênea, composta pelo produto analisado e o micro-organismo, como ocorre no teste em suspensão (FRAUD; MAILLARD; RUSSELL, 2001).

Esse fator poderia explicar os diferentes resultados apresentados no presente estudo. Já que todas as cepas clínicas de *M. massiliense* testadas foram tolerantes ao OPA. Cabe ressaltar que pertencem ao mesmo clone analisado por Lorena e colaboradores (2010), clone BRA100. Por outro lado, o lote do produto utilizado apresentou um desvio significativo na qualidade, onde o teor do princípio ativo real era de apenas 22% do declarado pelo fabricante. O que pode representar uma forma de ameaça à saúde coletiva, já que lotes de desinfetantes que se apresentam fora dos padrões de qualidade exigidos podem estar sendo utilizados em ambientes ligados à saúde.

Desenvolver novas estratégias para desinfecção de alto nível é importante para evitar o surgimento de novas cepas resistentes. Uma possível alternativa que alguns estudos têm sugerido é a utilização de desinfetantes que contenham ácido peracético em suas formulações. Para Phillips e Von Reyn (2001), o ácido peracético é um agente que tem se apresentado eficiente na desinfecção de equipamentos médicos, como os endoscópios.

Estudos mostram que o tratamento diário de instrumentos com solução de glutaraldeído a 2% induz ao acúmulo e/ou a fixação de proteínas presentes no artigo a sofrer desinfecção. Situação similar foi observada com o uso de desinfetantes à base de ortoftalaldeído, porém com um menor grau. Já para os produtos que contêm ácido peracético, a fixação ou acúmulo de proteínas pode ocorrer, porém são incomparáveis aos outros dois desinfetantes, sendo muito inferior. Devido a esses dados, na França, é recomendada a substituição de desinfetantes à base de glutaraldeído por aqueles que contêm ácido peracético e foi sugerido que se

destaque a importância da completa limpeza prévia dos artigos (PINEAU et al., 2008).

No presente estudo, de acordo com os resultados apresentados nas **Tabelas 9, 10, 11 e 11A**, tanto as cepas de MCR de referência como as cepas clínicas de *M. massiliense* se mostraram sensíveis frente aos desinfetantes que contêm ácido peracético em suas formulações. Porém no primeiro ensaio da avaliação da qualidade do produto denominado Ácido peracético B, utilizando a cepa de referência *M. massiliense* INCQS nº00594, foi observado crescimento do microorganismo em 3 tubos contendo caldo Proskauer-Beck e em um tubo de cada meio adicional (Kirchners e Middlebrook 7H9), na repetição desse ensaio houve variação no tempo de contato para uma hora e, então, não foi observado crescimento (**TABELAS 11 e 11A**). Vale ressaltar que dentre os três produtos testados, somente este último (Ácido peracético B) apresentou resultado satisfatório durante a avaliação do teor. Na análise do Ácido peracético A1, o teor foi de 250% do declarado pelo fabricante, gerando dúvidas quanto a sua real eficácia frente às micobactérias.

Stanley (1999) testou cinco cepas de micobactérias resistentes a glutaraldeído que foram isoladas de endoscópios, e dentre essas, duas cepas demonstraram um comportamento tolerante frente ao ácido peracético.

Os resultados aqui apresentados correspondem ao primeiro estudo utilizando o teste oficial de avaliação da eficácia de desinfetantes no Brasil e mostram propriedades biológicas muito diferentes de *M. massiliense* frente ao glutaraldeído, principalmente, quando comparado ao *M. bovis*, que é a cepa de referência usada na metodologia oficial da AOAC.

Como *M. bovis* é uma micobactéria de crescimento lento e *M. massiliense*, de crescimento rápido, e pelo fato desta última estar envolvida em vários surtos em diferentes regiões do país, apresentando inclusive um clone prevalente, algumas medidas foram tomadas pela ANVISA, a fim de evitar outros surtos e casos de infecções por MCR.

Com base nesses fatos, a inclusão de *M. massiliense* INCQS nº 00594 na legislação referente à comprovação da eficácia de desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos, seguindo o POP INCQS nº 65.3210.004, através da Resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009), foi uma das alternativas

encontradas na tentativa de prevenir infecções por micobactérias de crescimento rápido.

Em contrapartida, a inclusão obrigatória do micro-organismo na avaliação da eficácia dos produtos desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos e esterilizantes em uma técnica oficialmente implantada no INCQS e preconizada pela AOAC aconteceu sem respaldo científico prévio, já que antes do presente estudo, não existiam dados acerca do assunto. Assim, esses resultados podem auxiliar na adaptação da metodologia oficial.

Uma pesquisa mais abrangente seria necessária, já que o número de cepas clínicas de *M. massiliense* utilizadas não foi extenso. Porém, algumas sugestões podem ser avaliadas para a adaptação da técnica, como a variação no tempo de incubação do ensaio, que atualmente é de 60 dias inicialmente e mais 30 dias em casos de não ser observado crescimento ou este se apresentar tênue. Esse tempo poderia ser reduzido para 30 dias de incubação em ensaio realizados com *M. massiliense*, já que a cepa de referência e todas as cepas clínicas dessa micobactéria testadas neste trabalho apresentaram crescimento dentro de um mês ou menos, dependendo do produto analisado. Essa redução seria favorável na obtenção de respostas mais rápidas em nível de vigilância sanitária, assim medidas poderiam ser tomadas visando à promoção da saúde da população.

6 CONCLUSÕES

1. Na avaliação da atividade micobactericida dos desinfetantes foi observado que nenhum dos produtos à base de glutaraldeído foi eficaz frente a *M. bovis* INCQS N°00062 (BCG Moreau), que é a única cepa de referência preconizada pela AOAC nos ensaios da verificação da eficácia desses produtos.
2. Quanto à verificação da suscetibilidade de MCRs, para os produtos à base de glutaraldeído, *M. chelonae* ATCC 35572 foi eliminado pelos três desinfetantes, enquanto *M. fortuitum* ATCC 6841 apenas por dois desses. Já *M. abscessus* ATCC 19977 se apresentou tolerante frente aos três produtos.
3. Na verificação da suscetibilidade das cepas clínicas de *M. massiliense* pertencentes ao clone BRA100, todas foram classificadas como altamente tolerantes aos desinfetantes à base de glutaraldeído.
4. Verificou-se que dois produtos à base de glutaraldeído de marcas diferentes não foram capazes de destruir a cepa de referência *M. massiliense* INCQS n° 00594, durante a avaliação da atividade micobactericida dos desinfetantes.
5. Durante a avaliação da atividade micobactericida dos produtos que contêm ácido peracético em suas formulações, todos se mostraram eficientes frente a *M. bovis* cepa BCG Moreau. Entretanto, frente a *M. massiliense* INCQS n° 00594, um dos produtos se mostrou eficaz somente quando houve mudança no tempo de contato para uma hora.
6. Todas as cepas de referência de MCR e todas as cepas clínicas de *M. massiliense* se apresentaram sensíveis aos produtos que contêm ácido peracético em suas formulações.

7. Na avaliação da atividade micobactericida, o produto a base de orto-ftalaldeído foi capaz de destruir *M. bovis* INCQS nº00062 (BCG Moreau), mas não foi eficaz frente a *M. massiliense* INCQS nº 00594.
8. Durante a verificação da suscetibilidade das cepas de referência de MCR, somente *M. fortuitum* ATCC 6841 se apresentou sensível ao OPA.
9. Na avaliação da suscetibilidade das cepas clínicas de *M. massiliense*, todos se mostraram tolerantes ao OPA.
10. Analisando o desempenho dos três diferentes tipos de desinfetantes, o ácido peracético foi o único capaz de destruir todas as cepas clínicas de *M. massiliense* pertencentes ao clone BRA100, que é o clone prevalente nos surtos em todo o território nacional.
11. Na avaliação da qualidade em relação ao teor de princípio ativo dos produtos utilizados neste estudo, somente o Glutaraldeído B e o Ácido peracético B apresentaram resultados satisfatório.
12. Observou-se diferença entre o comportamento de *M. bovis* cepa BCG Moreau e *M. massiliense* INCQS nº 00594, sendo estas cepas utilizadas como referência para avaliação da qualidade de produtos pela metodologia oficial.
13. Visando a redução de infecções nosocomiais e, conseqüentemente, a promoção da saúde da população, sugere-se que o uso de produtos à base de glutaraldeído seja suspenso para quaisquer fins no que diz respeito à desinfecção de alto nível, já que todas as cepas de *M. massiliense* provenientes de surto e pertencentes ao clone prevalente no país foram tolerantes a esse desinfetante.

REFERÊNCIAS

ADÉKAMBI, T. et al. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolleti* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 133-143, 2006.

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. 5493-501, 2004.

ALVARENGA, L. et al. Infectious post-LASIK crystalline keratopathy caused by nontuberculous mycobacteria. **Cornea**, v. 22, n. 2, p. 188, 2003.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Informe aos profissionais de saúde sobre as características da infecção por *Mycobacterium abscessus*, medidas para diagnóstico, tratamento e prevenção. Informe técnico. 2005a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/Alertas/notatecnica1.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2009.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Infecções causadas por micobactérias em Belém. Nota técnica. 2005b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2005/310305.htm>. Acesso em: 05 abr. 2009.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alerta sobre infecções por micobactéria não tuberculosa após videocirurgia. Informe técnico. 2007a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2007/070307.htm>. Acesso em: 05 abr. 2009.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medidas para interrupção do surto de infecção por MCR e ações preventivas. Informe técnico. 2007b. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/Alertas/informe_tecnico_2.pdf.

Acesso em: 05 abr. 2009.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Infecções por *Mycobacterium abscessus*: diagnóstico e tratamento. Informe técnico. 2007c.

Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/Alertas/informe_tecnico_1.pdf.

Acesso em: 05 abr. 2009.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Micobactérias. Nota técnica. 2008. Disponível em:

[http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.p](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.pdf)

[df](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.pdf). Acesso em: 25 out. 2008.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Princípios básicos para limpeza de instrumental cirúrgico em serviços de saúde. Informe técnico. 2009.

Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/Alertas/2009/informe_tecnico_1.pdf.

Acesso em: 12 mar. 2009.

BLOCK, S. S. Peroxygen compounds. In: **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 5. ed. Phyladelphia: Lippincott Williams & Williams (ed), 2001. p. 185.

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: 31 mar. 2009.

BRASIL. Lei nº 9.782, 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, DF, p. 1-6, 27 jan. 1999.

BRASIL. Portaria DISAD 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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p17041, 5 set. 1988, Seção I.

BRASIL. Resolução nº 2.606, de 11 de agosto de 2006. Dispõe sobre as diretrizes para elaboração, validação e implantação de protocolos de reprocessamento de produtos médicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 ago. 2006. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=23598&word>. Acesso em: 2 mar. 2009.

BRASIL. Resolução nº 75, de 23 de outubro de 2008. Dispõe sobre a comprovação de eficácia de Esterilizantes e Desinfetantes Hospitalares para Artigos Semi-Críticos frente às micobactérias *Mycobacterium abscessus* e *Mycobacterium massiliense* e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 out. 2008. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=33819&word=resolu%C3%A7%C3%A3o%20n%C2%BA%2075>. Acesso em: 03 nov. 2008.

BRASIL. Resolução nº 8, de 27 de fevereiro de 2009. Dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido – MCR em serviços de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 fev. 2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0008_27_02_2009.html. Acesso em: 29 set. 2010.

BRASIL. Resolução nº 51, de 21 de outubro de 2009. Dispõe sobre a comprovação de 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, 21 out. 2009. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res_005121102009.html. Acesso em: 29 set. 2010.

BRASIL. Resolução 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.

BRASIL. Resolução nº 33, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre a proibição de registro de novos produtos saneantes na categoria “esterilizantes” para aplicação sob a forma de imersão, a adequação dos produtos esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos já registrados na ANVISA e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 41-42, 18 ago. 2010.

BRENNAN P.J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 64, p. 29-63, 1995.

BRITO, A.C. **Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em Saúde Pública**. São Paulo, SP. Apresentada como dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2008.

BROWN-ELLIOTT, B.A.; WALLACE, R.J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clin. Microbiol.**, v. 15, p. 716-746, 2002.

CALLEN, E.C.; KESSLER, T.L. *Mycobacterium fortuitum* infections associated with Laparoscopic Gastric Banding. **Obes. Surg.** Case report, 2010.

CARDOSO, A.M. et al. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microb. Infect.**, v. 10, p. 1552-1557, 2008.

CARSON, L.A. et al. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 36, n. 6, p. 839-846, 1978.

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.

COSTA, E.A.; ROZENFELD, S. Marcos históricos e conceituais. In: **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2001. p. 15-37.

DUARTE, R.S. et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 2149-55, 2009.

EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature. **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.

FALKINHAM, J.O. III. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 763-767, 2003.

FONTANA, R. T. As micobactérias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 61, p. 371-376, 2008.

FRAUD, S.; MAILLARD, J.-Y.; RUSSELL, A.D. Comparison of the mycobactericidal activity of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test. **J. Hosp. Infect.**, v. 48, p. 214-221, 2001.

FRAUD, S. et al. Effects of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and chlorhexidine diacetate on *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* strains with modified permeability. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, p. 575-584, 2003.

GOSH, J. et al. Sporulation in mycobacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 106. n. 26, p. 10781-86, 2009.

GREGORY, A.W. et al. The mycobactericidal efficacy of ortho-phthalaldehyde and the comparative resistances of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium terrae* and *Mycobacterium chelonae*. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 20, p. 324-330, 1999.

GRIFFITHS, P.A. et al. Glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. **J. Appl. Microbiol.**, v. 82, p. 519-526, 1997.

HINRICHSEN, S. L. Micobacérias de crescimento rápido – MCR. **Prática hospitalar**. Ano IX, n. 53, p. 106-111, 2007.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3210.004**: Método confirmatório para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes. Rev. 8. Rio de Janeiro, 2009a. 21p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3110.026**: Determinação do teor de glutaraldeído. Rev. 3. Rio de Janeiro, 2009b. 6p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

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

JANKOVIC, M. et al. A fatal *Mycobacterium chelonae* infection in an immunosuppressed patient with systemic lupus erythematosus and concomitant Fahr's syndrome. **J. Infect. Chemother.** (In press), 2010.

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

LEÃO, S.C. et al. Characterization of Mycobacteria from a Major Brazilian Outbreak Suggests that Revision of the Taxonomic Status of Members of the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* Group Is Needed. **J. Clin. Microbiol.** v. 47, n. 9, p. 2691-98, 2009.

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

LORENA, N.S.O. et al. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. **Acta. Cir. Bras.**, v. 25, n. 5, p. 455-459, 2010.

LUNA, J.A.C. Micobactérias atípicas. **BSCP Can. Ped.**, v. 25, p. 237-248, 2001.

MAILLARD, J.Y. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? **J. Hosp. Infect.**, v. 65, p. 60-72, 2007.

MANZOOR, S.E. et al. Reduced glutaraldehyde susceptibility in *Mycobacterium chelonae* associated with altered cell wall polysaccharides. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 43, p. 759-765, 1999.

MCDONNELL, G.E.; RUSSELL, A.D.; Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 147-79, 1999.

MCDONNELL, G.E. Chemical Disinfection. In: **Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action and resistance**. Washington, DC: ASM Press (ed), 2007. p. 85-88.

MEDJAHED, H.; GAILLARD, J.L.; REYRAT, J.M. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. **Trends Microbiol.**, v. 18, n. 3, p. 117-123, 2010.

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.

NOMURA, K. et al. Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant *Mycobacterium chelonae* from bronchoscope washing machines. **Am. J. Infect. Control.**, v. 32, n. 4, p. 185-188, 2004.

PETRINI, B. *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. **APMIS.**, v. 114, p. 319-328, 2006.

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

PINEAU, L. et al. Comparison of the fixative properties of five disinfectant solutions. **J. Hosp. Infect.** v. 68, p. 171-177, 2008.

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

RODRIGUES, E. A. C. et al. Proteção antiinfecçiosa e procedimentos de desinfecção, esterilização e antissepsia. In: **Infecções hospitalares, prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier (ed), 1997. p. 416.

RUSSELL, A.D. Principles of antimicrobial activity. In: **Disinfection, sterilization, and preservation**. Pennsylvania. USA, 1991. p. 29.

RUSSELL, A.D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 750-763, 2003.

RUSSELL, A.D.; MCDONNELL, G. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 147-179, 1999.

SAMPAIO et al., Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 55, n. 2, p. 107-18, 2006.

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.

SIMMON, K.E. et al. Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* sequencing of clinical isolates collected in United States. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 1978-80, 2007.

STANLEY, P.M. Efficacy of peroxygen compounds against glutaraldehyde-resistant mycobacteria. **Am. J. Infect. Control.**, v. 27, p. 339-43, 1999.

STEPHAN, J. et al. Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 11, p. 4163-70, 2004.

SVETLÍKOVÁ, Z. et al. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 9, p. 4015-18, 2009.

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

TOMASINO, S. Disinfectants. In: Horwitz W, Latimer GW, **Official Methods of Analysis of AOAC International**, AOAC International, USA, 2006. p28-29.

TORTOLI et al. Lethal *Mycobacterium massiliense* sepsis, Italy. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 6, p. 984-85, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Procariotos: Domínios *bacteria* e *archaea*. In: **Microbiologia**. 8. ed. Artmed Editora, 2005. p. 324-325.

TRAAG, B.A. et al. Do mycobacteria produce endospores? **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 107, n. 2, p. 878-881, 2010.

VAN KLINGEREN, B.; PULLEN, W. Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers. **J. Hosp. Infect.**, v. 25, p. 147-149, 1993.

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.

VIJAYARAGHAVAN, R. et al. Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery. **J. Hosp. Infect.**, v. 64, p. 344-347, 2006.

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

WALSH, S.E.; MAILLARD, J. -Y.; RUSSEL, A.D. Ortho-phthalaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 1039-46, 1999.