

Anita Santos de Oliveira

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Anita Santos de Oliveira

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Anita Santos de Oliveira

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Assinatura da aluna

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.”

Sumário

As infecções provocadas por micobactérias são das doenças mais antigas que afetam a humanidade, estando descritas há mais de 4000 anos. As micobactérias ditas atípicas (NTM - "non-tuberculous mycobacteria"), nomeadamente as pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium* (MAC), são ubíquas no meio ambiente, sendo impossível evitar a exposição ambiental. Estas bactérias são ingeridas através da água e alimentos, mas também inaladas através de aerossóis. Assim, uma grande parte da população já teve contato com MAC, mas nunca desenvolveu doença. O interesse pelas doenças provocadas por NTM cresceu exponencialmente com o recrudescimento global da epidemia da SIDA, pois muitas são patogénicos oportunistas. A infeção pulmonar é a forma de apresentação mais comum do MAC, mas também pode ocorrer infeção disseminada. De modo a evitar o desenvolvimento de doença oportunista recomenda-se o uso de profilaxia. A difícil eliminação do MAC pelos hospedeiros susceptíveis leva à sua permanência no interior das células fagocíticas e acaba por conduzir à formação de granuloma pulmonar. O diagnóstico diferencial baseia-se em métodos fenotípicos e genéticos. Relativamente ao tratamento, devido à sua camada exterior lipofílica, os medicamentos hidrofílicos apresentam fraca penetração. A terapia habitual utiliza uma combinação de antibióticos, para prevenir o surgimento de resistências.

Palavras-chave: NTM, complexo *Mycobacterium avium*; SIDA, granuloma

Summary

Infections caused by mycobacteria are of the oldest diseases affecting humanity, being described and researched about for over 4000 years. The atypical mycobacteria (NTM - "non-tuberculous mycobacteria"), in particular those belonging to the *Mycobacterium avium* complex (MAC), are ubiquitous in the environment, thus making it impossible to avoid environmental exposure. These bacteria are ingested through water and foods but also through inhaled aerosols. Therefore, a large part of the population has had contact with MAC, but never developed any associated diseases. Interest in diseases caused by NTM has grown exponentially with the global resurgence of the AIDS epidemic, because many are opportunistic pathogens. Pulmonary infection is the most common form of presentation of the MAC, but can also be seen as a disseminated infection. To prevent the development of opportunistic infection it is recommended to use prophylaxis. The difficult elimination of susceptible hosts by MAC results in them staying permanently within the phagocytic cells and ultimately leads to the formation of pulmonary granulomas. Differential diagnosis is based on phenotypic and genetic methods. For the treatment, due to its lipophilic outer layer, hydrophilic drugs have poor penetration. The usual therapy uses a combination of antibiotics, to prevent emergence of resistance.

Keywords: NTM, *Mycobacterium avium* complex, AIDS, granulomas

Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento é sem dúvida para a Ex.^{ma} Senhora Professora Doutora Amélia Assunção pela ajuda, prontidão, paciência, disponibilidade e empenho com que sempre me presenteou na transmissão de sábios conhecimentos e orientações. Por todo o apoio e carinho com que sempre me auxiliou, pela confiança e amizade que me manifestou e por todas as valiosas contribuições para a elaboração deste trabalho, o meu sincero obrigado.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, por terem acreditado em mim e dado todo o suporte físico e emocional. Obrigada pelo carinho incondicional, o esforço e orientações, por me terem tornado o que sou hoje, ensinarem-me os melhores caminhos desta jornada e por me proporcionarem o sonho que sempre quis realizar, sem eles nada disto seria possível.

Ao meu namorado, Gustavo Moreira, sou grata por ter estado ao meu lado em todos os momentos bons e maus e com amizade e carinho me fez acreditar que valia a pena continuar. Obrigada pelo amor, dedicação e compreensão.

Aos meus amigos e colegas de curso que me acompanharam durante esta caminhada, em especial à Maria Soares, Lilybeth Figueiredo, Daniela Almeida e ao Rodolfo Santos, por todo o companheirismo, força, apoio e ajuda, fatores bastante importantes e que me permitiram que cada dia fosse encarado com motivação, mesmo nas alturas de desânimo.

Ainda um enorme agradecimento à Tânia Roque, pela preciosa ajuda logística na elaboração deste trabalho.

Um muito obrigado a todos...

Índice

1	Micobactérias.....	1
1.1	Classificação	2
1.2	Caracterização.....	3
2	MAC	5
2.1	Características Gerais	5
2.2	Definição e contágio	5
2.3	Espécies pertencentes ao MAC.....	7
3	Infeção pelo MAC	9
4	Factores de virulência do MAC.....	11
4.1	GPLs	11
4.2	ManLAM	12
4.3	Ácidos micólicos.....	12
4.4	Sistemas de Secreção	12
4.5	HSP (proteínas de choque térmico)	13
4.6	Capacidade de formação de biofilmes	14
5	Resposta Imunológica	15
6	Patologias associadas ao MAC.....	18
6.1	Infeção pulmonar	18
6.1.1	Anatomia do pulmão	18
6.1.2	Caracterização da infeção pulmonar por MAC	19
6.1.3	Sintomas	20
6.1.4	Apresentações Clínicas.....	20
6.2	Infeção disseminada.....	20
6.2.1	Conceito HIV/SIDA	20
6.2.2	Caraterização da infeção disseminada por MAC	23

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

6.3	Linfadenite	25
6.4	Osteomielite	25
6.5	Doença de Crohn	26
7	Diagnóstico das micobacterioses	28
7.1	Caracterização Fenotípica	28
7.2	Caracterização genética	30
7.3	Diagnóstico Infecção pulmonar - critérios específicos.....	32
7.4	Diagnóstico Infecção disseminada - critérios específicos	33
8	Tratamento do MAC.....	34
9	Mecanismos de ação	36
9.1	Antibioterapia geral	36
9.1.1	Macrólidos	36
9.1.2	Rifampicina e Rifabutina.....	36
9.1.3	Etambutol	37
9.1.4	Aminoglicosídeos (estreptomomicina e amicacina):.....	38
9.1.5	Outros fármacos usados em profilaxia: ciprofloxacina e clofazimina	38
10	Conclusão	40
11	Bibliografia.....	41
12	Anexos.....	52

Índice de Figuras

Figura 1 - Bacilos de <i>Mycobacterium avium</i> (Adaptado de Microbiologybook, s/d)....	3
Figura 2 - Estrutura da parede celular das micobactérias. Os ácidos micólicos estão ligados à camada de arabinose-galactose na cadeia lateral de arabinose (Adaptado de Murray et al., 2000).	4
Figura 3 - Transmissão. Os pontos no ar representam núcleos de gotículas contendo bacilos de MAC (Adaptado de CDC, 2013).....	6
Figura 4 - Bacilos de micobactéria identificados pela coloração de Ziehl-Neelsen, num granuloma (Adaptado de Anexo 1).	10
Figura 5 - Estrutura química do GPL (Adaptado de Kobayashi, 2014).	11
Figura 6 - Principal mecanismo de invasão (Adaptado de Paz, 2011).....	17
Figura 7 - Anatomia dos Pulmões (Adaptado de Seeley et al., 2001c).....	19
Figura 8 - Vírus do HIV (Adaptado de Micro.Magnet, 2005).	21
Figura 9 - Bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaço de tecidos (Ziehl- Neelsen) (Adaptado de Coelho et al., 2008).....	29
Figura 10 - Aspetos das micobactérias em esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen. Legenda: 1- <i>M. tuberculosis</i> , 2- <i>M. avium</i> (Adaptado de Ministério da Saúde, 2008).....	29
Figura 11 - Estrutura Rifampicina (Adaptado de Souza e Vasconcelos,2005).	37
Figura 12 - Estrutura Etambutol (Adaptado de Souza e Vasconcelos,2005).	37
Figura 13 - Estrutura básica das quinolonas (Adaptado de Andersson e MacGowan, 2003).....	39
Figura 14 - Estrutura da clofazimina (Adaptado de Altman et al.,1995).	39

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação das espécies micobacterianas quanto à sua patogenicidade para o Homem (Adaptado de Ferreira e Sousa, 2000).	2
Tabela 2 - Classificação das espécies MAC quanto à sua patogenicidade (Adaptado de Rindi e Garzelli, 2013).	7
Tabela 3 - Principais características clínicas da infecção pulmonar causada por <i>M. Avium</i> (Adaptado de Orme e Ordway, 2014).	20
Tabela 4 - Diagnóstico de doença pulmonar por NTM (Adaptado de Campos, 2000).	32

Lista de abreviaturas

ATS – American Thoracic Society

B.A.A.R.- Bacilos álcool-ácido resistentes

CFP-10 – “culture filtrate protein 10”

DNA- ácido desoxirribonucleico

DTH – Hipersensibilidade do tipo tardio

EIA- Ensaio Imunoenzimático

ELISA- “Enzyme linked Immunosorbent Assay” (ensaio imunoenzimático)

ESAT 6- “early secreted antigenic target 6”

ESX- sistema de secreção

EUA- Estados Unidos da América

Gp- Glicoproteína

GPLs- Glicopéptidolípidos

HAART- Highly active Antiretroviral Therapy

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

HIV1/2 – Vírus da Imunodeficiência Humana dos tipos 1 e 2.

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Resolução

HSP – proteína de choque térmico

IDSA- Infectious Diseases Society of America

IFN- γ - Interferão gama

IL- Interleucina

IS- Sequência de Inserção

LAC- Linfadenite cervical

LAM- lipoarabinomanano

MAA- *Mycobacterium avium* spp. *avium*

MAC- *Complexo Mycobacterium Avium*

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

MAH- *Mycobacterium* spp. *hominissuis*

Man-LAM- Lipoarabinomano manossilado

MAP- *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*

MIC- Concentração inibitória mínima

MIRU-VNTRs- "Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Tandem Repeats"

MLSA- "Multi Locus Sequence Analysis"

MLVA- "Multilocus variable-number tandem repeat analysis"

MR- receptores de manose

MRTB- Tuberculose Multirresistente

NaOH- Hidróxido de Sódio

NK- células "natural killer"

NRAMP – "Natural resistance-associated macrophage protein"

nsGPLs- Glicopéptidolípido serotipo-inespecífico

NTM- Micobactérias não tuberculosas

PCR- "polymerase chain reaction"

PE- prolina-glutamato

PPE- prolina-prolina-glutamato

PPE25-MAV- PPE25 de *M. avium*

RFLP- "restriction fragment length polymorphism"

RNA- Ácido ribonucleico

rRNA- RNA ribossomal

rRNA 16S- RNA ribossomal 16S

SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNPs- "single-nucleotide polymorphisms"

ssGPLs- Glicopéptidolípido serotipo-específico

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

TAC- tomografia axial computadorizada

TBMR- Tuberculose Multirresistente

Th1- célula T "helper" tipo 1

TLR- "Toll-like receptors"

TNF- α – "tumour necrosis factor-alfa"

UFC- Unidades formadoras de colónias

1 Micobactérias

As micobacterioses têm uma elevada importância na patologia infecciosa humana, causando doenças descritas há mais de 4000 anos, como a tuberculose e a lepra (World Health Organization, 2014).

A tuberculose é uma doença crônica frequentemente pulmonar, de transmissão por via aérea, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, identificado por Robert Koch (Migliori *et al.*, 2007) e a lepra afeta predominantemente a pele e mucosas e é causada pelo agente *M. leprae*.

Atualmente, a tuberculose continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A persistência desta doença, deve-se ao aparecimento de estirpes multi-resistentes (MRTB) (World Health Organization, 2013).

Mais recentemente, com a diminuição dos casos de tuberculose nos países desenvolvidos, as infecções por micobactérias não-tuberculosas (NTM), também denominadas de atípicas, têm ganho uma importância crescente na saúde pública. Até ao surgimento da SIDA não se dava grande importância às infecções por NTM. Apesar da maior incidência destas infecções se verificar em indivíduos imunodeficientes (com HIV, fibrose cística ou transplantados), também ocorrem casos em pessoas imunocompetentes. A doença pulmonar é a forma de apresentação mais frequente de infecções por NTM, nomeadamente pelo MAC (complexo *Mycobacterium avium*) (Van Zeller *et al.*, 2013).

O interesse pelas doenças provocadas por NTM cresceu radicalmente com a emergência global da epidemia da SIDA, pois muitos são patogênicos oportunistas. Além da contribuição do recrudescimento da SIDA, o aumento significativo do impacto mundial das doenças causadas por NTM pode também ser atribuído a outros fatores, entre quais o aumento da sensibilidade dos métodos de diagnóstico (Griffith *et al.*, 2007). Com a melhoria dos exames laboratoriais, mais precisamente a sequenciação do gene que codifica o rRNA 16S, é cada vez mais reconhecida a importância das doenças causadas pelas NTM. Actualmente existem mais de 150 espécies descritas de NTM, tendo aumentado o reconhecimento de espécies clinicamente significativas.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

1.1 Classificação

De acordo com a tabela 1, pode-se classificar as espécies micobacterianas quanto à sua patogenicidade, da seguinte forma:

Tabela 1 - Classificação das espécies micobacterianas quanto à sua patogenicidade para o Homem (Adaptado de Ferreira e Sousa, 2000).

Estritamente patogénicas	Potencialmente patogénicas	Raramente patogénicas
<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.gordonae</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M.africanum</i>	<i>M.xenopi</i>	<i>M.rivale</i>
<i>M. lepraes</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. nonchromogenicim</i>
<i>M.ulcerans</i>	<i>M.simiae</i>	<i>M.flavescens</i>
<i>M. harmaphilum</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M.farcinogenes</i>
	<i>M.avium</i>	<i>M.microti</i>
	<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. lepraemurium</i>
	<i>M.asiaticum</i>	<i>M.segmatis</i>
	<i>M.shimoidei</i>	<i>M. termoresistibilie</i>
	<i>M. malmoense</i>	<i>M. fallax</i>
	<i>M.chelonae</i>	<i>M phei</i>
	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. vaccae</i>
		<i>M. parafortuitum</i>
		<i>M. aurum</i>
		<i>M.chitae</i>
		<i>M. duvalii</i>
		<i>M. gtivum</i>

Runyon defende que podem ser caracterizadas pelo seu crescimento e pigmentação (Saldias *et al.*, 2013). Com base nestas características, dividem-se as NTM em quatro grupos:

- Grupo I:

Crescimento lento – Fotocromogénicos: as culturas crescem desenvolvendo pigmento amarelo quando expostas à luz, não produzindo o pigmento no escuro. As culturas só se tornam visíveis após 2- 6 semanas de incubação (exemplo: *M. kansasii* e *M. marinum*);

- Grupo II:

Crescimento lento – Escotocromogénico: o pigmento produzido na presença como na ausência de luz. As culturas necessitam de 2-6 semanas de incubação, antes de ocorrer crescimento visível (ex: *M. scrofulaceum* e *M. goodii*);

-Grupo III:

Crescimento lento – São não-cromogénicas: Inclui espécies potencialmente patogénicas e não patogénicas. A maioria não é pigmentada e o seu crescimento é extremamente lento (*M. avium* e *M. intracellulare*);

-Grupo IV:

Crescimento rápido - A capacidade de crescer rapidamente, em 2-7 dias. As colónias podem apresentar pigmentação ou não. A maioria tem aparência lisa, mas também podem ocorrer variantes rugosas (ex: *M. abscessus* e *M. chelonae*) (Saldias *et al.*, 2013; Balows *et al.*,1991).

1.2 Caracterização

A família *Mycobacteriaceae* compreende o género *Mycobacterium* (Balows *et al.*,1991). Atualmente, devido à melhoria das técnicas de cultura, consideram-se mais de 150 espécies de micobactérias, que diferem no gene rRNA 16S. As micobactérias são bacilos imóveis, aeróbias, não capsuladas e na grande generalidade não formam esporos (Figura 1) (Johnson e Odell,2014).

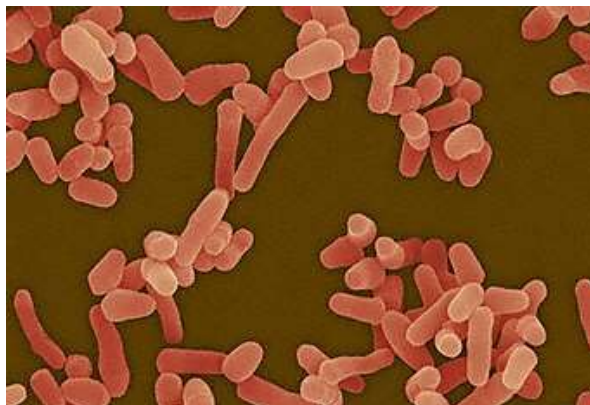


Figura 1 - Bacilos de *Mycobacterium avium* (Adaptado de Microbiologybook, s/d).

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Muitas são resistentes a elevadas temperaturas e a pH baixo. A espessura e a composição da parede (Figura 2) torna as micobactérias impermeáveis aos nutrientes hidrofílicos e relativamente resistentes aos metais pesados, desinfetantes e antibióticos. Estas características contribuem para que as NTM apresentem como reservatórios sistemas de água (Johnson e Odell,2014).

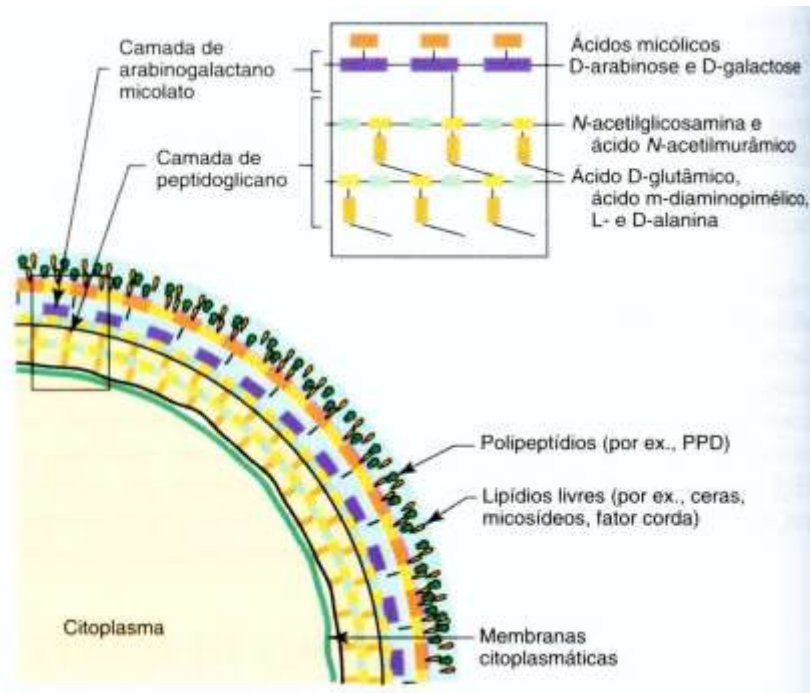


Figura 2 - Estrutura da parede celular das micobactérias. Os ácidos micólicos estão ligados à camada de arabinose-galactose na cadeia lateral de arabinose (Adaptado de Murray *et al.*, 2000).

Por resistirem ao descoloramento com a solução álcool-ácido, designam-se de “bacilos álcool-ácido resistentes” (B.A.A.R) (Balows *et al.*,1991).Esta característica deve-se à sua parede celular ser rica em lípidos, fazendo uma superfície hidrofóbica. O esqueleto de peptidoglicano é relativamente uniforme em todas as espécies de micobactérias e forma o componente maior da parede celular. Os ácidos micólicos são os principais responsáveis por conferirem às micobactérias resistência a vários agentes químicos, antibióticos e capacidade de formação de biofilme (Balows *et al.*,1991).

Existem meios de cultura apropriados para a cultura de micobactérias, sendo muito utilizado o meio de Lowenstein-Jensen (à base de ovo e com o agente inibidor verde malaquite). O aspeto das colónias diferencia consoante a espécie e a estirpe (Ministério da Saúde, 2008).

2 MAC

2.1 Características Gerais

Pertence ao grupo das NTM. São bactérias de crescimento lento encontradas no meio ambiente. As infecções causadas podem ser assintomáticas ou com manifestações clínicas. Por vezes podem ser fatais (Balows *et al.*,1991).

MAC é constituído por um grupo de bactérias aeróbias de crescimento lento, ou seja, o tempo de surgimento das colónias em meio sólido é de dez a vinte e um dias. A sua parede celular é constituída por três camadas, sendo a camada exterior lipofílica e a interior basal peptidoglicano (Schorey e Sweet, 2008). MAC pode residir no ambiente e também pode ser patogénicos oportunistas intracelulares com a capacidade de persistir dentro dos macrófagos e resistir aos mecanismos imunes do hospedeiro. As bactérias produzem maioritariamente colónias lisas e não pigmentadas, apresentando crescimento ótimo a 41°C. (Brooks, Butel e Morse, 2005). A patogenicidade está relacionada com as variantes coloniais observadas, nomeadamente com as colónias peculiarmente em forma de cúpula que (sendo usualmente não pigmentadas) tendem a ficar amareladas com a idade.

2.2 Definição e contágio

MAC é o grupo mais importante das bactérias patogénicas oportunistas pertencentes ao NTM. É constituído por várias subespécies e formas morfológicas que diferem na virulência. Podem causar infeção em doentes com SIDA, ou noutra situação de imunodeficiência, embora já tenham sido referidos casos em indivíduos sem imunodeficiência conhecida (Orme e Ordway, 2014; Nishiuchi *et al.*, 2007; Carrasco *et al.*, 2014). No entanto, nestes indivíduos a infeção é usualmente autolimitada (Guirado *et al.*, 2012).

MAC podem provocar, entre outras, doença pulmonar, sobretudo em indivíduos não imunodeficientes. Manifestações pulmonares causadas por MAC, nomeadamente por *M. avium*, estão a ser cada vez mais comuns e apresentam algumas semelhanças com a infeção por *M. tuberculosis* como febre, fadiga, perda de peso, suores noturnos (Balows *et al.*,1991). MAC também pode causar linfadenite, mais comum em crianças (exceto em casos de fibrose cística ou infeção por HIV) (Field *et al.*, 2004), doença disseminada em indivíduos com imunodeficiência e doenças da pele. A infeção pode ser iniciada pelas

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

vias respiratórias ou pelo trato intestinal (Hibiya *et al.*, 2011). A nível epidemiológico, as infecções por MAC são mais comuns em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento (Carrasco *et al.*, 2014).

A principal via é através de ingestão/inalação de água, partículas ou aerossóis, sendo rara a disseminação de pessoa para pessoa (Figura 3). A água potável é uma das principais fontes de infecção, especialmente em hospitais. Após a ingestão, a bactéria pode invadir e colonizar o trato gastrointestinal, o que parece estar relacionado com o desenvolvimento da doença disseminada em imunodeficientes (Uchiya *et al.*, 2013). A colonização nos pulmões pode também ocorrer após a inalação de gotículas de aerossol, conduzindo a doença pulmonar (Schorey e Sweet, 2008; Rose e Bermudez, 2014; Uchiya *et al.*, 2013).



Figura 3 - Transmissão. Os pontos no ar representam núcleos de gotículas contendo bacilos de MAC (Adaptado de CDC, 2013).

A bacteremia por MAC pode ser transitória (após invasão dos tecidos), persistente e levar a extensa infiltração dos tecidos (provocando perda de função orgânica). Aquando duma infiltração dos tecidos, qualquer órgão pode ser afetado, nomeadamente os pulmões, resultando no aparecimento de nódulos, infiltrados difusos e lesões endobrônquicas. Podem também ocorrer pericardites (inflamação do pericárdio, podendo ser aguda ou crónica), lesões cutâneas, ósseas ou do sistema nervoso central, abscessos dos tecidos moles e comprometimento dos nódulos linfáticos (Brooks, Butel e Morse, 2005).

Os sintomas iniciais causados pela infeção por MAC podem ser inespecíficos como a existência de febre, sudorese noturna, dor abdominal, diarreia e perda de peso.

2.3 Espécies pertencentes ao MAC

Tradicionalmente, MAC inclui duas espécies, *M. avium* e *M. intracellulare* (González-Pérez *et al.*, 2013; Bermudez *et al.*, 2000).

M. avium é atualmente subdividido em cinco subespécies, de acordo com a análise do rRNA 16S: *M. avium subsp. lepraemurium*, *M. avium subsp. paratuberculosis* (MAP), *M. avium subsp. silvaticum* (MAS) e, mais recentemente, *M. avium subsp. hominissuis* (MAH) e *M. avium subsp. avium* (MAA). MAH causa doença principalmente em humanos e suínos e MAA é o agente responsável por patologias noutros animais causando tuberculose aviária e, por vezes, infeções em mamíferos incluindo bovinos, veados, javalis, gado caprino e cavalos (Agdestein *et al.*, 2014; Guirado *et al.*, 2012; Radomski *et al.*, 2010).

Atualmente, os avanços na taxonomia molecular sugerem a inclusão de mais novas espécies no MAC, incluindo *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium colombiense*, *Mycobacterium arosiense*, *Mycobacterium vulneris*, *Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium timonense* e *Mycobacterium bouchedurhonense* (Tabela 2) (Park *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Classificação das espécies MAC quanto à sua patogenicidade (Adaptado de Rindi e Garzelli, 2013).

Espécies	Subespécies	Patogenicidade	Principal Hospedeiro
<i>M. avium</i>	<i>avium</i>	Tuberculose aviária	Aves
	<i>hominissuis</i>	Infeção pulmonar, linfadenite cervical, infeções disseminadas, COPD, fibrose cística	Humano/suínos
	<i>paratuberculosis</i>	Doença de Johne e possivelmente Doença de Crohn	Ruminantes (e humanos?)
	<i>silvaticum</i>	Tuberculose aviária e doença de Johne	Pombos Madeira
<i>M. intracellulare</i>		Infeção pulmonar	Humano
<i>M. colombiense</i>		Infeção disseminada e Linfadenopatia	Humano

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

<i>M. chimaera</i>		Infeção pulmonar, Fibrose cística	Humano
<i>M. marseillense</i>		Infeção pulmonar	Humano
<i>M. timonense</i>		Infeção pulmonar	Humano
<i>M. boucherdurhonense</i>		Infeção pulmonar	Humano
<i>M. vulneris</i>		Linfadenopatia	Humano
<i>M. arosiense</i>		Osteomielite, Infeção pulmonar	Humano
Outras MAC		Infeção pulmonar, Infeção disseminada	Humano

Analisando a tabela 2, como referido anteriormente, a maior parte das MAC são encontradas nos seres humanos, causando sobretudo infeção pulmonar.

3 Infecção pelo MAC

As células mononucleares são o alvo principal das micobactérias patogênicas, nomeadamente as pertencentes ao MAC.

A infecção disseminada ocorre habitualmente por via intestinal. A sua resistência ao pH ácido do estômago permite-lhes facilmente atingir ao lúmen intestinal e invadir as células do intestino delgado, principalmente os enterócitos do íleo terminal, sendo este um passo fundamental para o estabelecimento da infecção disseminada (Uchiya *et al.*, 2013). No intestino, a replicação destes microrganismos leva a formação de lesões que podem ser visualizados por endoscopia. Estas podem ocorrer em qualquer parte do trato gastrintestinal, sendo o duodeno a mais comum. A replicação não controlada de MAC leva a um espessamento da parede do intestino, a qual pode resultar em hemorragia ou obstrução gastrintestinal. A infecção dissemina-se através dos vasos linfáticos locais para os linfonodos, onde ocorre fagocitose das bactérias por macrófagos, não levando, porém, à morte bacilar. Assim, a replicação bacteriana irá eventualmente resultar na lise das células fagocíticas. No sangue, as bactérias encontram-se também dentro de células mononucleares. O acesso do MAC à corrente sanguínea é provavelmente responsável pela febre e sudorese noturna, os principais sintomas da doença disseminada. Ao disseminarem para outros tecidos as bactérias são captadas pelas células fagocíticas dos órgãos do corpo, tais como fígado, baço e medula óssea (Horsburgh *et al.*, 1999).

Na infecção pulmonar (adquirida por via respiratória), após a inalação das bactérias, os macrófagos alveolares e as células dendríticas vão capturá-las através da fagocitose. A difícil eliminação de MAC leva à sua permanência do interior das células fagocíticas e acaba por conduzir à formação de granulomas pulmonares (Schorey e Sweet, 2008). A sua internalização e replicação em macrófagos alveolares é crucial para a sua sobrevivência a longo prazo, no tecido dos pulmões (Uchiya *et al.*, 2013).

Uma vez dentro dos macrófagos, *M. avium* vive em vacúolos citoplasmáticos que caracteristicamente não acidificam e não se fundem com os lisossomas (Bermudez *et al.*, 2000).

As micobactérias produzem catalase para remover o oxigénio reativo produzido pelas células do hospedeiro, para garantir a sua sobrevivência após entrada na célula (Uchiya *et al.*, 2013).

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

A parede celular micobacteriana, constituída por ácidos micólicos, vai-lhe conferir proteção, e a capacidade inibitória da fusão fago-lisossomal, permite-lhe manter-se dentro dos macrófagos, tornando-os no seu reservatório. Os macrófagos infetados libertam citocinas pró-inflamatórias, levando ao recrutamento de neutrófilos, monócitos e células dendríticas. Nos nódulos linfáticos, estas células ativam as células T (Russell, 2007).

Os macrófagos infetados vão produzir citocinas para ativar uma resposta inflamatória. As citocinas IL-12 e IL-18 vão induzir a atividade das células NK, libertando IFN- γ , ativando os macrófagos a produzir TNF- α e substâncias microbidas. Com a sinalização criada e o acumular de células do sistema imunológico em redor dos macrófagos infetados, vai ocorrer a formação de granulomas (Figura 4).

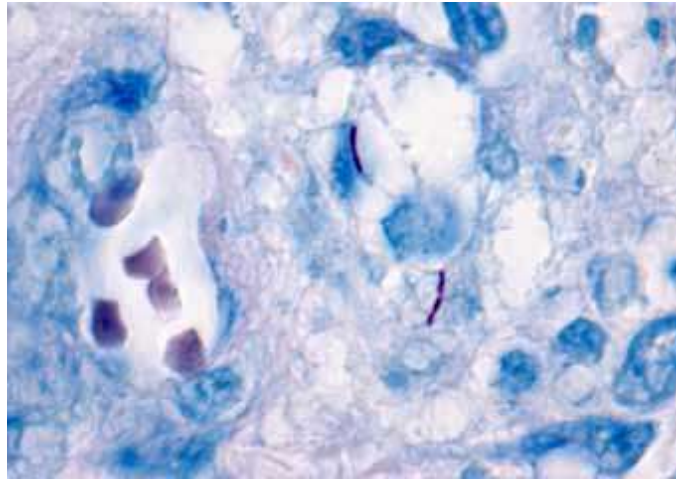


Figura 4 - Bacilos de micobactéria identificados pela coloração de Ziehl-Neelsen, num granuloma (Adaptado de Anexo 1).

4 Factores de virulência do MAC

A patogenicidade das micobactérias depende das suas propriedades de virulência e da suscetibilidade do hospedeiro. De seguida serão apresentados alguns dos fatores de virulência conhecidos em MAC.

4.1 GPLs

Um exemplo de fatores de virulência são os glicolípidos presentes na parede celular, como os glicopéptidolípidos (GPLs), que estão ligados não covalentemente à parede celular das micobactérias não tuberculosas, na camada mais externa (Zeharia *et al.*,2008; Hsu *et al.*,2012). Consistem no componente da parede celular mais abundante no MAC.

Os GPLs são compostos de um núcleo comum, acil gordo D-Phe-D-alo-Thr-D-Ala-L-alaninol-O- (3,4-di-O-metil- Rha) e de uma diferente porção de oligossacárido ligado no Tre do núcleo (Figura 5), a qual define cada dos 31 serotipos. O núcleo é composto por um ácido gordo, três aminoácidos e um resíduo de ramnose (Kobayashi, 2014).

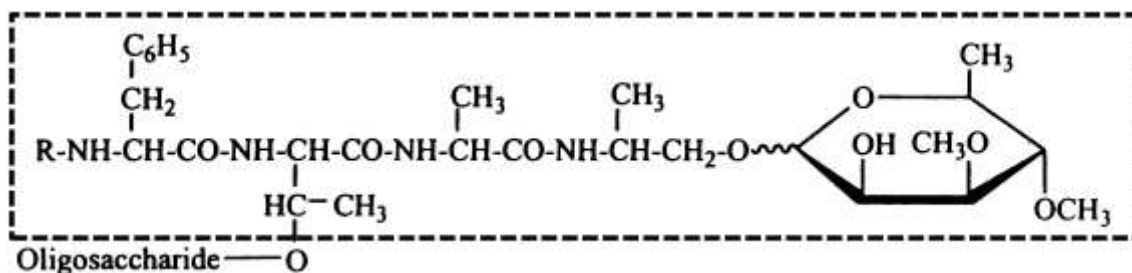


Figura 5 - Estrutura química do GPL (Adaptado de Kobayashi, 2014).

Os GPLs são classificados como polares e serotipo-específicos (ssGPLs) ou apolares e serotipo-inespecíficos (nsGPLs). Os ssGPLs, podem-se ligar a uma variedade de açúcares que definem a especificidade do serotipo do MAC (Guirado *et al.*, 2012).

Os GPLs estão envolvidos na morfologia das colónias e na hidrofobia, bem como na formação de biofilmes. Exercem atividade pleiotrópica, ou seja, a sua ação pode ser diferente consoante a natureza da célula alvo. Assim, no hospedeiro infetado induzem a produção de citocinas, através de interação com os receptores TLR das células do sistema imunitário, dando início à resposta inflamatória contra agentes patogénicos (Kobayashi, 2014).

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Estes glicolípidos servem como uma barreira de proteção contra os mecanismos antimicrobianos do hospedeiro presentes no fagossoma, podendo interagir com as membranas do hospedeiro, promovendo a sobrevivência bacteriana. Podem acumular-se na superfície do MAC, durante o seu crescimento em cultura e também no interior do fagossoma, levando à formação de uma camada extracelular semelhante a uma cápsula (Guirado *et al.*, 2012; Tereletsky e Barrow, 1983).

4.2 ManLAM

Outros lípidos também se encontram não covalentemente ligados à parede celular da micobactéria, como é o caso do LAM (lipoarabinomanano) que é um potente modulador das funções dos macrófagos. MAC apresenta alteração na molécula de LAM, estando esta manosilada, designando-se Man-LAM (lipoarabinomanano manosilado).

O ManLAM é um componente da parede celular que atrasa a fusão fagolisossomal, tal como o GPL, a qual depende da interação com o recetor da manose dos macrófagos (MR) (Guirado *et al.*, 2012).

ManLAM inibe a produção de TNF- α e IL-12 por macrófagos. Para além disso, apresenta atividade anti-inflamatória e tem a capacidade de inibir a apoptose (Souza *et al.*, 2013). Em MAC, ManLAM apresenta apenas um resíduo de manose terminal, ao contrário de em *M. tuberculosis*, podendo apresentar dois ou três.

4.3 Ácidos micólicos

Os ácidos micólicos encontram-se em grande quantidade na parede celular, são de origem lipídica e têm o poder de proteger a micobactéria da desidratação, agentes químicos e antibacterianos (Vander Beken *et al.*, 2011).

4.4 Sistemas de Secreção

O sistema de secreção tipo VII, é composto por cinco sistemas, designados de ESX-1 a ESX-5, que fazem a secreção de proteínas (Houben *et al.*, 2014).

Em todas as micobactérias existem cinco loci diferentes, *ESX-1* a *5*. *M. avium* contém quatro destes loci, *ESX-2-5*, pois contém uma deleção que abrange toda a região codificante de *ESX-1*. *ESX-1* tem sido apontado como essencial para a virulência, uma vez que a mutação de genes pertencentes ao locus *ESX-1* resulta em estirpes atenuadas (Mcnamara *et al.*, 2012). Este parece ser responsável pela secreção de proteínas solúveis

pequenas, tais como CFP-10 ("10 kDa Culture Filtrate Protein") e ESAT-6. Ambas apresentam alta imunogenicidade, podendo ser utilizadas em diagnóstico (Ganguly *et al.*, 2008).

A perda de função de *ESX-1* em *M. avium* poderá, no entanto, aparentemente ser compensada por outros fatores, uma vez que *M. avium* é capaz de manter a virulência. De facto, as micobactérias com deficiência em *ESX-1*, como *M. avium*, apresentam um mecanismo de compensação pela produção de GPLs, que não estão presentes noutras micobactérias patogénicas (Houben *et al.*, 2014).

O sistema *ESX-5* é responsável pela exportação da família de proteínas micobacterianas PPE (prolina-prolina-glutamato) e PE (prolina-glutamato) (Mcnamara *et al.*, 2012).

Foi sugerido que algumas proteínas PPE e PE desempenham um papel na modulação da resposta imunitária e na variação antigénica (Griffiths *et al.*, 2008; Sampson, 2011). A variação antigénica, é importante para permitir que o organismo escape à resposta do hospedeiro (Griffiths *et al.*, 2008). Assim, a ausência do locus *ESX-5* leva à inibição da capacidade de modulação da resposta macrofágica pelas bactérias.

O gene *PPE25-MAV* codifica para uma proteína da família PPE, que está implicada tanto na virulência bacteriana como no reconhecimento imunológico. A inativação de *PPE25-MAV* em *M. avium*, resultou na perda de virulência e de sobrevivência intracelular, abrindo a possibilidade de descoberta de novos alvos farmacológicos a serem explorados no tratamento da infeção causada por *M. avium* (Mcnamara *et al.*, 2012).

A biologia estrutural de proteínas PPE/PE é, portanto, uma área com grande necessidade de um maior desenvolvimento. Estas proteínas são também muito imunogénicas, tendo sido várias delas avaliadas para possível inclusão em novas vacinas (Sampson, 2011).

4.5 HSP (proteínas de choque térmico)

O gene *hsp65* está presente em todas as micobactérias, sendo muito útil na identificação de espécies geneticamente relacionadas (Ringuelet *et al.*, 1999).

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Estas proteínas são produzidas em situações de stress, ajudando à sobrevivência celular. Como há homologia entre as HSP bacterianas e humanas, a infecção poderá levar a doença auto-imune (Sechi e Thomas Dow, 2015).

4.6 Capacidade de formação de biofilmes

A parede celular hidrofóbica permite que as MAC sejam resistentes ao cloro e daí tenham a capacidade de formar biofilmes em sistemas de água potável. *M. avium* tem a capacidade de sobreviver em água num período até 26 meses, mesmo nos sistemas de água quente potável, a qual poderá conter maior concentração de bactérias do que a água fria. À superfície, incluindo nos sistemas de distribuição de água, estas bactérias encontram-se sob a forma de agregados designados de biofilmes, o que lhes permite uma maior resistência. Esta bactéria consegue sobreviver a procedimentos de desinfecção de águas tradicionais, uma vez que tem a característica de ser resistente ao tratamento com ozono e cloro. O reservatório em sistemas de água potável tem uma elevada importância, uma vez que pode ser veículo de transmissão para seres humanos e animais (Johansen *et al.*, 2009).

5 Resposta Imunológica

O sistema imunológico, além de proteger o hospedeiro contra infecções causadas por microrganismos, também consegue diferenciar os antígenos do próprio ("self") dos que não são ("non-self"). A resposta imune pode ser inata ou adaptativa. A inata está presente desde o nascimento, não possui memória imunológica, e é a primeira linha de defesa contra os agentes patogênicos. Em contrapartida, a adaptativa, como o próprio nome indica, é induzida pela inata e apresenta elevada especificidade antigénica, memória e diversidade de resposta (Nisengard e Newman, 1994).

A resposta imunológica contra micobactérias é essencialmente mediada por células. Na primeira fase de eliminação do agente patogénico, estão envolvidos componentes do sistema imune inato, como células fagocíticas (neutrófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas) e linfócitos denominados NK ("natural killer"). Os macrófagos e as células dendríticas resultam da diferenciação de monócitos que migraram para diferentes locais do organismo, em resposta à produção de quimiocinas, e fazem parte da primeira linha de defesa do organismo, pois reconhecem, fagocitam e destroem muitos patogénicos (Guirado, Schlesinger e Kaplan, 2013). Vários estudos demonstram que os macrófagos são incapazes de fagocitar MAC em casos de SIDA avançado, o que ocorre facilmente em indivíduos imunocompetentes.

Quer na resposta imune inata quer na adaptativa, a produção de citocinas e quimiocinas desempenha também um papel fundamental (Horsburgh, 1999). Numa fase precoce, os macrófagos e os neutrófilos são chamados ao local, através de quimiocinas (ex: IL-8) e citocinas pró-inflamatórias (ex: IL-6), provocando a fagocitose e a destruição intracelular. As células dendríticas e os fagócitos ativados vão produzir citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-18. A IL-12 potencia a ativação das NK que, juntamente com os linfócitos T, produzem IFN- γ (interferão-gama, citocina que ativa os mecanismos microbicidas dos macrófagos - como produção de espécies reativas de oxigénio, de azoto e enzimas hidrolíticas em pH ácido, restringindo o crescimento bacteriano). As NK também apresentam como função a lise da célula infetada com a bactéria pelo mecanismo de citotoxicidade celular. A resposta imune inata não consegue por si só eliminar a bactéria e por isso é necessário a ativação da adaptativa.

Os principais tipos celulares que estão envolvidos na resposta imune adaptativa são os linfócitos B e linfócitos T. Os linfócitos T têm uma ação importante na iniciação e

regulação das respostas imunes. Os linfócitos B reconhecem os antígenos por intermédio das imunoglobulinas presentes na sua superfície e secretam anticorpos específicos (Nisengard e Newman, 1994). Estudos indicam uma importância das células T CD4+ na resposta do hospedeiro ao MAC, que é confirmado pela infecção oportunista observado em doentes com SIDA (Bermudez *et al.*, 2000). Uma vez que há uma diminuição destas células com o avançar da doença, estas não vão ser suficientes para conter o agente dentro do granuloma, dando-se a sua disseminação.

Tanto a IL-12 como a IL-18 produzidas por fagócitos induzem a diferenciação de linfócitos T CD4+ em Th1. Na infecção micobacteriana, as defesas efetivas do hospedeiro são dependentes da formação da resposta imune do tipo Th1. Além de produzirem IFN- γ , induzem DTH (hipersensibilidade do tipo tardio), que resulta na formação de granulomas e na eliminação das micobactérias (Arosa, Cardoso e Pacheco, 2012; Barrow, 1997).

As células T CD8+ citotóxicas têm papel fundamental na eliminação das bactérias intracelulares através da lise das células infectadas (Figura 6) (Arosa, Cardoso e Pacheco, 2012; Coelho-Castelo *et al.*, 2009).

A indução de morte celular durante a infecção com agentes patogénicos, pode ser um componente da resposta imunitária. A morte celular pode ser benéfica ou nefasta para o organismo, como a apoptose e a necrose respetivamente. A apoptose é uma morte celular programada, que mantém a membrana plasmática intacta. Durante a resposta imunitária a apoptose facilita a morte dos agentes patogénicos (por eliminação da célula nicho) e potencia a atividade microbicida dos macrófagos (pela fagocitose de corpos apoptóticos de neutrófilos), diminuindo o crescimento bacteriano (Jordão e Vieira, 2011; Balcewitz-Sablinska, Gan e Remold, 1999; Behar *et al.*, 2011).

Contrariamente à apoptose, a necrose é um mecanismo que pode ser potenciado pelas bactérias para promoção da sua disseminação, por libertação do conteúdo celular do macrófago (Jordão e Vieira, 2011; Behar *et al.*, 2011). Nos indivíduos imunocompetentes, *M. avium* induz preferencialmente apoptose, permitindo a sua eliminação (Fratuzzi *et al.*, 1999).

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

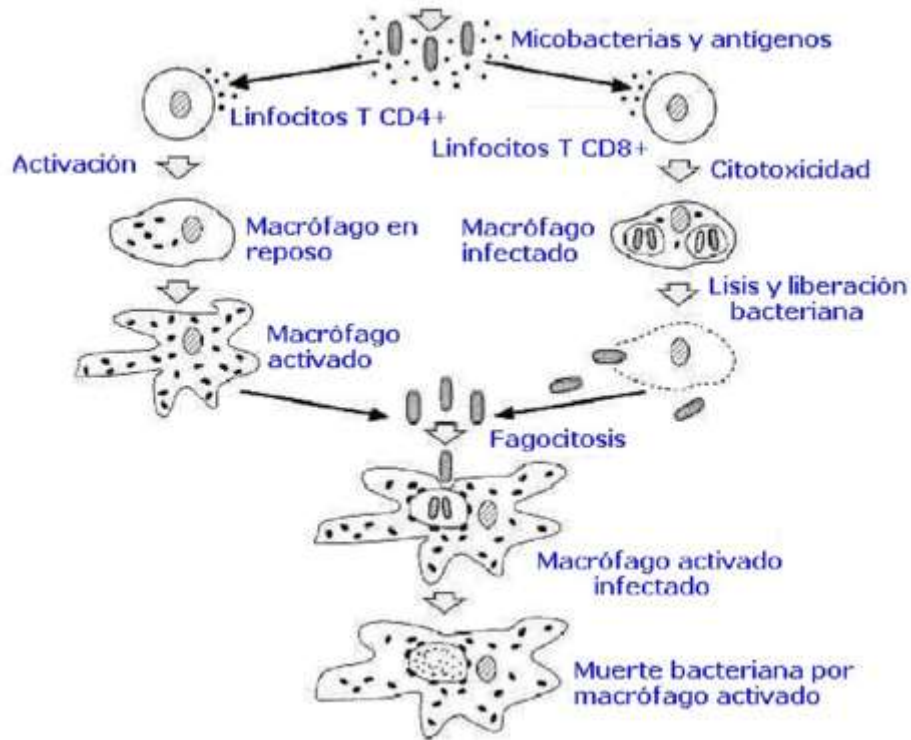


Figura 6 - Principal mecanismo de invasão (Adaptado de Paz, 2011).

Se os macrófagos não conseguirem eliminar as bactérias intracelulares, isto pode levar ao desenvolvimento de uma estrutura denominada de granuloma (constituída por macrófagos infectados na zona central, circundada por linfócitos T CD4+ e T CD8+ ativados, com o objetivo de conter o agente infeccioso, evitando deste modo a sua disseminação) (Coelho-Castelo *et al.*, 2009). A formação de granulomas é um sinal característico das infecções micobacterianas.

6 Patologias associadas ao MAC

6.1 Infecção pulmonar

Os primeiros relatos de doença pulmonar causada por MAC referem-se a doentes do sexo masculino, com hábitos tabágicos e abuso de álcool. Hoje sabe-se que a presença de histórico de doença pulmonar (como fibrose cística) é predisponente à infecção. Estudos sugerem que a magreza pode também ser considerada como um fator de risco (Field *et al.*, 2004).

A diminuição nos níveis de estrogénio e a presença de polimorfismos nos genes NRAMP (“natural resistance – associated macrophage protein”) foram também apontados como possíveis fatores de risco (Uchiya *et al.*, 2013).

A doença pulmonar causada por MAC pode ser clinicamente indistinguível de uma pneumonia, tendo em conta que pode existir a presença de mais do que um agente patogénico presente. No entanto, mesmo havendo um isolamento de *M. avium* e de *M. intracellulare* em culturas de expetoração, deve fazer-se uma pesquisa de outros agentes patogénicos (Inderlied *et al.*, 1993).

6.1.1 Anatomia do pulmão

O aparelho respiratório compreende as vias aéreas superiores, constituídas pelas fossas nasais, faringe e as vias aéreas inferiores, como a laringe, traqueia, brônquios e pulmões.

Podemos dividir os brônquios em principais e secundários. Dois brônquios secundários, encontram-se no pulmão esquerdo e três no direito. Os brônquios secundários dão origem aos terciários, e assim sucessivamente até originarem os bronquíolos. Cada bronquíolo respiratório diverge para formar canais alveolares, que terminam em cachos de sacos de ar, os alvéolos. Um saco alveolar é composto por dois ou mais alvéolos que partilham uma abertura comum (Seeley *et al.*, 2001c).

Os pulmões são os principais órgãos da respiração, apresentando o pulmão direito três lobos enquanto que o esquerdo apenas dois (Figura 7) (Seeley *et al.*, 2001c).

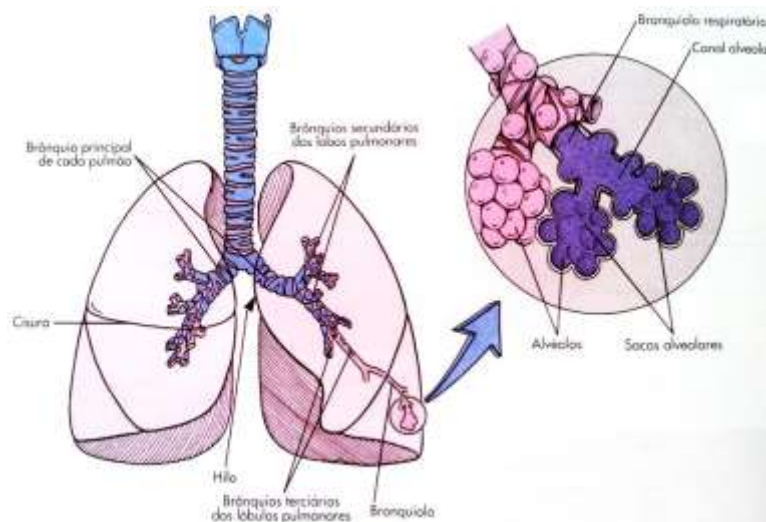


Figura 7 - Anatomia dos Pulmões (Adaptado de Seeley *et al.*, 2001c).

6.1.2 Caracterização da infecção pulmonar por MAC

A doença pulmonar causada por MAC é caracterizada pela presença de bronquiolite (é uma inflamação a nível dos brônquios caracterizada pela dificuldade em respirar, tosse seca e taquicardia (ManualMerck, 2009a)), apresentando pequenos nódulos centrolobulares, e de bronquiectasia (dilatações e distorções que ocorrem continuamente nos brônquios), sobretudo no lobo médio direito e na divisão lingular do lobo superior esquerdo (Song *et al.*, 2008). Ocorre uma alteração a nível da função mucociliar, que por consequência leva à acumulação de secreções, potenciando a colonização bacteriana (Fundação Portuguesa do Pulmão, 2009). A doença pulmonar progressiva, causada por MAC, pode levar a insuficiência respiratória ou, até mesmo à morte em doentes previamente saudáveis e a bronquiectasia, em doentes sem doença pulmonar subjacente ou imunodeficiência, particularmente em mulheres de meia-idade e idosos. Crê-se que a doença pulmonar causada por MAC seja cada vez mais prevalente, devido ao envelhecimento da população (Orme e Ordway, 2014).

No Japão, a incidência da doença pulmonar causada por *M. avium* é cerca de sete vezes mais elevada do que a causada por *M. intracellulare*. Porém, as suas prevalências variam consoante o país (Uchiya *et al.*, 2013).

Apesar destas duas espécies de MAC serem distinguíveis geneticamente, as características clínicas da infecção por *M. avium* e *M. intracellulare* são de difícil diferenciação, sendo pouco o conhecimento sobre as diferenças na progressão da doença e resposta ao tratamento entre estas duas espécies de MAC (Koh *et al.*, 2012).

6.1.3 Sintomas

A doença pulmonar pode ir desde assintomática a sintomática, com sintomas como tosse intensa, por vezes com expectoração purulenta mas sem sangramento, perda de peso, mal-estar, febre, letargia, anorexia, dispneia e suores noturnos (Carrasco *et al.*, 2014).

6.1.4 Apresentações Clínicas

As principais apresentações clínicas da infeção pulmonar causada por *M. avium* são a doença pulmonar em indivíduos com infeção pulmonar subjacente, pneumonite de hipersensibilidade e Síndrome de lady Windermere. Este último, ocorre em mulheres idosas, sem uma doença pulmonar subjacente (Tabela 3) (Orme e Ordway, 2014).

Tabela 3 - Principais características clínicas da infeção pulmonar causada por *M. Avium* (Adaptado de Orme e Ordway, 2014).

Doença pulmonar em indivíduos com infeção pulmonar subjacente:	Ocorre principalmente em indivíduos do sexo masculino mais velhos, com historial de tabagismo e/ou alcoolismo. Características radiológicas: fibrocavitária e nódulos na zona pulmonar superior.
Bronquiectasia fibronodular:	Ocorre principalmente em mulheres idosas, sem doença pulmonar subjacente. Ocorre em algumas partes do pulmão, como o lobo médio direito e da línula. Se não for tratada ,pode ocorrer proliferação e aglutinação dos nódulos ao longo do tempo.
Pneumonite de hipersensibilidade:	Tem sido descrito em pessoas que usam frequentemente banheira de hidromassagem. Os sintomas são classificados como agudos quando são semelhantes aos gripais como febre, mal-estar, dor de cabeça e tosse e, crónicos ocorrendo dispneia, tosse produtiva ou seca e perda de peso. A nível radiológico, há a presença de múltiplos nódulos.

6.2 Infeção disseminada

6.2.1 Conceito HIV/SIDA

A SIDA é uma doença infecciosa causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A infeção pelo HIV caracteriza-se por várias fases, das quais apenas a mais avançada é designada de SIDA. Assim, ser positivo para o HIV não é a mesma coisa que ter SIDA (AIDS.GOV, s/d). A SIDA tem um elevado impacto na saúde pública global com consequências demográficas, económicas, culturais e políticas.

O HIV compreende dois retrovírus, especificamente o HIV 1 e HIV 2. O HIV1 é o mais prevalente e mais virulento e o HIV 2 é transmitido com menor facilidade. O HIV

tem um tropismo para as células T CD4+, infetando-as e, como tal, o número vai reduzindo até levar à imunodeficiência (Borel *et al.*, 1999).

6.2.1.1 Classificação e caracterização do vírus do HIV:

O HIV é um lentivírus da família dos retrovírus, que aloja o seu DNA nas células que infeta. Assim, as células que se replicam já serão portadoras do vírus. O HIV é um pequeno vírus, com um invólucro, constituído por uma membrana lipídica, que contém duas glicoproteínas, gp 120 e gp 40, que são fundamentais para a invasão de células T, através da ligação à molécula CD4. No seu interior, encontra-se a matriz proteica constituída pela cápside viral. No interior da cápside localiza-se o material genético (duas moléculas de RNA dimerizadas), RNA de transferência e enzimas víricas (transcriptase reversa, integrase e proteases) (Figura 8) (Ferreira, Riffel e Sant'Ana, 2010; Sida. Roche, 2015).

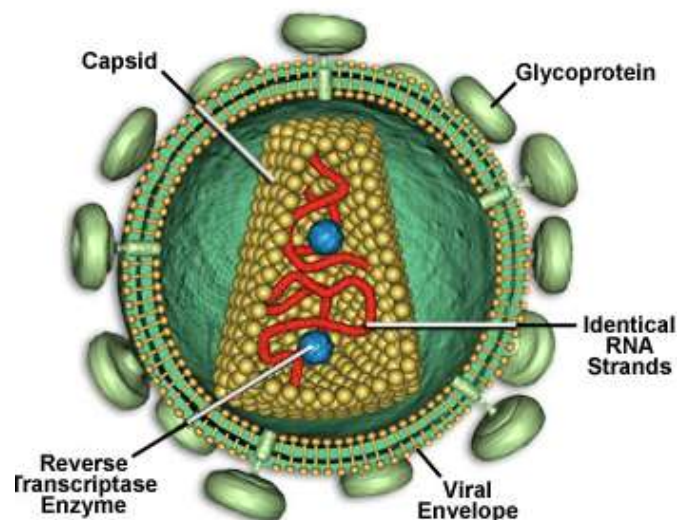


Figura 8 - Vírus do HIV (Adaptado de Micro.Magnet, 2005).

6.2.1.2 Fases da doença

Esta doença é caracterizada por várias fases, com sinais e sintomas que a representam.

1º fase - primo-infecção ou fase aguda:

Após o contacto com o vírus, esta fase é compreendida desde as primeiras três semanas até seis meses, caracterizada por ser sintomática ou assintomática. Quando apresenta sintomas, estes são semelhantes ao estado gripal, como dores musculares e de cabeça, febre e alterações gastrintestinais, o que leva o doente a não perceber que se encontra infetado. Estes sintomas aparecem num período de duas a dez semanas após a infeção.

2º fase -fase de infeção assintomática:

Esta fase pode durar dez ou mais anos, sendo os doentes designados de portadores assintomáticos. Estes não apresentam manifestações clínicas, apesar de estarem já infetados. É o chamado período de latência do vírus. Nesta fase já são detetados níveis mais elevados de anticorpos anti-HIV, sendo o indivíduo designado de seropositivo para o HIV.

3º fase - fase da linfadenopatia generalizada persistente:

Esta fase acontece após alguns meses ou dez anos após a primo-infecção, sendo caracterizada por:

- Aumento volume dos gânglios linfáticos;
- Febre e suores noturnos;
- Fadiga ou cansaço e algias nos músculos e articulações;
- Perda de peso maior que 10% do peso corporal;
- Diarreia persistente e abundante.

4º fase - fase da SIDA ou forma grave da infeção pelo HIV:

Esta é caracterizada pela grave destruição do sistema imunitário, podendo aparecer sintomas associados a algumas doenças como infeções oportunistas (podendo ser causadas por bactérias, vírus ou fungos), formas específicas de cancro e doenças do sistema nervoso (Daudel e Montagnier,1994; Antidrogas,2000; Miranda, 2003).

6.2.1.3 Transmissão

A SIDA é caracterizada pela alta carga viral e diminuição do número de linfócitos T CD4⁺. Os macrófagos atuam também como importantes reservatórios para o HIV, podendo servir como veículos para a disseminação do HIV, pelos outros tecidos do organismo (Naif, 2013).

O HIV é transmitido pelo sangue e secreções corporais como esperma e secreções vaginais, sendo situações de risco as relações sexuais não protegidas, a partilha de agulhas endodérmicas e podendo também ser transmitido verticalmente (Seeley *et al.*, 2001b).

Após a infecção viral, o sistema imunológico é estimulado, levando à produção de anticorpos pelos linfócitos B, para neutralizar o vírus em circulação. O número de linfócitos que apresentam a proteína CD4 diminui devido à infecção viral, seguida dos linfócitos CD8, caracterizando a evolução da doença (Borel *et al.*, 1999).

O tratamento deve abordar amplamente a doença, devendo ter por isso em linha de conta o vírus, as infeções oportunistas e o estado imunitário. O vírus, devido à sua capacidade de sofrer mutação, pode tornar-se mais resistente aos fármacos. A terapia HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), não elimina o vírus mas permite controlar os seus níveis, aumentando o tempo de vida do doente infetado com HIV (Valle *et al.*, 2013).

6.2.2 Caraterização da infeção disseminada por MAC

A doença disseminada ocorre principalmente em pacientes de SIDA com níveis de linfócitos T CD4⁺ inferiores a 50 células /ml, ou seja, num estágio avançado da imunodeficiência. Na maioria dos casos, afeta especialmente órgãos do sistema retículo-endotelial (como o fígado, baço e medula óssea) e aparelho gastrointestinal (Carrasco *et al.*, 2014; Karakousis, Moore e Chaisson, 2004).

Os principais sintomas da infeção disseminada consistem em febre, perda de peso, suores noturnos, fadiga, diarreia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, anemia e níveis elevados dos marcadores hepáticos (Karakousis, Moore e Chaisson, 2004; Schafran, 1998). Com o progresso da infeção, os órgãos vão sendo progressivamente afetados, até levar à sua falência.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Pelo facto das características clínicas não serem específicas o suficiente para efetuar um bom diagnóstico, é necessário recorrer-se a exames laboratoriais. Para isso, é importante fazer a cultura e o isolamento da micobactéria (como as hemoculturas ou culturas a partir de biópsias de nódulos linfáticos inflamados ou outros órgão afetados, ou suas secreções), além de avaliar determinados marcadores hepáticos (como a fosfatase alcalina e lactato desidrogenase) (Karakousis, Moore e Chaisson, 2004; Schafran, 1998).

A terapia anti-retroviral (HAART) tem sido importante na prevenção e no tratamento de infeção disseminada por MAC (Shafran, 1998). Como resultado desta terapia, nos últimos anos a taxa anual de doença disseminada e de outras infeções oportunistas causadas por MAC, tem diminuído substancialmente. A terapia HAART tem um importante efeito como prevenção primária da doença, uma vez que permite um aumento das células T e dificilmente ocorre desenvolvimento de MAC. Logo há uma menor replicação viral e, por isso, dificilmente as células T CD4⁺ caem abaixo dos 50 células/mm³ (característica clínica), prevenindo o aparecimento da doença disseminada (Karakousis, Moore e Chaisson, 2004). No entanto, doentes com imunossupressão avançada que não estão a ter uma terapia HAART, que tenham desenvolvido resistência ou que não tenham acesso a esta terapia, continuam em risco.

Em doentes que não façam terapia HAART, e de forma a evitar o desenvolvimento de doenças oportunistas, especificamente por MAC, recomenda-se que haja dois tipos de profilaxia. A profilaxia primária, que tem como objetivo evitar o desenvolvimento da infeção oportunista após uma exposição, inicia-se quando os linfócitos T CD4⁺ apresentem uma quantidade menor que 50 células/mm³. A terapia de primeira escolha é a azitromicina 1200mg/semana, tendo como alternativa claritromicina 500mg duas vezes por dia. No entanto, é utilizado como critério de suspensão, uma boa resposta ao tratamento, com manutenção dos níveis de linfócitos T CD4⁺ > 100 células/mm³ por mais de três meses, havendo uma reintrodução de profilaxia, se os níveis se encontrarem menores de 50 células/mm³. A profilaxia secundária, que visa a minimização da reincidência de doenças oportunistas causadas por MAC, apresenta como primeira escolha a **claritromicina** 500 mg, duas vezes ao dia, com **etambutol** 15 mg/kg/dia (máximo 1.200 mg/dia), tendo como alternativa a **azitromicina** 500 mg uma vez ao dia com **etambutol** 15 mg/kg/dia (máximo 1.200 mg/dia). O critério de suspensão caracteriza-se pela ausência de sintomas e por linfócitos T CD4⁺ >100 células/mm³ após um ano de tratamento ou mantendo-se estável por mais de seis meses. Poderá haver uma

reintrodução aquando o número de linfócitos TCD4 <100 células/mm³. O uso de azitromicina ou claritromicina como profilaxia ajudou a diminuir significativamente a incidência deste infeção nestes doentes (Brooks, Butel e Morse, 2005; AIDS. GOV., 2014).

6.3 Linfadenite

A linfadenite por NTM raramente afeta adultos na ausência de infeção por HIV (Griffith *et al.*, 2007).

Nos EUA, a linfadenite cervical (LAC) afeta maioritariamente as crianças com idade menor ou igual a três anos. Esta pode dividir-se em submandibular, submaxilar, cervical ou nos linfonodos pré-auriculares, sendo a mais comum a forma de linfadenite causada por MAC. O alargamento dos linfonodos geralmente é indolor, podendo ocorrer o seu rompimento e conseqüente drenagem local (Zeharia *et al.*, 2008; Griffith *et al.*, 2007).

A LAC pode ser caracterizada como aguda unilateral, aguda bilateral ou subaguda/crónica, mais comum como conseqüência da infeção por MAC. O diagnóstico baseia-se na história do doente, bem como no exame físico, incluindo uma ecografia e tomografia computadorizada (TC). Também se recorre à biopsia seguida de exame cultural. 95% das linfadenites são causadas por NTM, uma vez que estas têm uma distribuição ubíqua no meio ambiente (Lito *et al.*, 2013).

6.4 Osteomielite

MAC pode também causar osteomielite, sobretudo em doentes com SIDA, apesar da incidência ser rara (Bhatia *et al.*, 2011).

A osteomielite é uma inflamação do tecido ósseo causada por um agente infeccioso. Esta infeção poderá evoluir para a medula óssea, prejudicando a circulação sanguínea local, tendo como conseqüência a morte do osso e a ineficácia da ação de antibióticos. Os sintomas, nas crianças ou adultos, podem ir desde febre a dor no osso, ou dor no movimento, por inchaço da zona por cima do osso e por formação de abscessos nos tecidos adjacentes. Na ausência de tratamento atempado, a osteomielite pode evoluir para osteomielite crónica com supuração constante através da pele. O diagnóstico é realizado através de radiografia, tomografia axial computadorizada (TAC) e ressonância magnética. Para identificação da bactéria, utilizam-se amostras clínicas como sangue, pus

e líquido articular. A nível das vértebras, são extraídas amostras do tecido ósseo (Manualmerck, 2009).

6.5 Doença de Crohn

Mycobacterium avium spp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico da enterite granulomatosa crónica em ruminantes (doença de Johne ou paratuberculose) bem como em muitos outros mamíferos (Chamberlin *et al.*, 2001; Thorel, Krichevsky e Lévi-Fébault, 1990). Os animais são geralmente infetados por ingestão, através do solo, ração, água e objetos existentes na exploração, que estejam contaminados com fezes de animais infetados. Esta bactéria é conhecida por sobreviver a condições ambientais adversas, principalmente em regiões com solos ácidos (Chamberlin *et al.*, 2001; Liverani *et al.*, 2014).

Devido à semelhança clínica e histológica entre a doença de Johne e a doença de Crohn (enterite granulomatosa crónica), que ocorre em seres humanos, acredita-se que MAP possa estar também envolvida na doença de Crohn. A doença de Crohn é uma degeneração inflamatória crónica que afeta principalmente a parte inferior do intestino delgado (íleo) e intestino grosso (cólon), no entanto pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal (Thorel, Krichevsky e Lévi-Fébault, 1990). Esta degeneração é caracterizada pelo espessamento da parede intestinal, levando à formação de úlceras e fissuras intestinais (Seeley *et al.*, 2001a). É caracterizada pela presença de uma inflamação transmural e segmentar, podendo intercalar-se áreas inflamadas com áreas saudáveis e, ainda, pelo aparecimento de ulcerações, fistulas, estenoses e granulomas (Rubin *et al.*, 2006)

Na fase inicial desta patologia, o intestino apresenta edema na mucosa e submucosa, com consequência na perda do padrão normal de pregas transversais e no aparecimento de ulcerações hemorrágicas que, com o decorrer do tempo, dão origem a fissuras (Friedman e Blumberg, 2002).

Os sintomas desta patologia são diarreia, dor abdominal, febre e perda de peso (Seeley *et al.*, 2001a). A Doença de Crohn está similarmente associada a uma multiplicidade de manifestações extra-intestinais, sendo as mais constantes as complicações oculares, dermatológicas, urológicas, reumatológicas e hepatobiliares (Hovde e Moum, 2012).

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Para esclarecer a hipótese da participação do MAP na doença de Crohn, tem-se tentado a identificação de MAP a partir de cultura de tecido intestinal, amostras de leite materno e sangue de doentes. No entanto, por ser uma bactéria de crescimento lento e por a sua cultura ser difícil (carece de alguns requisitos), também se tem optado pela realização de hibridização *in situ* e amplificação por PCR em amostras de sangue, fezes e biópsias, utilizando como alvo a sequência IS900 (Liverani *et al.*, 2014; Castellanos *et al.*, 2010). MAP depende da adição de micobactina para a sua replicação (substância lipossolúvel que permite utilização do ferro).

MAP está presente em redes de abastecimento de água, produtos lácteos e em carne. É capaz de sobreviver aos métodos de pasteurização, sendo por isso possível a sua disseminação através do leite de vaca. Contudo não existem estudos que garantam que o agente etiológico da doença de Crohn seja o MAP, uma vez que este pode ser um colonizador secundário. Esta patologia parece resultar da ação simultânea de vários fatores desencadeantes, incluindo genéticos, podendo também estar envolvido MAP e/ou outras bactérias específicas (Liverani *et al.*, 2014).

Devido ao seu fenótipo esferoplástico nos tecidos humanos, MAP não pode ser identificado pela coloração de Ziehl-Neelsen. Além disso, antibióticos que apresentem como mecanismo de ação a interferência com a síntese da parede bacteriana (como as penicilinas e cefalosporinas) não têm eficácia. Para evitar resistências, deve fazer-se uma combinação de antibióticos com rifampicina e derivados de macrólidos, como a claritromicina e azitromicina, as quais apresentam eficácia para qualquer espécie do MAC. Estudos *in vitro* também demonstraram a eficácia de Azatioprina e outros imunossuppressores como Ciclosporina e Metotrexato a inibir crescimento de MAP (Liverani *et al.*, 2014).

7 Diagnóstico das micobacterioses

O diagnóstico diferencial entre a tuberculose e as micobacterioses por NTM é importante, porque ambas apresentam diferenças tanto no prognóstico como no tratamento. Existem métodos de caracterização fenotípica e genotípica.

7.1 Caracterização Fenotípica

A identificação fenotípica consiste em métodos convencionais como a baciloscopia, a determinação da velocidade de crescimento de unidades formadoras de colónias (UFC) em meios adequados, a observação da produção de pigmentos pelas micobactérias e a realização de testes bioquímicos.

A baciloscopia é um exame para a pesquisa das micobactérias em espécimes biológicos, consistindo na pesquisa direta de B.A.A.R., em esfregaços de amostras clínicas, preparados e corados com metodologia padronizada. Apresenta várias vantagens, como o facto de ser um teste rápido, barato e fácil, no entanto, com pouca sensibilidade (Griffith *et al.*, 2007; Ministério da Saúde, 2008).

Devido à presença de grandes quantidades de lípidos na parede celular (ácidos micólicos) que causam hidrofobicidade, há dificuldade na remoção do corante pelo solvente. O procedimento com a coloração pela fucsina a quente, faz com que as micobactérias não descorem por uma mistura de álcool e ácido clorídrico. O método consiste na adição de fucsina ao esfregaço a quente e de seguida, a adição de uma mistura de ácido clorídrico (3%) e álcool (97%). Após a lavagem com água, coloca-se azul-metileno no esfregaço. Deste modo, as bactérias B.A.A.R. adquirem a cor da fucsina (cor vermelha) e as outras não retêm o corante, ficando com a cor do azul-metileno, funcionando como contraste (Figura 9) (Ferreira e Ávila, 2001).

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

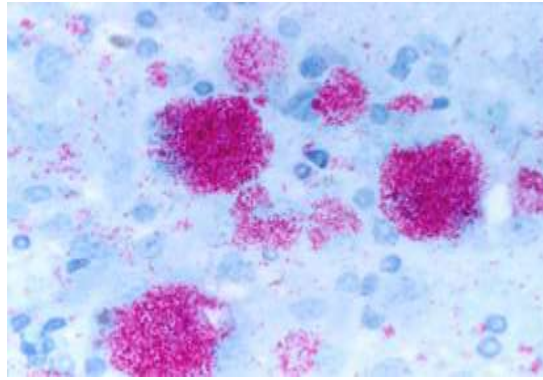


Figura 9 - Bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaço de tecidos (Ziehl- Neelsen) (Adaptado de Coelho *et al.*, 2008).

O *M. tuberculosis* apresenta a formação de aglomerados lineares com aspeto de corda, que podem ser observados em esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen, ao contrário do *M. avium*, que apresenta bacilos individualizados (Figura 10) (Ministério da Saúde, 2008).

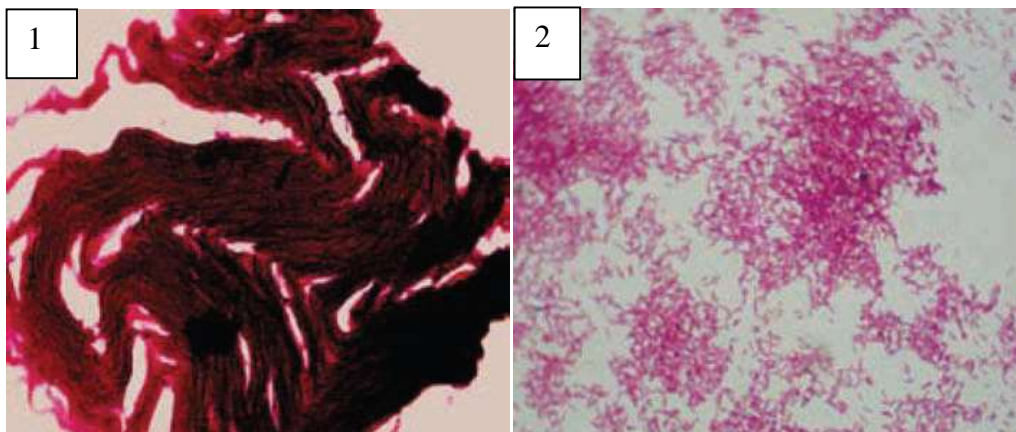


Figura 10 - Aspetos das micobactérias em esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen. Legenda: 1- *M. tuberculosis*, 2- *M. avium* (Adaptado de Ministério da Saúde, 2008).

A identificação de uma amostra clínica é normalmente realizada através das características culturais (morfologia das colónias e sua pigmentação), da temperatura e taxa de crescimento e dos resultados obtidos nos testes bioquímicos, o que poderá levar várias semanas.

É necessário tempo para o crescimento das colónias, por serem de crescimento lento. O MAC é caracterizado por crescer melhor em meios que tenham ovos ou gema destes, com uma temperatura definida entre 37°C a 40°C. Os meios podem ser meio Dorset's Herrold's (gema de ovo), Middlebrook 7H10 e 7H11 ou meio suplementado

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

com piruvato de sódio a 1%. Como exceção, o MAP e *M. silvaticum* são dependentes de micobactina (Coelho *et al.*, 2013).

Nos doentes com SIDA, o diagnóstico é normalmente realizado por hemocultura em sistema automatizado BACTEC (meio inclui ácido palmítico marcado com C-14 radioativo, sendo este libertado aquando o metabolismo das micobactérias). Por ser difícil a diferenciação de *M. avium* e *M. intracellulare* com testes convencionais, que consistem na avaliação das características culturais e na realização de testes bioquímicos, nomeadamente redução de nitrato, hidrólise de tween 80, hidrólise de urease, atividade da catálase e tolerância a cloreto de sódio, podem ser utilizados outros testes como a seroaglutinação, cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) na deteção de ácidos micólicos, e de serotipos por ELISA (apresentando como desvantagem, ser dependente da fase da doença, apresentando, por isso, maior sensibilidade com uma maior carga bacteriana) (Coelho *et al.*, 2013). De facto, o ensaio imunoenzimático (EIA) é também utilizado para diagnóstico sorológico da doença, pela identificação de GPLs, que são antígenos de superfície de MAC (Kobayashi, 2014). No entanto, a serotipagem apresenta algumas desvantagens, salientando-se a produção de dados inconsistentes entre os laboratórios, não sendo por isso um método ideal para a identificação do MAC (Schorey e Sweet, 2008; Devallois *et al.*, 1997).

Apesar dos testes convencionais serem simples de executar, são muito demorados, atrasando a identificação. No entanto, estes testes permanecem e constituem o procedimento principal na identificação de micobactérias, especialmente nos laboratórios de baixos recursos económicos (Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria, 2004).

As principais limitações dos métodos fenotípicos consistem na demora na obtenção de resultados e na dificuldade de diferenciar as diversas espécies, podendo levar a resultados duvidosos de identificação.

7.2 Caracterização genética

De entre os isolados de *M. avium*, já foram descobertos e identificados vinte e oito serotipos, distribuídos por diferentes subespécies. Cada subespécie tem o seu nível de seletividade para o órgão alvo e possui diferentes elementos genómicos móveis, designados de sequências de inserção (IS). Deste modo, existem quatro IS descritas para o MAC: IS1245, IS1311, IS900 e IS901. MAP apresenta as IS1311 e IS900, esta última

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

um marcador altamente específico para MAP. IS1245 está presente no MAA, MAH e MAS, mas não em MAP e em *M. intracellulare*. A IS1311 está estreitamente relacionada com a IS1245. IS1311 está presente em todas as subespécies de *M. avium*, mas não em *M. intracellulare*. O MAA é caracterizado pela sequência de inserção IS901, IS1245 e IS1311, correspondendo aos serotipos 1-3. O MAH apresenta as IS1245 e IS1311, correspondendo aos serotipos 4-6, 8-11 e 21. O MAS possui IS901, IS1245 e IS1311 (Rindi e Garzelli, 2013; Hibiya *et al.*, 2011).

A taxonomia atual tem por base as características bioquímicas e a análise genética, por RFLP ("restriction fragment length polymorphism"), por MLSA ("multi-locus sequence analysis"), por PCR ("polymerase chain reaction"), e por hibridização *in situ* em amostras de tecido (Johansen *et al.*, 2009; Balows *et al.*, 1991). A sequenciação do gene *hsp65* tem também sido usada em diagnóstico para a diferenciação das subespécies do MAC (Park *et al.*, 2010). Os métodos de tipagem molecular têm desempenhado um importante papel na capacidade de discriminar isolados microbianos e, ao mesmo tempo, estabelecer uma relação clonal entre linhagens relacionadas (Park *et al.*, 2010).

A técnica de PCR para amplificação e detecção de IS, relativamente fácil de executar, é utilizada como análise de primeira linha, ou como complemento para os métodos clássicos MLSA e RFLP (Radomski *et al.*, 2010).

A tecnologia de RFLP é baseada na detecção de certas IS no DNA cromossômico, através da digestão do DNA genômico, com enzimas de restrição específicas e, posterior análise dos padrões gerados após a separação dos fragmentos de DNA em gel de agarose (Kanduma *et al.*, 2003). Podem ser identificados fragmentos de restrição que passam a funcionar como marcadores moleculares diagnosticantes. Apresenta como vantagem, não necessitar de informação prévia sobre o DNA no entanto analisa apenas uma fração do genoma (Powell *et al.*, 1996).

A técnica de MLSA, baseia-se na análise de genes *housekeeping* num genoma (Delamuta *et al.*, 2012). Tem sido usada para análise de polimorfismos genéticos de um único nucleótido, (SNPs - "single nucleotide polymorphisms"). Os estudos dos SNPs têm sido úteis para fins epidemiológicos e diferenciação de organismos de *M. avium* (Rindi e Garzelli, 2013).

Recentemente, é utilizada uma técnica que estuda o número variável de unidades repetitivas (MIRU-VNTR: MIRU, *mycobacterial interspersed repetitive units* e VNTR,

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

variable number of tandem repeats) (Radomski *et al.*, 2010). Estas técnicas são usadas para a caracterização molecular das espécies *M. avium* spp. *paratuberculosis* e *M. avium* isoladas em doentes com SIDA sendo um novo padrão de genotipagem. O MIRU-VNTR utiliza a variabilidade, na quantidade de repetições em *tandem* de MIRUs, em diferentes *loci* no genoma das linhagens de *M. avium*. MIRU-VNTR é um método de tipagem que permite diferenciar as subespécies de quaisquer espécies de MAC.

7.3 Diagnóstico Infecção pulmonar - critérios específicos

Os critérios de diagnóstico da doença pulmonar devido a MAC incidem sobre os aspetos clínico e microbiológicos. As culturas positivas de MAC, a partir de expetoração, não confirmam por si só a infeção por MAC, pois pode haver presença de saprófitas (Kobayashi, 2014).

A American Thoracic Society (ATS) em associação com a Infectious Diseases Society of America (IDSA) publicou, em 2007, um documento com a definição dos critérios de diagnóstico para as NTM (Tabela 4) (Campos, 2000).

Tabela 4 - Diagnóstico de doença pulmonar por NTM (Adaptado de Campos, 2000).

Crítérios clínicos e radiológicos:
1. Sintomas respiratórios associados a opacidades nodulares ou cavidades na radiografia e/ou bronquiectasias e múltiplos pequenos nódulos na tomografia computadorizada de tórax,
E
2. Exclusão de outros diagnósticos, especialmente a tuberculose.
Crítérios microbiológicos:
1. Cultura positiva em duas amostras diferentes de expetoração.
Ou
2. Uma cultura positiva por escovado ou lavado bronco-alveolar.
Ou
3. Biópsia pulmonar: processo crônico granulomatoso e/ou B.A.A.R. no tecido associado à cultura positiva em tecido, expetoração ou lavado broncoalveolar.

7.4 Diagnóstico Infecção disseminada - critérios específicos

Normalmente o método de diagnóstico da infecção disseminada é por hemocultura positiva para MAC. Para doentes sintomáticos que apresentem duas hemoculturas positivas, a biopsia e a cultura da medula óssea é indicado (Griffith *et al.*, 2007). No entanto, também se pode fazer a identificação a partir de amostras de fezes, sangue, urina, saliva, etc. Se existe suspeita que haja algum órgão infetado, através de uma biopsia poderemos concluir se estamos perante MAC, fazendo um esfregaço ácido-resistente (Kiehn *et al.*, 1985).

Os testes que se realizam aquando duma suspeita de MAC em doenças disseminadas, passam pela digestão e inoculação de expectoração com N-acetilcisteína com 1% de concentração final de NaOH (usado para descontaminação ou eliminação de muco pela ação da N-acetilcisteína). Posteriormente, as amostras serão inoculadas, nos meios de Lowenstein-Jensen e meio seletivo de agar Mitchison 7H11. Para a deteção de manchas ácido-resistentes utiliza-se auramina (Kiehn *et al.*, 1985). A coloração de Auromina-Rodamina é uma técnica de fluorescência, que utiliza a coloração de auramina. Assim, posteriormente serão visualizados os bacilos, quando expostos a microscopia de fluorescência (Zhang *et al.*, 1998).

Podemos assim concluir, que os testes de identificação usados nas infeções pulmonar e disseminada são os gerais, mas as amostras é que poderão ser diferentes consoante a doença.

8 Tratamento do MAC

Devido à sua camada exterior lipofílica, os medicamentos hidrofílicos apresentam fraca penetração (Schorey e Sweet, 2008).

Em geral, uma infecção por MAC é tratada com três a quatro combinações de antibióticos e pelo menos durante doze meses. Os fármacos de primeira linha são os macrólidos, tais como a claritromicina e azitromicina, etambutol, rifampicina e rifabutina. Em doentes que apresentem lesões cavitárias, são usados aminoglicosídeos, como a estreptomicina e a amicacina (Carrasco *et al.*, 2014).

Os macrólidos apresentam boa atividade contra MAC. Quando a claritromicina é administrada sozinha e em combinação com a rifabutina, apresenta eficácia, tanto no tratamento, como na profilaxia de infecção disseminada causada por MAC, em indivíduos com SIDA. A claritromicina, apesar de apresentar boa atividade, deve ser tomada concomitantemente com etambutol e rifamicina, para evitar a ocorrência de resistências a esta. A rifabutina apresenta maior eficácia do que rifampicina, mas também mais efeitos colaterais, como uveíte e leucopenia (Field *et al.*, 2004).

O tratamento de doença pulmonar requer previamente que os doentes apresentem um quadro de infecção consistente e a confirmação de três ou mais amostras clínicas de expectoração com resultado positivo, ou duas amostras positivas, apenas quando uma destas for baciloscopia. A terapêutica é constante por um ano, até que a amostra de expectoração apresente resultado negativo e é composta por combinações de um macrólido (claritromicina (500-1000mg) ou azitromicina (500mg)), uma rifamicina (rifampicina (600 mg) ou rifabutina (150-300mg)) e etambutol (15mg/Kg). Nas primeiras oito semanas de terapêutica também será administrada estreptomicina (Field *et al.*, 2004). Este tratamento deve ser contínuo por um ano até o resultado da amostra de expectoração ser negativo (Campos, 2000).

Na maioria dos casos de linfadenite cervical devido a MAC, o tratamento é por excisão cirúrgica, apresentando uma taxa de cura de 90%. No entanto, poderá ser realizado um regime à base de macrólidos em doentes que apresentem uma extensa linfadenite ou uma resposta negativa ao tratamento cirúrgico (Griffith *et al.*, 2007; Campos, 2000).

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Nestes casos é realizada uma terapêutica de claritromicina (1000mg) ou azitromicina (500mg), rifampicina (600mg) e etambutol (25mg/Kg) três vezes por semana (Griffith *et al.*, 2007).

A terapêutica da doença disseminada é semelhante à utilizada nas apresentações já referidas. A profilaxia inclui azitromicina ou claritromicina. A rifabutina também é eficaz, embora menos tolerada. Esta deve ser administrada a doentes com SIDA que apresentem linfócitos TCD4 menor de 50 células/ μ l (Griffith *et al.*, 2007).

9 Mecanismos de ação

9.1 Antibioterapia geral

9.1.1 Macrólidos

Fazem parte dos agentes antimicrobianos que comprometem a síntese proteica bacteriana. A estrutura química destes consiste num anel lactona, ao qual estão ligados diferentes resíduos, entre eles desoxiaçúcares. Os macrólidos atuam inibindo a síntese proteica bacteriana e podem ser classificados como bactericidas ou bacteriostáticos, consoante a dosagem e o tipo de microrganismo. Relativamente ao tempo de semi-vida, a azitromicina é a que apresenta maior (cerca de oito a dezasseis vezes maior do que a eritromicina, que apresenta noventa minutos). Relativamente aos efeitos adversos, o mais frequente são os distúrbios gastrintestinais (Rang *et al.*, 2008).

A claritromicina e a azitromicina são ativas contra *M. avium*.

9.1.2 Rifampicina e Rifabutina

O seu mecanismo de ação deve-se à ligação e inibição da RNA-polimerase dependente de DNA e das células procarióticas. A rifampicina (Figura 11) e a rifabutina, ambas derivadas da rifamicina B, são moléculas lipofílicas, permitindo que os fármacos atravessem a parede celular e atinjam elevadas concentrações intracitoplasmáticas nos fagócitos, desenvolvendo efeito bactericida. Assim, atuam sobre os microrganismos intracelulares. O seu tempo de semi-vida é de uma a cinco horas e são administrados oralmente. A rifampicina apresenta frequentemente efeitos adversos, entre os quais podemos salientar erupções cutâneas, febre e distúrbios gastrintestinais. (Rang *et al.*, 2008; Somoskovi *et al.*, 2001). O uso prolongado de rifabutina pode provocar efeitos que vão desde náuseas, icterícia e vômitos a broncospasmos (MenteAcida, 2011).

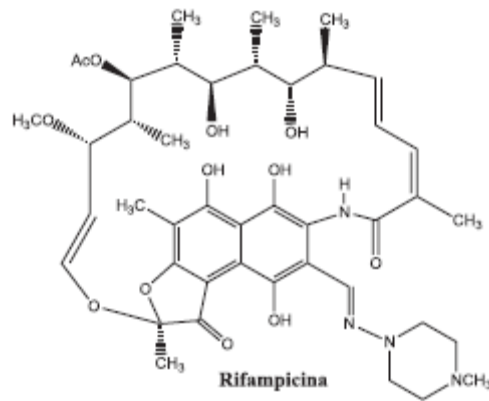


Figura 11 - Estrutura Rifampicina (Adaptado de Souza e Vasconcelos,2005).

9.1.3 Etambutol

A sua atividade é exclusiva contra micobactérias, exercendo um efeito bacteriostático, sendo apenas ativo contra bactérias em crescimento. É administrado oralmente e apresenta um tempo de semi-vida de três a quatro horas. Normalmente não causa efeitos adversos mas, esporadicamente, pode causar perturbação na visão, designada de neurite óptica (Rang *et al.*, 2008). O etambutol (Figura 12) interfere na biossíntese de arabinogalactano. Especificamente, vai inibir a enzima arabinosil transferase codificada pelo gene *embB*, responsável pela polimerização de arabinose para arabinogalactano. A resistência ao etambutol *in vitro* desenvolve-se de maneira lenta e provavelmente acontece por mutação do gene *embB* (Sousa, 2006; Arbex *et al.*, 2010a).

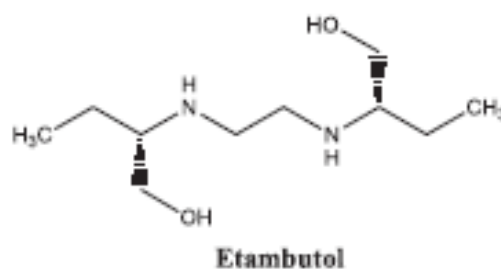


Figura 12 - Estrutura Etambutol (Adaptado de Souza e Vasconcelos,2005).

9.1.4 Aminoglicosídeos (estreptomicina e amicacina):

Neste grupo insere-se a estreptomicina, a amicacina e a canamicina.

A estreptomicina, isolada em 1944, foi o primeiro fármaco eficaz utilizado no tratamento da tuberculose. Mais tarde, foi sintetizada a canamicina em 1957 e, em 1972, surge a amicacina, composto semissintético derivado da canamicina (Arbex *et al.*, 2010b).

Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica, ao ligarem-se de forma irreversível à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, interferindo na integridade da membrana celular. São fármacos bactericidas, com efeitos mesmo em concentração sérica abaixo da concentração mínima inibitória (MIC) (Arbex *et al.*, 2010b).

9.1.5 Outros fármacos usados em profilaxia: ciprofloxacina e clofazimina

9.1.5.1 Fluorquinolona: Ciprofloxacina:

A ciprofloxacina é um antibiótico bactericida, que pertence à família das fluorquinolonas. Após a administração, as fluorquinolonas distribuem-se pelo organismo, atingindo o interior das células, incluindo os macrófagos (apresentam elevada lipossolubilidade), explicando, assim, a grande atividade sobre as micobactérias intracelulares (Arbex *et al.*, 2010b).

O seu mecanismo de ação consiste em inibir a atividade da DNA girase ou da topoisomerase II bacteriana, que regula a topologia do DNA e é essencial à sobrevivência da bactéria (Arbex *et al.*, 2010b).

As fluoroquinolonas têm evoluído muito desde da sua descoberta. Com o passar dos anos, tem-se manipulado a molécula original (Figura 13), com o objetivo de se obter um antibiótico mais eficaz e com uma menor toxicidade para o indivíduo. As modificações na estrutura básica das quinolonas, permitiram a descoberta de novos antibióticos com maior espectro de atividade, maior potência antibacteriana e melhor biodisponibilidade (Andersson e MacGowan, 2003).

Com a introdução de um átomo de flúor na posição C-6 e um grupo piperazila na posição C-7, identificou-se a primeira fluorquinolona, designado de norfloxacino, patenteada em 1978 (Souza e Vasconcelos, 2005).

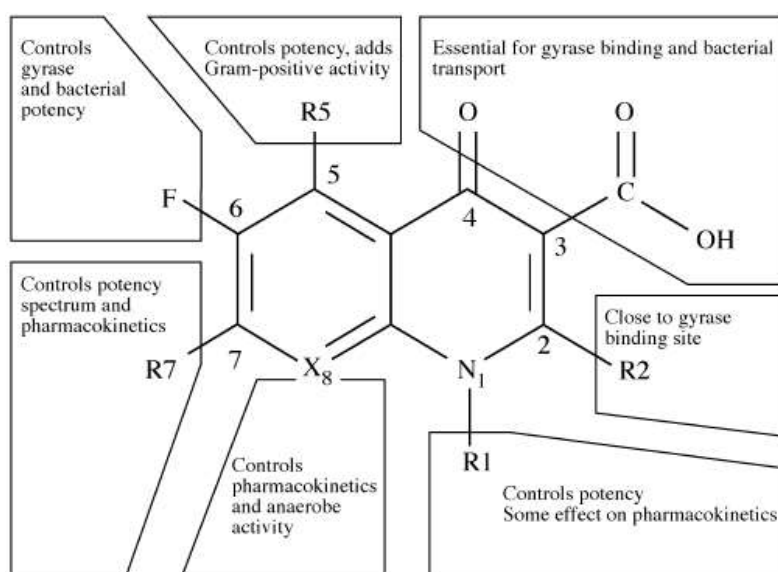


Figura 13 - Estrutura básica das quinolonas (Adaptado de Andersson e MacGowan, 2003).

9.1.5.2 Clofazimina:

A clofazimina é um antibacteriano e anti-inflamatório que se encontra em uso clínico há quarenta anos, originalmente desenvolvida para o tratamento da tuberculose (Boechat e Pinheiro, 2012). É um fármaco de segunda escolha para o tratamento da lepra (causada por *M. leprae*), além de ser também utilizado contra infecções causadas por micobactérias atípicas (incluindo MAC). A clofazimina é uma fenazina (Figura 14) e o seu mecanismo de ação ainda está pouco esclarecido. No entanto, suspeita-se que inibe o crescimento micobacteriano, ligando-se preferencialmente ao DNA da micobactéria. Pode causar alterações gastrintestinais, por se depositar no intestino delgado originando um espessamento deste, acompanhado por cólicas e vermelhidão da pele, ao ser captado por macrófagos cutâneos, pois é um corante (Guimarães *et al.*, 2006; MedicinaNet, s/d).

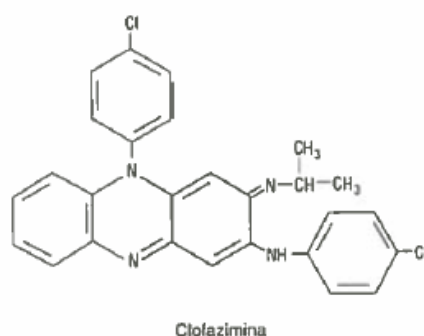


Figura 14 - Estrutura da clofazimina (Adaptado de Altman *et al.*, 1995).

10 Conclusão

O desenvolvimento científico permitiu a descoberta de cada vez mais espécies micobacterianas.

O MAC é composto por bactérias patogênicas oportunistas com a capacidade de causar doença, tanto em animais como em humanos. Como as bactérias pertencentes a este complexo são ubíquas no ambiente, a sua interação com o homem é bastante frequente. Ao contrário do que acontece com *M. tuberculosis*, a transmissão direta pessoa-a-pessoa é raro em NTM, incluindo MAC, ocorrendo sobretudo o contágio com fontes ambientais, como inalação ou ingestão de água contaminada.

Embora *M. tuberculosis* continue a ser a espécie micobacteriana mais prevalente afetando milhões de pessoas no mundo, com o surgimento da SIDA as micobactérias pertencentes ao MAC, às quais não era atribuída grande relevância clínica, passaram a ser vistas como agentes patogênicos oportunistas, que originam infecção disseminada em indivíduos imunodeficientes. No entanto, as MAC podem também causar infecção em indivíduos imunocompetentes, sobretudo com algum fator predisponente. Entre as infecções provocadas pelo MAC, a infecção pulmonar é a mais relevante, sobretudo em indivíduos imunocompetentes.

As espécies e subespécies pertencentes ao MAC não são facilmente diferenciadas por testes fenotípicos, sendo os métodos moleculares, portanto, a melhor opção atual para a identificação dessas micobactérias. O estudo da interação entre as MAC e o sistema imunitário é de grande importância, para encontrar novas terapêuticas que levem à erradicação das infecções provocadas por este tipo de micobactérias.

11 Bibliografia

Agdestein, A., *et al.* (2014). Intracellular growth of *Mycobacterium avium* subspecies and global transcriptional responses in human macrophages after infection. *BMC Genomics*, pp. 15-58.

AIDS. GOV. (2014). Tratamento das infecções oportunistas do HIV (IO). [em linha]. Disponível em < <http://www.aids.gov.br/pcdt/16>>. [Consultado em 22/3/2015].

AIDS.GOV.(s/d). Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. [Em linha]. Disponível em < <http://www.aids.gov.br/pagina/o-que-e-hiv>>. [Consultado em 22/01/2015].

Altman, D. F. M., *et al.* (1995). Agentes antibacterianos. In: Editora Afiliada. *Farmacologia Básica & Clínica*, 6º edição ed., pp.543-544.

Andersson, M. I. e Macgowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother*, 51(1), pp. 1-11.

Antidrogas. (2000). SOS vida. [em linha]. Disponível em < <http://www.antidrogas.com.br/mostrasosvida.php?c=28>>. [Consultado em 20/3/2015].

Arbex, M. A., *et al.* (2010a). Fármacos antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 1: fármacos de primeira linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36, pp. 626-640.

Arbex, M. A., *et al.* (2010b). Fármacos antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 2: fármacos de segunda linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36, pp. 641-656.

Arosa, F.A., Cardoso, E.M. e Pacheco, F.C. (2012). *Fundamentos de Imunologia*, Lisboa, Lidel.

Balcewitz-Sablinska, M.K., Gan, H. e Remold, H.G. (1999). Interleukin 10 Produced by Macrophages Inoculated with *Mycobacterium avium* Attenuates Mycobacteria-Induced Apoptosis by Reduction of TNF- α Activity. *The Journal of Infectious Diseases*, 180, pp.1230-7.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Balows, A., *et al.* (1991). *Mycobacterium*. In: American Society of Microbiology (Ed.) Manual of clinical Microbiology. 5ª edição ed. Washington, DC, American Society for microbiology, pp. 304-340.

Barrow, W.W. (1997). Processing of Mycobacterial lipids and effects on host responsiveness. *Frontiers in Bioscience* 2, pp. 387-400.

Behar, S. M, *et al.* (2011). Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.*, 4(3), pp. 279–287.

Bermudez, L. E., *et al.* (2000). Mechanisms of *Mycobacterium avium* Pathogenesis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 48, pp.521-527.

Bhatia, K., *et al.*, 2011. An anterior expandable titanium cage in *Mycobacterium avium* vertebral osteomyelitis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 18(3), pp.431–434.

Boechat, N. e Pinheiro, L.C.S. (2012). A Hanseníase e a sua Quimioterapia. *Rev. Virtual Quim.*, 4(3), pp. 247-256.

Borel, J.-P., *et al.* (1999). Doenças dos glóbulos brancos: leucemias, deficiências imunitárias. In: Borel J.-P. (Ed.). *Bioquímica para o clínico*. Lisboa, Éditions Frison Roche, pp. 292-94.

Brooks, G.F, Butel, J.S., Morse, S. A. (2005). Micobactérias. In: The Mc Graw-Hill Companies (Ed.) *Microbiologia Médica*. 22ª edição ed., pp. 259-266.

Campos, H. S. (2000). Manejo da doença micobacteriana não-tuberculosa, *Boletim de pneumologia sanitária*, 8(2), pp.39-50.

Carrasco, J., *et al.* (2014). Infección Pulmonar por *Mycobacterium avium* en paciente VIH/SIDA: primer reporte en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* , 31(1), pp.156-159.

Castellanos, E., *et al.* (2010). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Types II and III isolates by a combination of MIRU–VNTR loci. *Veterinary Microbiology*, 144, pp.118-126.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

CDC. (2013). Introduction to the Core Curriculum on Tuberculosis. Division of Tuberculosis Elimination, 6ªed., pp. 21-39.

Chamberlin, W., *et al.* (2001). Review article: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15(3), pp.337-346.

Coelho, A. C., *et al.* (2013). *Mycobacterium avium* Complex in Domestic and Wild Animals, *INTECH*, pp. 54323.

Coelho, A.C., *et al.* (2008). Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de paratuberculose ovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60 (5), pp.1097-1112.

Coelho-Castelo, A.A.M., *et al.* (2009). Immune response to infectious diseases. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 42, pp. 127-142.

Daudel, R., Montagnier, L. (1994). A SIDA. Lisboa, Instituto Piaget : Daudel, R. e Montagnier, L. (1994). A Sida – Uma doença complexa. *In*: Daudel, R. e Montagnier, L. (Ed.) *A Sida*. Lisboa, Gráfica Manuel Barbosa & Filhos Lda, pp 33-7.

Delamuta, J.R.M., *et al.* (2012). Multilocus sequence analysis of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, pp.698-710.

Devallois, A., *et al.* (1997). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates giving discordant results in AccuProbe tests by PCR-restriction enzyme analysis, 16S rRNA gene sequencing, and DT1-DT6 PCR. *J Clin Microbiol*, 35, pp. 2767-72.

Ferreira, R., Riffel, A. e Sant'Ana, A. (2010). HIV: Mecanismos de replicação alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. *Quim nova*, 33, pp.1743-1755.

Ferreira, A. e Ávila, S. (2001). *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Ferreira, W e Sousa, J (2000). *Microbiologia, Volume 2*, Lisboa, Lidel, edições técnicas, Lda.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Field, S. K., *et al.* (2004). *Mycobacterium avium* complex Pulmonary Disease in Patients Without HIV Infection. *Chest*, 126(2), pp. 566-581.

Fratazzi, C., *et al.* (1999). Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *Journal of Leukocyte Biology*, 66, pp.763-764.

Friedman, S. e Blumberg, R. (2002). Doença inflamatória intestinal. In: Braunwald *et al* (Ed.) Harrison Medicina Interna. 15º ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, pp. 1779-1971.

Fundação Portuguesa do Pulmão. (2009). Bronquiectasias. [em linha]. Disponível em <<http://www.fundacaoportuguesadopulmao.org/bronquiectasias.html>>. [Consultado em 20/6/2015].

Ganguly *et al.* (2008). Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Elsevier*, 88(6), pp.510-517.

González-Pérez, M., *et al.* (2013). Virulence and immune response induced by *Mycobacterium avium* complex strains in a model of progressive pulmonary tuberculosis and subcutaneous infection in BALB/c Mice. *Journal Infection and Immunity*, 81(11), pp.4001-4012.

Griffith, E. D., *et al.* (2007). An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of respiratory and critical care medicine*, 175, pp.367-416.

Griffiths, T. A., *et al.* (2008). Sequence Polymorphisms in a Surface PPE Protein Distinguish Types I, II, and III of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), pp.1207-1212.

Guimarães, S., *et al.* (2006) . Quimioterapia anti-infecciosa. In: Porto Editora (Ed.). *Terapêutica Medicamentosa e suas bases farmacológicas*, p. 715.

Guirado, E., *et al.* (2012). Characterization of Clinical and Environmental *Mycobacterium avium* Spp. Isolates and Their Interaction with Human Macrophages. *PLoS ONE*.

Guirado, E., Schlesinger, L.S. e Kaplan, G. (2013). Macrophages in Tuberculosis: Friend or Foe. *Semin Immunopathol*, 35(5), pp. 563–583.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Hibiya, K., *et al.* (2011). Pigs as an experimental model for systemic *Mycobacterium avium* infectious disease. *Comparative immunology microbiology and infectious disease*, 34, pp.455-464.

Horsburgh, C.R. Jr. (1999). The Pathophysiology of Disseminated *Mycobacterium avium* Complex Disease in AIDS. *The Journal of Infectious Diseases*, 179 (3), pp.461-5.

Houben, E.N.G., *et al.* (2014). Take five — Type VII secretion systems of *Mycobacteria*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843, pp. 1707–1716.

Hovde, O. e Moum, B.A. (2012). Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies. *World J Gastroenterol*, 18, pp.1723-31.

-Hsu, F.-F., *et al.* (2012). Structural Determination of Glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* by High Resolution Multiple-stage Linear Ion-trap Mass Spectrometry with Electrospray Ionization. *J Mass Spectrom*, 47 (10), pp. 1269-1281.

Inderlied, C. B., *et al.* (1993). The *Mycobacterium avium* Complex. *Clin. Microbiol. Ver*, 6(3), pp.266-310.

Johansen, T. B., *et al.* (2009). Biofilm formation by *Mycobacterium avium* isolates originating from humans, swine and birds. *BMC Microbiology*, 9(159), pp.1471-80.

Johnson, M. M. e Odell, J.A. (2014). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*, 6(3), pp.210-220.

Jordão, L. e Vieira, O.V. (2011). Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. *International Journal of Cell Biology*, 403623.

Kanduma, E., Mchugh., T.D. e Gillespie, S.H. (2003). Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *Journal of Applied Microbiology*, 94, pp.781–791.

Karakousis, P.C., Moore, R.D. e Chaisson, R.E. (2004). *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(9), pp.557–565.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Kiehn, T. E., *et al.* (1985). Infections Caused by *Mycobacterium avium* Complex in Immunocompromised Patients: Diagnosis by Blood Culture and Fecal Examination, Antimicrobial Susceptibility Tests, and Morphological and Seroagglutination Characteristics. *Journal of clinical microbiology*, 21(2), pp. 168-173.

Kobayashi, K. (2014). Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* Complex Disease in Humans: Translational Research from Basic Mycobacteriology to Clinical Medicine. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 67, pp.329-332.

Koh, W.J., *et al.* (2012). Clinical Significance of the Differentiation Between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in *M avium* Complex Lung Disease. *CHEST*, 142(6), pp. 1482-1488.

Lito, D., *et al.* (2013). Internamentos por Linfadenite Cervical num Serviço de Pediatria Geral. *Revista de pediatria do centro hospitalar do porto*, 22(4), pp.220-226.

Liverani, E., *et al.* (2014). *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon?. *World J Gastroenterol*, 20(36), pp.13060-70.

Manualmerck. (2009). Osteomielite. [em linha]. Disponível em <<http://www.manualmerck.net/?id=79&cn=787>>. [Consultado em 22/3/2015].

ManualMerck. (2009a). Bronquiolite. [em linha]. Disponível em <<http://www.manualmerck.net/?id=286&cn=1527>>. [Consultado em 20/6/2015].

Mcnamara, M., Danelishvili, L. e Bermudez, L. E. (2012). The *Mycobacterium avium* ESX-5 PPE protein, PPE25-MAV, interacts with an ESAT-6 family Protein, MAV_2921, and localizes to the bacterial surface. *Microb Pathog*, 52, pp. 227-38.

MedicinaNet. (s/d.). Clofazimina. [em linha]. Disponível em <<http://www.medicinanet.com.br/bula/1555/clofazimina.htm>>. [Consultado em 26/6/2015].

MenteAcida. (2011). Rifabutina. [em linha]. Disponível em <<http://menteacida.com/rifabutina.htm>>. [Consultado em 20/5/2015].

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Micro.Magnet. (2005). The Human Immunodeficiency Virus (HIV). [em linha]. Disponível em <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/hivvirus.html>. [Consultado em 22/3/2015].

Microbiologybook,(s/d). Bacteriologia – micobactérias e corinobactérias. [em linha]. Disponível em < http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_16_bp.htm>. [Consultado em 20/4/2015].

Migliori, GB., *et al.*, (2007). 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic?. *Eur Respir J.*, 29(3), pp. 423-7.

Ministério da Saúde. (2008). Manual Nacional de Vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde.

Miranda, A. M. (2003).Evolução natural da infeção por VIH – Aspectos clínicos. Dossier VIH e SIDA. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, 19,pp.587-597.

Murray, P.R. *et al.* (2000). Mycobacterium. In: Guanabara Koogan (Ed.) *Microbiologia Médica*. 3º edição ed., pp. 266-269.

Naif, H. M. (2013). Pathogenesis of HIV Infection. *Infectious Disease Reports*, 5, pp. 26-30.

Nisengard, R. J. e Newman, M.G. (1994). O sistema Imune e as defesas do hospedeiro. *In: Editora Afiliada. Microbiologia oral e Imunologia*, 2º edição ed., pp.7-13.

Nishiuchi, Y., *et al.* (2007). The Recovery of *Mycobacterium avium intracellulare* Complex (MAC) from the Residential Bathrooms of Patients with Pulmonary MAC. *Clinical Infectious Diseases*, 45, pp. 347-351.

Orme, I.M. e Ordway, D. J. (2014). The host response to non-tuberculous mycobacterial infections of current clinical importance. *Infection and Immunity*,82 (9), pp. 3516–3522.

Park, J-H., *et al.* (2010). Molecular characterization of *Mycobacterium intracellulare*-related strains based on the sequence analysis of hsp65, internal transcribed spacer and 16S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*,59, pp. 1037-1043.

Paz, M. (2011). Micobactérias de Importância Humana. [Em linha]. Disponível em < <http://myslide.es/documents/micobacterias-de-importancia-humana-m-paz-microbiologia-2011.html>>. [Consultado em 26/5/2015].

Powell, W., *et al.* (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2(3), pp.225-238.

Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. (2004). [em linha]. Disponível em < <http://www.esmycobacteriology.eu/Inco.htm>>. [Consultado em 1/7/2015].

Radomski, N., *et al.* (2010). Determination of Genotypic Diversity of *Mycobacterium Avium* subspecies from Human and Animal Origins by Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit–Variable-Number Tandem- Repeat and IS1311 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), pp.1026-1034.

Rang, H.P., *et al.* (2008). Farmacos antibacterianos. In: Elsevier Editora, L. (Ed.) *Farmacologia*. 8ª edição ed., pp.661-678.

Rindi, L. e Garzelli, C. (2013). Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Elsevier*, 21, pp. 375-383.

Ringuet, H., *et al.* (1999). *hsp65* Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*, 37 (3), pp. 852-857.

Rose, S.J. e Bermudez, L.E. (2014). *Mycobacterium Avium* Biofilm Attenuates Mononuclear Phagocyte Function by Triggering Hyperstimulation and Apoptosis during Early Infection. *Infection and Immunity*, 82(1), pp. 405-412.

Rubin, E., *et al.* (2006). Rubin Patologia bases clinicopatológicas de medicina. 4ªed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 727-730.

Russell, D. G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*, 5, pp. 39-47.

Saldias, P. F., *et al.* (2013). Infección pulmonar por *Mycobacterium avium complex* en el huésped inmunocompetente. *Rev Chil Enf Respir*, 29, pp.162-167.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Sampson, S. L. (2011). Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface. *Clin Dev Immunol*, 2011, pp. 497203.

Schafran, S. D. (1998). Prevention and Treatment of Disseminated *Mycobacterium avium* Complex Infection in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *Int J Infect Dis*, 3, pp.39-47.

Schorey, J.S. e Sweet, L. (2008). The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology*, 18(11), pp.832-841.

Sechi, L.A. e Thomas Dow, C. (2015). *Mycobacterium avium* ss. paratuberculosis Zoonosis – The Hundred Year War – Beyond Crohn’s Disease. *Frontiers in immunology*, 6, pp.1–8.

Seeley, R., Stephens, T., Tate, P. (2001a). Aparelho Digestivo. In: Lusociência- Edições Técnicas E Científicas, L. (Ed.) *Anatomia & Fisiologia*. 6ª edição ed., pp. 874-916.

Seeley, R., Stephens, T., Tate, P. (2001b). Sistema Linfático e Imunidade . In: Lusociência- Edições Técnicas E Científicas, L. (Ed.) *Anatomia & Fisiologia*. 6ª edição ed., pp. 814-815.

Seeley, R., Stephens, T., Tate, P. (2001c). Aparelho respiratório. In: Lusociência- Edições Técnicas E Científicas, L. (Ed.) *Anatomia & Fisiologia*. 6ª edição ed., pp. 791-793.

Sida. Roche. (2015). O Vírus da SIDA. [em linha]. Disponível em <<http://sida.roche.pt/virus/ciclovida.cfm>>. [Consultado em 21/3/2015].

Soini, H. e Musser, J. M. (2001). Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clinical Chemistry*, 47(5), pp809-814.

Somoskovi, A., et al. (2001). The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*, 2, pp. 164-168.

Song, J. W., et al. (2008). High-Resolution CT Findings of *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex Pulmonary Disease: Correlation with Pulmonary Function Test Results. *AJR*, 191, pp. 160-166.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Sousa, J. (2006). Manual de Antibióticos Antibacterianos. Porto. Edições Universidade Fernando Pessoa. 2º Ed., pp 639-660.

Souza, C. *et al.*, (2013). Mannosylated Lipoarabinomannans from *Mycobacterium Avium* Subsp. *Paratuberculosis* Alters the Inflammatory Response by Bovine Macrophages and Suppresses Killing of *Mycobacterium Avium* Subsp. *Avium* Organisms. *PLoS ONE*.

Souza, M.V.N. e Vasconcelos, T.R.A. (2005). Fármacos no combate à Tuberculose: passado, presente e futuro. *Quim Nova*, 28(4), pp. 678-682.

Tereletsy, M.J. e Barrow, W.W. (1983). Postphagocytic detection of glycopeptidolipids associated with the superficial L1 layer of *Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun*, 41, pp. 1312–1321.

Thore, M-F., Krichevsky, M. e Lévy-Frébault, V. V. (1990). Numerical Taxonomy of Mycobactin-Dependent Mycobacteria, Emended Description of *Mycobacterium avium*, and Description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov. , *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov. , and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3), pp.254-260.

Uchiya, K., *et al.*(2013). Comparative Genome Analysis of *Mycobacterium avium* Revealed Genetic Diversity in Strains that Cause Pulmonary and Disseminated Disease. *PLoS ONE*.

Valle, L., Hernandez. R., Ávila, J. (2013). Oxidative stress associated to disease progression and toxicity during antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology & Microbiology*, ID 279685.

Van Zeller, M. ,*et al.* (2013). Nontuberculous mycobacteria --- presentation, diagnosis and response to treatment. *Rev. Port. Pneumol*, 19(1), pp.49-50.

Vander Beken, S. *et al.* (2011). Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. *Eur J Immunol*, 41, pp. 450-460.

World Health Organization. (2013). Global Tuberculosis Report 2013. World Health Organization, Geneva.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

World Health Organization. 2014. Tuberculosis Report 2014. World Health Organization, Geneve.

Zeharia, A., *et al.* (2008). Management of nontuberculous mycobacteria-induced cervical lymphadenitis with observation alone. *Ped Infect Dis J*. 27, pp.920-3.

Zhang, M. *et al.* (1998). Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. *Infect Immun*, 66, pp. 794-799.

12 Anexos

Anexo 1:

NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIAL OSTEOMYELITIS: A CASE REPORT OF MYCOBACTERIUM AVIUM INTRACELLULARE COMPLEX TIBIAL OSTEOMYELITIS IN THE SETTING OF HIV/AIDS

JOHN KADZIELSKI, MD, MICHAEL SMITH, BS, JOHANNA L. BARAN, MD, RAJESH GANDHI, MD, KEVIN RASKIN, MD
MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL

INTRODUCTION

Nontuberculous mycobacterial (NTM) osteomyelitis is rare and few cases have been reported in the literature.^{7,14,15} Although a case of NTM osteomyelitis has been reported in an immunocompetent child,⁴ in general people who develop these infections are likely to harbor immunodeficiencies such as HIV/AIDS.⁸ The following is a representative case of NTM osteomyelitis caused by mycobacterium avium complex (MAC) in a patient with HIV/AIDS, which reflects the important aspects of the multidisciplinary approach required to care for these complex patients.

CASE REPORT

The patient is a 51-year-old woman who was born in Mozambique and has lived in Zimbabwe, Portugal and Ohio, who presented with worsening left leg pain to an outside hospital 4 weeks after hitting her leg against a car doorframe sustaining a minor abrasion. The pain progressed to a point beyond which she could no longer tolerate and she sought medical attention. Her past medical history was significant for pneumonia, tinea corporis, recurrent vaginal yeast infections and genital herpes. She denied intravenous drug use and did report that her husband had been unfaithful. On initial examination

at the outside hospital, she was found to have an erythematous, warm, swollen and tender left leg with no disruption of the skin. X-rays showed cortical thickening of the left distal tibial diaphysis associated with a radiolucent defect. Bone scan showed focal periosteal reaction and adjacent soft tissue uptake. Computed tomography revealed left tibial and subcutaneous calcifications consistent with post-traumatic osteomyelitis. Routine admission laboratory analysis revealed neutropenia. She was subsequently tested for HIV and found to have HIV-1 infection with a CD4 cell count was 20/mm³ and a viral load of 51,371 copies/ml. Because her underlying diagnosis was unknown, she had not been on any antiretroviral therapy or opportunistic infection (OI) prophylaxis prior to presentation. She was empirically started on intravenous vancomycin and cefazolin. Five days after the initiation of antibiotics, she underwent bone biopsy. Both bone and blood cultures at that time were negative for any bacteria. Mycobacterial culture data from the outside hospital was not available. Bone pathology revealed osteonecrosis without mention of granulomas. She was started on a combination pill containing efavirenz, emtricitabine and tenofovir. A PICC line was placed and she developed a subclavian vein thrombosis. She was started on an enoxaparin bridge to warfarin with a plan of continuing systemic anticoagulation for 4 months. The patient was discharged to a state-run institution for continuing care needs and rehabilitation after a sixteen day hospital course on vancomycin and cephalexin, coumadin, combination antiretroviral therapy and prophylactic trimethoprim/sulfamethoxazole with azithromycin. Vancomycin was stopped after 6 weeks and oral cephalexin was continued.

John Kadzielski, MD
Harvard Combined Orthopaedic Residency Program
Boston, MA

Michael Smith, BS
Harvard Medical School

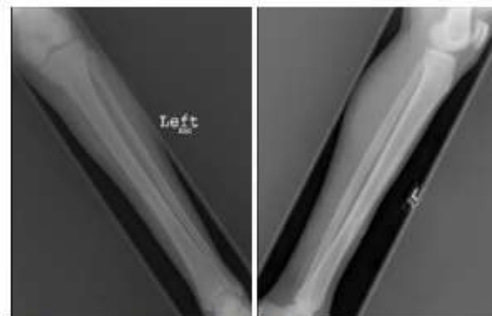
Johanna L. Baran, MD
Department of Pathology
Massachusetts General Hospital

Rajesh Gandhi, MD
Department of Infectious Disease
Massachusetts General Hospital

Kevin Raskin, MD
Department of Orthopaedic Surgery
Massachusetts General Hospital

Corresponding Author:

John Kadzielski, MD
jkadzielski@partners.org
Department of Orthopaedic Surgery
MGH, White 535
55 Fruit Street
Boston, MA 02114



FIGURES 1 & 2: Orthogonal radiographs of the left tibia demonstrate dystrophic calcification in the anterior soft tissues with endosteal sclerosis and a vague lucency of the anterior cortex of the distal tibial diaphysis which imply persistent infection and necrotic bone.

O Complexo *Mycobacterium avium* – caracterização e patogenicidade

Two months after her initial presentation and within 2 weeks of stopping the vancomycin, the patient presented to our hospital with recurrent erythema, swelling, warmth and tenderness of her left leg. Additionally, she also had a left gluteal carbuncle and right groin cellulitis. The patient had no fevers or chills prior to presentation. The patient's white count was 2.8 th/cmm. Her ESR was 48 mm/hr and her CRP was 17 mg/L. Her most recent CD4 cell count was 34/ mm³ prior to admission. X-rays showed endosteal sclerosis and lucency of the anterior cortex of the distal tibial diaphysis and soft tissue changes consistent with prior biopsy (Figures 1 & 2).

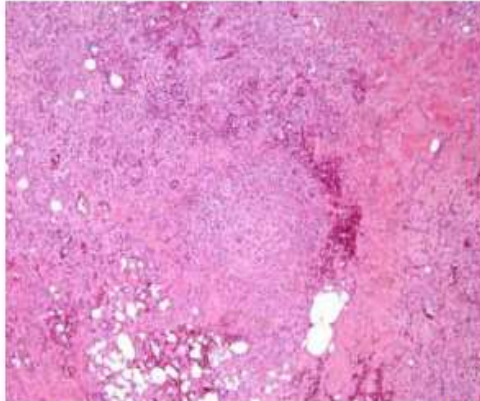


FIGURE 3: Initial low-power microscopic examination with a hematoxylin and eosin stain illustrates non-necrotizing granulomas. The aggregate of histiocytes is cuffed by palisading lymphocytes, amongst a background of fibrosis, hemorrhage and inflammation.

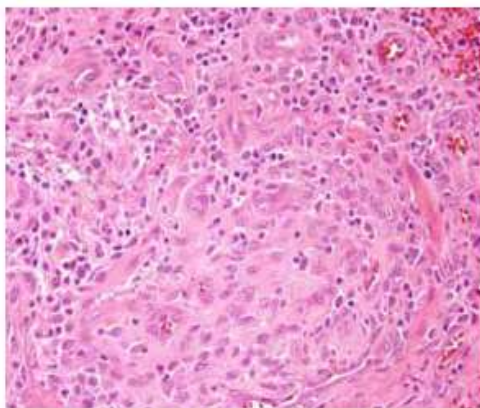


FIGURE 4: Four-hundred times magnification demonstrates a granuloma with epithelioid histiocytes containing abundant eosinophilic cytoplasm. Smaller, darker lymphocytes surround the histiocytes.

She was taken to the operating room and underwent thorough irrigation and debridement with sequestrectomy. A subatmospheric pressure dressing was applied. She also underwent incision and drainage of the left gluteus. Specimens were sent for to microbiology for aerobic, anaerobic, fungal and mycobacterial analysis. Specimens were also sent to pathology. Biopsies from both sites showed granulomas (Figure 3 & 4) and

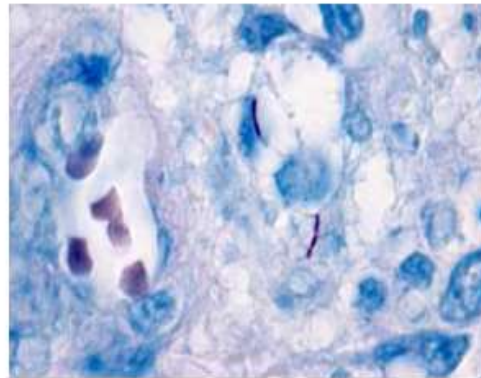
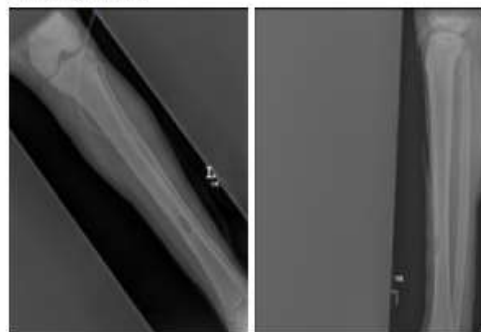


FIGURE 5: Acid fast stain highlights the mycobacteria identified within granulomas (1,000x magnification).



FIGURES 6 & 7: Orthogonal radiographs of the left tibia which demonstrate post surgical changes after a thorough debridement with the subatmospheric pressure dressing in place.



FIGURES 8 & 9: Orthogonal radiographs of the left tibia which demonstrate post surgical changes and early evidence of healing. There is no radiographic evidence of residual infection or fracture.

were positive for acid-fast bacilli, which were determined to be *Mycobacterium Avium* Intracellular Complex (MAC) sensitive to clarithromycin (Figure 5). The left gluteal abscess was also positive for 2 strains of sensitive coagulase-negative staphylococcus. Postoperative blood and sputum cultures were negative for bacteria, fungi and mycobacteria. A subsequent chest, abdomen, and pelvic CT showed no evidence disseminated mycobacterial involvement. Postoperative x-rays were obtained for a baseline for follow up care (Figures 6 & 7). The patient's

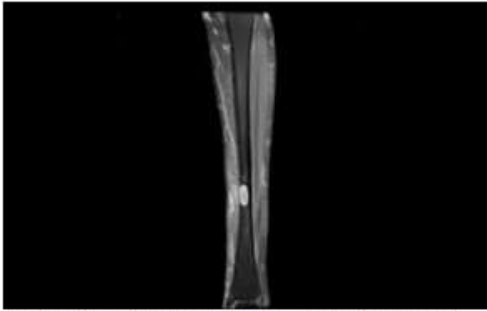


FIGURE 10: Coronal MRI scan of the left tibia using a post-contrast T1 sequence demonstrating no change in the lesion or contrast enhancement of the adjacent bone.

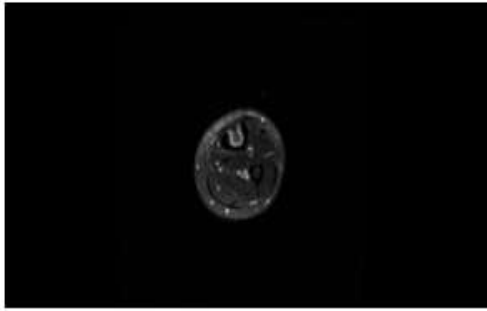


FIGURE 11: Axial MRI scan of the left tibia using a T2 sequence which demonstrates fluid signal within the surgical cavity with no bone or soft tissue edema.

symptoms resolved and she was discharged 10 days after presentation on her unchanged HIV antiviral and prophylactic regimen, and rifabutin, isoniazid, pyrazinamide, ethambutol, and clarithromycin which were changed to rifabutin, clarithromycin and ethambutol based on final speciation.

As her three month follow-up appointment, she was ambulatory with a cane and able to bear weight. X-rays at that time demonstrated a stable post surgical defect without evidence of new disease (Figures 8 & 9). A MRI of the left tibia four months after her debridement showed no evidence of ongoing osteomyelitis (Figures 10 & 11). Nine months after discharge, the patient developed sudden bilateral decrease in visual acuity which was believed to be secondary to optic neuropathy from ethambutol. She had an initial evaluation including formal visual field testing with ophthalmology and shortly thereafter returned home to Zimbabwe. In doing so, she was subsequently lost to follow-up.

DISCUSSION

According to a 2008 Centers for Disease Control synopsis, at the end of 2003 an estimated 1,039,000 to 1,185,000 people within the United States were living with HIV/AIDS and an additional 56,300 contracted the disease in 2006.^{29,31} While the incidence of opportunistic infections within the HIV population has declined since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART), there is still a substantial risk of OI in those patients with low CD4 cell counts.¹⁶

Nontuberculous mycobacterium osteomyelitis is a rare OI which has been reported in the HIV population. While 1% of

HIV patients in the US corresponds to approximately 10,000 people, there have been less than 50 cases of atypical mycobacterium osteomyelitis reported in patients with HIV.^{1,7,12,14,15,18,19} Of the cases reported, mycobacterium haemophilum and mycobacterium kansasii were the most common causative agents respectively; mycobacterium avium complex (MAC) infection was responsible for the third largest portion of NTM osteomyelitis. Although disseminated mycobacterium avium Complex (DMAC) in patients with CD4 cell counts < 50/mm³ is relatively common, localized infection is rare. DMAC was reported to be present in 16% of the HIV population before 1996; the current rate is < 1% per year because of HAART and MAC prophylaxis.¹³

While NTM osteomyelitis is rare, there are specific risk factors which predispose people to these infections. Trauma, surgery, compromised immune status and disseminated disease all increase the risk of developing osteomyelitis with NTM.¹⁵ Whereas penetrating trauma is the most common etiologic mechanism for NTM osteomyelitis, there are reports of blunt trauma precipitating NTM osteomyelitis. One possible explanation is the *locus minoris resistentiae* theory, which postulates that macrophages containing dormant mycobacteria migrate to the site of injury and release the bacteria into traumatized bone which is more susceptible to infection.⁵ Of note, the patient presented in this report experienced trauma to the site of infection; however there was reportedly no break in the skin. Another point to consider in our case is the possibility that the localized infection was in part due to immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). IRIS is a pathological inflammatory response seen in HIV patients that have an underlying OI when they begin HAART.³⁰ The syndrome is in part due to the renewed effectiveness of the immune system against the underlying OI after receiving HAART, resulting in inflammation and localized findings. IRIS is seen in 15-25% of HIV patients within 3 months of HAART initiation.¹⁷

NTM is a rare cause of osteomyelitis in patients with HIV infection. Some general features of these infections include a CD4 cell count <100/mm³, the involvement of several joints or skeletal sites, coexistent septic arthritis, and cutaneous lesions.¹² Our patient did not have coexistent septic arthritis but did have two cutaneous lesions, one of which was confirmed to be due to MAC infection. These mycobacteria and endemic and a common history involves trauma or a puncture site.⁸ The definitive diagnosis of NTM osteomyelitis is dependent upon a bone biopsy with cultures and staining for mycobacteria. Blood cultures are often negative.¹ Once diagnosed, a combination of surgical and antimicrobial therapy is required to completely eradicate the infection. Since affected bone in NTM osteomyelitis is poorly perfused and true sequestrum may exist, surgical debridement plays an important role.¹ Any associated hardware should also be removed and sinus tracts should be excised. Standard treatment for MAI osteomyelitis involves a three-drug combination of clarithromycin (or another macrolide), rifabutin, and ethambutol for a 6 month course.¹⁵ It is important to actively monitor for signs of recurrent infection or

toxicities of the antibiotics. Of note, ethambutol-induced optic neuropathy and visual loss is estimated to occur in approximately 1% of patients and ophthalmology follow up should be arranged.^{3,6} If visual changes do occur, the ethambutol should be stopped immediately.

In summary, NTM osteomyelitis is a rare entity and is most likely to be found in patients who are immunocompromised, e.g., HIV/AIDS. Since the advent of HAART, it is rare to see DMAC but when patients present with advanced HIV/AIDS without previous treatment, it should be considered a diagnostic possibility. When treating patients with HIV and suspected osteomyelitis, the surgeon and the care team must maintain a high degree of suspicion and take careful mycobacterial cultures. These cases require a multidisciplinary approach to treatment including orthopaedic surgery, pathology, infectious diseases, primary care and ophthalmology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank and recognize Jason Faris, M.D. for his assistance with the preparation of this manuscript and for his care of this complicated patient.

References

1. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 23-2000. A 49-year-old man with acquired immunodeficiency syndrome and a tibial lesion. *N Engl J Med*, 343(4): 281-7, 2000.
2. HIV/AIDS in the United States: CDC HIV/AIDS Facts. In www.cdc.gov/hiv/resources/factsheets/PDF/us.pdf. Edited, Centers for Disease Control, 2008.
3. Barron, G. J.; Tepper, L.; and Iovine, G.: Ocular toxicity from ethambutol. *Am J Ophthalmol*, 77(2): 256-60, 1974.
4. Breda, L.; de Michele, G.; Nozzi, M.; De Sanctis, S.; Di Marzio, D.; and Chiarelli, F.: Non-tuberculous mycobacterial osteomyelitis: an unusual cause of hip pain in immunocompetent children. *Rheumatol Int*, 2009.
5. Chan, E. D.; Kong, P. M.; Fennelly, K.; Dwyer, A. P.; and Iseman, M. D.: Vertebral osteomyelitis due to infection with nontuberculous *Mycobacterium* species after blunt trauma to the back: 3 examples of the principle of locus minoris resistentiae. *Clin Infect Dis*, 32(10): 1506-10, 2001.
6. Citron, K. M., and Thomas, G. O.: Ocular toxicity from ethambutol. *Thorax*, 41(10): 737-9, 1986.
7. Elsayed, S., and Read, R.: *Mycobacterium haemophilum* osteomyelitis: case report and review of the literature. *BMC Infect Dis*, 6: 70, 2006.
8. Gardam, M., and Lim, S.: Mycobacterial osteomyelitis and arthritis. *Infect Dis Clin North Am*, 19(4): 819-30, 2005.
9. Glynn, M., and Rhodes, P.: Estimated HIV prevalence in the United States at the end of 2003. In *National HIV Prevention Conference*. Edited, Atlanta, 2005.
10. Griffith, D.: If It Isn't Something, It's Something Else. *Southern Medical Journal*, 99(2): 112-113, 2006.
11. Hall, H. I. et al.: Estimation of HIV incidence in the United States. *Jama*, 300(5): 520-9, 2008.
12. Hirsch, R.; Miller, S. M.; Kazi, S.; Cate, T. R.; and Reveille, J. D.: Human immunodeficiency virus-associated atypical mycobacterial skeletal infections. *Semin Arthritis Rheum*, 25(5): 347-56, 1996.
13. Karakousis, P. C.; Moore, R. D.; and Chaisson, R. E.: *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet Infect Dis*, 4(9): 557-65, 2004.
14. Marchevsky, A. M.; Damsker, B.; Green, S.; and Tepper, S.: The clinicopathological spectrum of non-tuberculous mycobacterial osteoarticular infections. *J Bone Joint Surg Am*, 67(6): 925-9, 1985.
15. Petitjean, G.; Fluckiger, U.; Scharen, S.; and Laifer, G.: Vertebral osteomyelitis caused by non-tuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Infect*, 10(11): 951-3, 2004.
16. Sax, P. E.: Opportunistic infections in HIV disease: down but not out. *Infect Dis Clin North Am*, 15(2): 433-55, 2001.
17. Shelburne, S. A.; Montes, M.; and Hamill, R. J.: Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *J Antimicrob Chemother*, 57(2): 167-70, 2006.
18. Vassilopoulos, D.; Chalasani, P.; Jurado, R. L.; Workowski, K.; and Agudelo, C. A.: Musculoskeletal infections in patients with human immunodeficiency virus infection. *Medicine (Baltimore)*, 76(4): 284-94, 1997.
19. Weingardt, J. P.; Kilooyne, R. F.; Russ, P. D.; Johnston, R. J.; and Nawaz, S.: Disseminated *Mycobacterium avium* complex presenting with osteomyelitis of the distal femur and proximal tibia. *Skeletal Radiol*, 25(2): 193-6, 1996.

