

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**OCORRÊNCIA DE MICOBACTÉRIAS E OUTROS MICRORGANISMOS
NAS ÁGUAS DE UMA FAZENDA PRODUTORA DE LEITE DE BÚFALAS,
NA REGIÃO DE SÃO CARLOS, ESTADO DE SÃO PAULO.**

CLESO MENDONÇA JORDÃO JUNIOR

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Clarice Queico Fujimura Leite

ARARAQUARA - SP

2008

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

J82o Jordão Junior, Cleso Mendonça
Ocorrência de micobactérias e outros microorganismos nas águas de uma propriedade produtora de leite de búfalas, na região de São Carlos, estado de São Paulo. / Cleso Mendonça Jordão Junior. – Araraquara, 2008.
111 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Clarice Queico Fujimura Leite

1.Micobactérias. 2.Água. 3.Ácidos micólicos. 4.Microbiologia dos alimentos. I.Leite, Clarice Queico Fujimura, orient.. II. Título.

CAPES: 50700006

TERMO DE APROVAÇÃO

NOME DA AUTORA: Cleso Mendonça Jordão Junior

Título do trabalho: Ocorrência de micobactérias e outros microrganismos nas águas de uma propriedade produtora de leite de búfalas, na região de São Carlos, Estado de São Paulo.

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

PRESIDENTE E ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Clarice Queico Fujimura Leite.

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara

SEGUNDO EXAMINADOR: Prof^ª. Dr^ª. Mariza Landgraf.

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP - São Paulo.

TERCEIRO EXAMINADOR. Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral.

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP- Jaboticabal.

QUARTO EXAMINADOR: Prof^ª. Dr^ª. Daisy Nakamura Sato.

INSTITUIÇÃO: Instituto Adolfo Lutz – Ribeirão Preto.

QUINTO EXAMINADOR: Prof^ª. Dr^ª. Suzana Correa de Matos David.

INSTITUIÇÃO: Instituto Nacional de Saúde “Dr. Ricardo Jorge”, INSA – Lisboa.

ARARAQUARA, 18 de dezembro de 2008.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de micobactérias “Hugo David” do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara com auxílio de bolsa CAPES. Parte da pesquisa foi realizada em Portugal, durante um estágio no exterior (CNPq sandwich nº 201384/2007-8), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Suzana David do Instituto Nacional de Saúde – INSA do Porto.

*Aos meus pais, Cleso e Maria Aparecida,
Por terem me dado a vida,
Por terem me dado uma educação exemplar,
Por terem me dado amor,
Por me proporcionarem mais essa conquista, dedico.*

*À minha querida namorada Flávia,
Pelo exemplo de dedicação,
Pelo amor incondicional,
Pela força e ajuda nos momentos difíceis.
E pela alegria e felicidade que sempre me proporciona, dedico.*

*“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser.
Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter
êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de
palácio têm qualquer terra larga, mas onde estará o
palácio se não o fizerem ali?”*

Fernando Pessoa (1888 - 1935)

*"A ausência da evidência não significa evidência da
ausência."*

Carl Sagan (1934-1996)

*A minha orientadora, Prof^a Dr^a Clarice Queico Fujimura Leite,
Por todos os ensinamentos e estímulos aos meus estudos de pós-graduação,
E especialmente por todo o seu apoio e amizade, agradeço.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser a luz da minha vida.

À Prof.ª Dr.ª Deise Pasetto Falcão, pela grande amizade e apoio constante.

Aos proprietários da fazenda em São Carlos que permitiram que eu coletasse as amostras de água para realização desse trabalho.

Ào Prof. Dr. Adalberto Farache Filho, pelas orientações e por disponibilizar seu laboratório para realização de parte desse trabalho.

Ào Reitor Prof. Dr. Marcos Macari e ao chefe de gabinete Prof. Dr. Kleber Tomás Resende, por sempre me ajudarem.

Ào Dr. Marcos Régério Alves Pinto, pela ajuda imprescindível desde o Mestrado até o final do Doutorado.

À Dr.ª Suzana David, por todo o aprendizado e essencial ajuda durante toda minha pós-graduação.

Às diretores do Instituto Nacional de Saúde "Dr Ricardo Jorge" - Porto e do Instituto de Biologia Molecular e Celular do Porto por terem permitido a realização de meu estágio de doutorado no exterior.

Ào Dr. Jorge Vieira e a Dr.ª Cristina Vieira do I.B.M.C pelas importantes orientações neste trabalho.

À Dr.ª Paula Magalhães do I.B.M.C pelo auxílio no seqüenciamento dos isolados micobacterianos.

À CAPES pela bolsa de Doutorado.

Ào CNPq pela bolsa de Doutorado Sandwich.

À Dr.ª Daisy Nakamura Sato, pelas valiosas contribuições e amizade.

Ào Prof. Dr. Sérgio Leite, por todo apoio durante minha pós-graduação.

Às técnicas de laboratório do Departamento de Ciências Biológicas pela convivência e indispensável auxílio.

Aos funcionárias da pós-graduação pelas orientações.

Aos colegas do laboratório de micobactérias "Hugo David" pela convivência e ajuda na confecção deste trabalho.

A toda minha família pelo incentivo e convivência.

A todos meus caros amigos de Araraquara e Jaboticabal.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bootstrap	“reamostragem”- é um método genérico para estimar variabilidade em estatística.
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCP	cloreto de cetilpiridínio
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	“2’ – <i>Deoxyribonucleoside</i> 5’ – <i>triphosphate</i> ”
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
GLC	<i>Gas-Liquid Chromatography</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	<i>Highperformance Liquid Chromatography</i>
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
hsp	<i>Heat shock protein</i>
LJ	Lowesntein-Jensen
kDa	kiloDaltons
M	Molar
MAA	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MAIS	<i>M. avium-intracellulare-scrofulaceum</i> complex
MAP	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normalidade
NTM	<i>Non-tuberculous mycobacteria</i>
MOTT	<i>Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PRA	<i>PCR- restriction enzyme analysis</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPD	<i>Purified protein derivated</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
rpm	Rotações por minuto
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
TBE	Tris-borato EDTA
TE	Tris-EDTA
TLC	<i>thin-layer chromatography</i>
TPC- CI	<i>Total Plate Count – Color Indicator</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSR	<i>Template Suppression Reagent</i>
TTC	2, 3, 5 cloreto de trifeniltetrazólio
U	Unidade
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
x	Veze

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Micobactérias de crescimento lento e suas infecções.	08
Tabela 2	Micobactérias de crescimento rápido e suas infecções.	11
Tabela 3	<i>Habitats</i> das micobactérias oportunistas ambientais	24
Tabela 4	<i>Primers</i> utilizados na PCR.	42
Tabela 5	Mistura reativa da reação utilizada nas ampliações com os <i>primers</i> (g2R e rM582R) e (Tb11 e Tb12).	43
Tabela 6	Mistura para seqüenciamento do Big Dye V 1.1.	45
Tabela 7	Número e porcentagem de amostras de cada ponto de colheita que atenderam e não atenderam ao padrão para bactérias heterotróficas.	49
Tabela 8	Número e porcentagem de amostras de cada ponto de colheita indicando a presença e ausência de coliformes totais e termotolerantes e as amostras com resultado superior a 1000 UFC de coliformes termotolerantes por 100mL de água.	50
Tabela 9	Número de amostras de cada ponto de colheita que foi positivo para a presença de <i>S.aureus</i> .	50
Tabela 10	Temperatura média da água, pH, número de isolados de micobacterianos de crescimento lento e rápido, populações de microrg. heterotróficos (UFC/mL), coliformes termotolerantes, colif. totais e <i>S. aureus</i> nos diferentes pontos de colheita de amostras de água.	51
Tabela 11	Resultado da análise dos perfis dos ácidos micólicos, após comparação com os padrões.	55

- Tabela 12 Identificação e porcentagem de similaridade de quatro micobactérias isoladas mais dois controles positivos (*M.bovis* e *M. Marinum*) em comparação com os dados do Genbank usando a ferramenta de BLAST. 64
- Tabela 13 Identificação e origem da amostra, meio de cultivo, temperatura de incubação, velocidade de crescimento, resultados do PRA (*BstEII* e *HaeIII*), ácidos micólicos e sequenciamento dos genes 16S rRNA e *hsp65* de 33 isolados micobacterianos. Destacados em cinza estão os quatro isolados (18,20,24 e 25) que foram sequenciados segundo a metodologia padronizada neste trabalho. 65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Perfis de ácidos micólicos de micobactérias.	18
Figura 2	Ponte (Rio antes de entrar na propriedade).	33
Figura 3	Mina 1 (Torneira perto da casa).	33
Figura 4	Torneira 1 da Mina 2 (parte de fora do estábulo) sai da caixa d'água).	33
Figura 5	Torneira 2 da Mina 2 (caixa d'água) dentro da casa.	33
Figura 6	Torneira 3 da Mina 2 (sai do aquecedor de água que é usado para limpar as ordenhadeiras).	33
Figura 7	Bebedouro dos Búfalos.	33
Figura 8	Rio depois da ponte (recebe toda a água que sai do estábulo).	33
Figura 9	Esquema mostrando como utilizar as placas Petrifilm da 3M.	35
Figura 10	Esquema de purificação de DNA (JETQUICK).	44
Figura 11	Perfil dos ácidos micólicos, em placa de sílica gel de vidro e eluição em diclorometano (DCM).	52
Figura 12	Perfil dos ácidos micólicos, em placa de sílica gel de vidro e eluição em diclorometano (DCM).	53

Figura 13	Perfil dos ácidos micólicos, em placa de sílica gel de vidro e eluição em diclorometano (DCM).	54
Figura 14	Gel de eletroforese a 4% das amostras de DNA submetidas à digestão pelas enzimas de restrição <i>BstE II</i> e <i>Hae III</i> . Os isolados micobacterianos estão numerados de 1 a 12.	56
Figura 15	Gel de eletroforese a 4% das amostras de DNA submetidas à digestão pelas enzimas de restrição <i>BstE II</i> e <i>Hae III</i> . Os isolados micobacterianos estão numerados de 13 a 26.	57
Figura 16	Gel de eletroforese a 4% das amostras de DNA submetidas à digestão pelas enzimas de restrição <i>BstE II</i> e <i>Hae III</i> . Os isolados micobacterianos estão numerados de 27 a 42.	58
Figura 17	Gel de eletroforese a 1% das amostras de DNA micobacteriano submetidas à amplificação pelos <i>primers</i> Tb11 e Tb12 (420bp). Além de um controle negativo, <i>M.bovis</i> e <i>M. marinum</i> foram utilizados como controle positivo da reação.	59
Figura 18	Gel de eletroforese a 1% das amostras de DNA micobacteriano submetidas à amplificação pelos <i>primers</i> g2R e rM582R (564bp). Além de um controle negativo, <i>M.bovis</i> e <i>M. marinum</i> foram utilizados como controle positivo da reação.	59
Figura 19	Árvore filogenética do gênero <i>Mycobacterium</i> utilizando seqüências do gene 16S rRNA. Setas vermelhas mostram onde estão as amostras 18, 20, 24,25 e os padrões (bovisp e marip). Os números no dendograma são a porcentagem de ocorrência em 100 árvores “bootstrapped”.	61
Figura 20	Árvore filogenética do gênero <i>Mycobacterium</i> utilizando seqüências do gene <i>hsp65</i> . Setas vermelhas mostram onde estão as amostras 18, 20, 24,25 e os padrões (bovisp e marip). Os números no dendograma são a porcentagem de ocorrência em 100 árvores “bootstrapped”.	62
Figura 21	Árvore filogenética do gênero <i>Mycobacterium</i> derivada da concatenação dos genes 16S rRNA e <i>hsp65</i> . Setas vermelhas mostram onde estão as amostras 18, 20, 24,25 e os padrões (bovisp e marip). Os números no dendograma são a porcentagem de ocorrência em 100 árvores “bootstrapped”.	63

RESUMO

Micobactérias ambientais (MA) ou micobactérias não-tuberculosas (MNT) estão relacionadas a uma grande variedade de doenças em seres humanos. As micobactérias ambientais são saprófitas comumente encontradas em todos os ecossistemas, incluindo água, solo, alimento, poeira e aerossóis. Particularmente, essas micobactérias podem se multiplicar em diferentes fontes de águas, como por exemplo águas de superfície, recreação, residuais, subterrâneas e de torneiras. Sistemas de encanamentos fornecedores de águas são rapidamente colonizados por micobactérias e assim os biofilmes formados nos canos d'água servem como fontes desses microrganismos. Micobactérias são resistentes contra a maioria dos desinfetantes usuais e podem tolerar grandes variações de pH e temperatura, o que lhes permite a permanência nos sistemas de distribuição de água por longos períodos de tempo. O objetivo desse estudo foi isolar e identificar MNT de amostras de água e biofilmes na canalização de água de uma fazenda produtora de leite de búfalas na região de São Carlos-SP e também avaliar a qualidade da água da propriedade por meio da contagem de microrganismos heterotróficos, coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus aureus*. Das amostras analisadas, 90,5% das amostras foram classificadas como fora dos padrões em relação a coliformes totais e 69% foram classificadas como fora dos padrões em relação a coliformes termotolerantes. Trinta e duas amostras (76,3%) de um total de 42(100%) apresentaram populações acima de 500 UFC/mL para bactérias heterotróficas. *S.aureus* foram isolados em 9 amostras (32,14%) de um total de 28(100%). De um total de 33 (100%)MNT isoladas nesse trabalho, 12 (36,36%) foram isoladas de biofilmes presentes nos encanamentos de água da propriedade. Esses isolados foram posteriormente identificados usando a técnica do PRA (PCR- restriction enzyme analysis), sequenciamento dos fragmentos dos genes 16S rDNA e *hsp65* DNA e a

determinação do perfil de ácidos micólicos por cromatografia de camada delgada. As espécies identificadas foram 28 (84,84%) de *M. gordonae* (18 isoladas de amostras d'água e 10 de biofilmes), 2 (2,06%) de *M. lentiflavum* (biofilmes), 2 (2,06%) de *M. flavescens* (amostras d'água) e 1(3,03%) isolado de *M. phlei* (amostra d'água). Nossos resultados sugerem que a água é uma importante via de transmissão de micobactérias, mostrando a necessidade de monitoramento contínuo desses microrganismos não somente nos sistemas de distribuição de água potável mas também em relação aos biofilmes e a importância de se estudar os riscos à saúde que esses microrganismos podem causar.

Palavras-chave: micobactérias, água, PRA, sequenciamento, ácidos micólicos, biofilmes.

ABSTRACT

Environmental mycobacteria (EM) or nontuberculosis mycobacteria (NTMs) are implicated in a variety of human diseases. They are common saprophytes in all ecosystems, including water, soil, food, dust, and aerosols. In particular, EM species can multiply in numerous water sources, including wastewater, surface water, recreational water, ground water, and tap water. Piped water supplies are readily colonized by mycobacteria, and thus the biofilm in the water pipes may serve as a reservoir for these organisms. Mycobacteria are resistant against common disinfectants and can tolerate wide ranges of pH and temperature, which allows them to persist in drinking water systems for long periods of time. The aim of this study was to isolate and identify NTMs from water samples and biofilms from a dairy buffalo farm in São Carlos city, State of São Paulo and to evaluate the water quality of the farm using heterotrophic, faecal and total coliforms count plates. Results showed that 90.5% of the samples were considered as being out of the standards related to total coliforms and 69% of the samples were classified as being out of the standards related to faecal coliforms. From a total of 42 (100%) samples, 32 (76,3%) presented populations above of 500 CFU/mL for heterotrophic bacteria. *S.aureus* were isolated in 9 samples (32,14%) from a total of 28(100%). Out of 33(100%) NTMs isolated in this work, 12 (36,36) were isolated from biofilms in water pipes. These isolates were further identified using PRA (PCR-restriction enzyme analysis), as well as 16S rDNA and *hsp65* DNA sequencing, and mycolic acids by thin layer chromatography (TLC). Twenty-eighty species (84,84%) were identified as *M. gordonae* (18 isolates from water samples and 10 from biofilms), 2 (2,06%) *M. lentiflavum* (biofilms), 2 (2,06%) *M. flavescens* (water samples) and 1(3,03%) *M. phlei* (water sample). In conclusion, our results suggest that water is an

important environmental source of mycobacteria. Since environmental mycobacteria are implicated in a variety of human diseases, it is necessary to conduct continuous monitoring not only on the drinking water system but also on the biofilm and to study the potential health risk of these species.

Keywords: mycobacteria, water, PRA, sequencing, mycolics acids, biofilm.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Micobactérias oportunistas ambientais.....	6
3.1.1. Fatores de risco para a infecção de micobactérias oportunistas ambientais.	12
3.2. Isolamento, identificação e caracterização das micobactérias oportunistas ambientais.	13
3.3. Isolamento e identificação.	13
3.3.1. Isolamento de micobactérias presentes na água.	15
3.3.2. Isolamento de micobactérias do solo.....	16
3.3.3. Identificação de micobactérias.	16
3.4. Os habitats das micobactérias oportunistas ambientais.....	21
3.4.1. Água.	21
3.4.1.1. Lagos, lagoas, rios e córregos.....	21
3.4.1.2. Águas potáveis.	21
3.4.1.3. Biofilmes.	23
3.4.2. Solo.....	25
3.4.3. Aerosóis.....	26
3.4.4. Prédios embolorados.	27
3.4.5. Instrumentos.	28
3.4.6. Alimentos.	28
3.4.7. Animais e aves.....	29
3.5. Infecções recentes em seres humanos por micobactérias não tuberculosas no Brasil.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.	32
4.1. Material.	32
4.1.1. Amostras de águas analisadas.	32
4.1.1.1. Águas não tratadas.....	32

4.1.1.2.	Colheita das amostras de águas e biofilmes.	34
4.2.	Contagem das bactérias do grupo coliforme, bactérias aeróbias e <i>S. aureus</i>	35
4.5.1.	Águas limpas.	36
4.5.2.	Águas mais poluídas.	37
4.6.	Identificação das micobactérias.	37
4.6.1.	Análise de ácidos micólicos.	38
4.6.1.1.	Saponificação e purificação dos ácidos graxos.	38
4.6.1.2.	Metilação com diazometano.	39
4.6.1.3.	Cromatografia em camada delgada.	39
4.6.2.	Método do PRA (<i>PCR-restriction enzyme analysis</i>).	40
4.6.2.1.	Termólise para obtenção do DNA bacteriano.	40
4.6.2.2.	Amplificação de DNA e geração dos fragmentos de restrição.	40
4.6.2.3.	Análise dos resultados do PRA.	41
4.6.3.	PCR (<i>Poymerase Chain Reaction</i>) e Sequenciamento.	41
4.6.3.1.	Preparação do DNA e PCR.	42
4.6.3.2.	Protocolo da PCR.	42
4.6.3.4.	Purificação do material amplificado.	44
4.6.3.5.	PCR de seqüenciamento.	45
4.6.3.6.	Purificação dos produtos de seqüenciamento pelo etanol.	46
4.6.3.7.	Preparação das amostras para seqüenciamento.	46
4.6.3.8.	Análise dos produtos seqüenciados.	47
5.	RESULTADOS.	49
5.1.	Resultado da análise microbiológica.	49
5.2.	Identificação de Micobactérias nas amostras de água de biofilmes.	52
5.2.1.	Ácidos Micólicos.	52
5.2.2.	Técnicas Moleculares.	56
5.2.2.1.	PRA (<i>PCR-restriction enzyme analysis</i>).	56
5.2.2.2.	Padronização da PCR.	58

5.2.2.3.	Seqüenciamento.....	60
5.2.2.4.	Árvores filogenéticas do gênero <i>Mycobacterium</i>	60
6.	DISCUSSÃO.....	67
7.	CONCLUSÕES.....	86
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.	87
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido em más condições higiênico-sanitárias, apresentando populações altas de microrganismos, constituindo-se em risco à saúde pública, principalmente, quando consumido cru, sem tratamento térmico. Pela sua riqueza nutritiva, o leite constitui excelente meio de cultura para a multiplicação de microrganismos podendo ser responsável pela transmissão de importantes enfermidades ao ser humano (CERQUEIRA, 1994).

Uma das principais vias de contaminação microbiológica de alimentos, em geral, são as fontes de águas (reservatórios, minas, poços, córregos, etc). Justamente por isso, Amaral et al. (2000) ressaltaram a importância de se fazer um rígido controle microbiológico não só das águas utilizadas nas indústrias de alimentos de origem animal, mas também daquelas usadas em propriedades nas quais esses alimentos são produzidos. O uso de águas contaminadas pode ocasionar enfermidades em pessoas que vivem nas propriedades rurais bem como contaminação dos alimentos que nelas são produzidos e comercializados (AMARAL et al, 2004).

Uma das formas de verificar as condições sanitárias das águas é pela da pesquisa de certos grupos de bactérias denominados "indicadores de poluição fecal". A presença desses microrganismos, que são habitantes normais do intestino de animais homeotérmicos e seres humanos, indica a presença de poluição de origem fecal e a possibilidade da existência concomitante de microrganismos patogênicos de origem intestinal (GRANUCCI, 2001, TORTORELLO, 2003). Na análise de águas, as bactérias indicadoras de poluição fecal mais utilizada são as pertencentes ao grupo coliforme (CHAGAS et al., 1981, LEWIS et al., 2005). O gênero *Escherichia*, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam os principais gêneros do grupo denominado coliforme. Esses gêneros apresentam em comum as características de serem bastonetes curtos, Gram-negativos, não formadores de

esporos, anaeróbios facultativos e fermentadores de lactose com produção de ácido e gás dentro de 24-48 horas de incubação à temperatura de 32-37°C (SIQUEIRA, 1995; DURBIN e SALTER, 2006).

O habitat das bactérias que pertencem ao grupo coliforme é o trato intestinal do ser humano e de outros animais homeotérmicos; entretanto, espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* podem persistir longos períodos e se multiplicar em solo e vegetais. Os coliformes podem-se diferenciar em coliformes totais e coliformes termotolerantes. O índice dos primeiros é utilizado para avaliar as condições higiênicas, sendo que altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpeza e desinfecção deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem (SIQUEIRA, 1995; DURBIN e SALTER, 2006).

A contagem de coliformes termotolerantes é empregada como indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias, pois se presume que a população desse grupo é constituída por alta proporção de *E. coli* que tem seu hábitat exclusivo no trato intestinal do ser humano e de outros animais homeotérmicos. Assim, sua presença indica possibilidade de ocorrerem patógenos entéricos na amostra. A maioria dos sorogrupos de *E. coli* faz parte da microbiota comensal do intestino dos mamíferos. No entanto, certos sorotipos são patogênicos para o ser humano e para outros animais e estes não são considerados como fazendo parte da microbiota intestinal normal. A transmissão das infecções causadas por *E. coli* seguem principalmente três vias: o contato direto com animais, o contato com humanos e o consumo de alimentos contaminados (PELCZAR, et al., 1997).

Em alguns casos, a verificação da ocorrência de outros grupos microbianos não-relacionados à contaminação fecal também são importantes. A contagem de microrganismos heterotróficos, genericamente definidos como microrganismos que requerem carbono orgânico como fonte de nutrientes, fornece informações sobre a qualidade bacteriológica da

água de uma forma ampla. O teste inclui a detecção, inespecífica, de bactérias ou esporos de bactérias, sejam de origem fecal, componentes da microbiota natural da água ou resultantes da formação de biofilmes no sistema de distribuição. Servindo, portanto, de indicador auxiliar da qualidade da água, ao fornecer informações adicionais sobre eventuais falhas na desinfecção, colonização e formação de biofilmes no sistema de distribuição (DOMINGUES et al., 2007).

Essa contagem, que permite estimar o número de bactérias heterotróficas na água, serve como uma ferramenta para acompanhar variações nas condições de processo, no caso de água mineral, ou a eficiência das diversas etapas de tratamento, no caso de água tratada, permitindo ainda verificar as condições higiênicas em diferentes pontos da rede de distribuição (SILVA et al., 2000).

Entretanto, existe um grupo de bactérias patogênicas que além de estarem presentes em águas não tratadas, predominam em águas cloradas onde podem se multiplicar normalmente, sendo conhecidas como as bactérias do gênero *Mycobacterium* (LEITE, 1991; LECLERC et al. 2002). Essas bactérias habitam os ecossistemas naturais (solo, água, poeira, plantas etc.) e podem colonizar o ser humano e outros animais (DE KANTOR, 1979; PRITCHARD, 1988, HAAGSMA, 1995; FALKINHAM 3rd et al. 2001).

Em experiências anteriores com esses microorganismos, Jordão Junior (2004) isolou e identificou micobactérias ambientais potencialmente patogênicas como *M. simiae*, *M. lentiflavum*, *M. gordonae*, *M. kansasii* e *M. flavescens* de animais PPD+ e PPD-(Derivado Purificado da Proteína do bacilo da tuberculose) em amostras de leite provenientes de búfalas de uma propriedade de São Carlos-SP. Nestas amostras não foi verificado a presença de *M. bovis*, responsável pela tuberculose animal. *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. kansasii* e *M. flavescens* são micobactérias freqüentemente isoladas do meio ambiente, principalmente de ambientes hídricos.

A partir desses dados, este estudo visou avaliar, nessa mesma propriedade, os possíveis reservatórios hídricos das micobactérias ambientais potencialmente patogênicas e uma avaliação preliminar da qualidade geral de água em toda a propriedade utilizando-se as populações de bactérias aeróbias, coliformes totais, termotolerantes e *Staphylococcus aureus*, como um possível fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária do rebanho de bubalinos (AMARAL et al., 2004).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral: Avaliar a qualidade microbiológica da água doce de uma fazenda produtora de leite de búfalas localizada na região de São Carlos, interior do Estado de São Paulo.

Objetivos específicos:

- Determinar as populações de microrganismos heterotróficos, *S.aureus*, coliformes totais e coliformes termotolerantes das amostras de água.
- Isolar as micobactérias livres ou aderidas em biofilmes presentes nessas águas.
- Correlacionar à presença de micobactérias ambientais com a de outras bactérias (heterotróficos, coliformes totais e termotolerantes).
- Identificar estas micobactérias pela técnica do PRA e dos ácidos micólicos.
- Padronizar uma metodologia de diagnóstico visando explorar marcadores moleculares do gênero *Mycobacterium*.
- Avaliar o risco potencial de transmissão de micobacterioses e outras doenças de origem microbiana.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Micobactérias oportunistas ambientais.

Micobactérias oportunistas ambientais são aquelas recuperadas de ambientes naturais ou de ambientes que sofreram algum tipo de intervenção humana e podem infectar e causar doenças em humanos, animais e pássaros. Outros nomes menos utilizados para essas micobactérias são não-tuberculosas (contudo, elas causam lesões tuberculosas), atípicas (para distinguí-las do típico *Mycobacterium tuberculosis*), micobactérias outras que não o *Mycobacterium tuberculosis* (MOTT) ou somente micobactérias ambientais (FALKINHAM, 2002; PALOMINO et al., 2007).

Certas condições predisõem às infecções por micobactérias oportunistas ambientais (fatores de risco, item 3.1.3.) e uma diversidade de infecções também já é conhecida, como infecções na pele (e.g., *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium haemophilum*), linfadenites cervicais (e.g., *Mycobacterium avium*), infecções nas articulações (e.g., *M. avium* e *M. intracellulare*), infecções pulmonares (e.g., *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium*, e *Mycobacterium intracellulare*), bacteremia em pacientes com AIDS (e.g., *M. avium*), e infecções hospitalares (e.g., *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium chelonae*) (FALKINHAM, 2003).

Essas micobactérias são habitantes normais das águas na natureza, águas potáveis e do solo. Elas podem ser isoladas de biofilmes, aerossóis e poeira e já foram isoladas de vasos de plantas (YAJKO et al., 1995) e cigarros (EATON et al., 1995). Quando estão presentes nas águas (exemplo, água de bebida) ou mesmo amostras de solos, elas não são infectantes, mas sim bactérias resistentes esperando o momento ideal para se multiplicarem (FALKINHAM, 2002).

As micobactérias oportunistas ambientais incluem tanto as micobactérias de multiplicação lenta (tabela 1) quanto as de multiplicação rápida (tabela 2). Certamente, as

espécies de micobactérias ambientais de crescimento lento mais importantes são o *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*, conhecidas por complexo *M. avium* (MAC). Apesar de elas serem espécies distintas, com possibilidades de identificação e diferenciação por sondas de DNA (AccuProbe, Gen-Probe, San Diego, CA), elas são quase indistinguíveis fenotipicamente. O MAC é o grupo de micobactérias mais comumente isolado de pacientes doentes e a incidência de infecções causadas por esse grupo está aumentando muito no mundo todo (FALKINHAM, 2002; PEDLEY et al., 2004).

MAC (Complexo *M. avium*) inclui *M. intracellulare*, *M. avium* e suas subespécies MAA (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*), MAP (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*) e *M. avium* subspecies *sylvaticum*. Devido ao fato de MAP ser de multiplicação muito lenta, exigente e requerer meios de cultura especiais para seu isolamento, o termo MAC é usualmente empregado para indicar os membros do complexo outros que não o MAP, contudo rigorosamente falando o MAP é sim um membro desse complexo. *M. lepraemurium* é uma espécie muito semelhante ao *M. avium* e causa lepra em camundongos, ratos e gatos e assim como MAP é muito difícil de cultivar e é de multiplicação muito lenta. MAIS (Complexo *M. avium-intracellulare-scrofulaceum*) inclui *M. scrofulaceum*, *M. avium* e *M. intracellulare*, contudo MAIS é um termo muito pouco utilizado. O termo *M. avium-intracellulare* é em muitos casos idêntico ao termo MAC (PEDLEY et al, 2004).

Tabela 1. Micobactérias de crescimento lento e suas infecções.*

Espécies Micobacterianas	Infecções em seres humanos
<i>Mycobacterium avium</i>	Pneumonia Linfadenites Cervical em Crianças Bacteremia na AIDS Tenossinovite
<i>Mycobacterium genavense</i>	Bacteremia na AIDS Micobacteriose em Aves
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	Dermatite Bacteremia Linfadenite Cervical
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Pneumonia Tenossinovite
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Pneumonia Dermatite Bacteremia na AIDS
<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	Pneumonia Linfadenite Cervical Bacteremia
<i>Mycobacterium malmoeense</i>	Pneumonia Linfadenite Cervical

	Bacteremia
<i>Mycobacterium marinum</i>	Dermatite
	Bacteremia
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	Pneumonia
	Linfadenites Cervical em Crianças
	Dermatite
	Bacteremia
<i>Mycobacterium simiae</i>	Pneumonia
	Bacteremia
<i>Mycobacterium terrae</i>	Pneumonia
	Infecções nas juntas
	Bacteremia na AIDS
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	Dermatite
<i>Mycobacterium xenopi</i>	Pneumonia
	Bacteremia

*Fonte: FALKINHAM (2002).

Muitos trabalhos mostram que as diferenças geográficas podem influir na distribuição e prevalência entre as espécies de micobactérias. Por exemplo, *M. malmoense* é mais comum na Europa do que nos Estados Unidos. A periodicidade na qual essas micobactérias surgem também difere entre as espécies. Infecções causadas por *M. kansasii* e *M. xenopi* são geralmente encontradas agrupadas nos mesmos locais e épocas, geralmente coincidindo com o isolamento de micobactérias em águas potáveis (FALKINHAM, 2002; PRIMM et al., 2004).

Além destas micobactérias de multiplicação lenta listadas na Tabela 1, novas espécies têm sido relatadas e identificadas por diferentes autores que sempre associam o seu isolamento com alguma doença (TORTOLI, 2006).

Em relação as micobactérias de multiplicação rápida, três espécies são de importância: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, e *Mycobacterium fortuitum*, que são patógenos oportunistas e não saprófitas. Membros dessas espécies habitam naturalmente os rios, lagos e também águas potáveis das cidades. Assim como as micobactérias de multiplicação lenta, são resistentes a antibióticos e a desinfetantes (SCHLOSSBERG, 2006). Essas micobactérias podem causar não somente doenças pulmonares mas também podem causar infecções hospitalares (tabela 2).

Atualmente, às micobactérias de multiplicação rápida são agrupadas dentro do grupo *M. fortuitum*, do grupo *M. chelonae/abscessus*, do grupo *M. smegmatis* e do grupo das micobactérias de multiplicação rápida e pigmentadas. Existem mais de 50 espécies reconhecidas, representando aproximadamente 50% de todas as espécies de micobactérias. As três espécies consideradas mais importantes no ponto de vista clínico e representam mais de 80% dos isolados clínicos de micobactérias de multiplicação rápida são: *M. fortuitum*, *M. chelonae*, e *M. abscessus* (SCHLOSSBERG, 2006).

Tabela 2. Micobactérias de crescimento rápido e suas infecções.*

Espécie de Micobactéria	Infecções em seres humanos
<i>Mycobacterium abscessus</i>	Pulmonar - Pneumonia Otite Abscessos de Injeções
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Pulmonar- Pneumonia Otite Peritonite Bacteremia (AIDS)
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Pulmonar- Pneumonia Infecções cirúrgicas Catéteres hospitalares Bacteremia (AIDS)

*Fonte: FALKINHAM (2002).

De forma semelhante às micobactérias de multiplicação lenta, novas espécies de multiplicação rápida têm sido relatadas e identificadas, podendo afirmar com certeza que num futuro próximo, haverá um aumento no número de espécies de micobactérias oportunistas e patogênicas (FALKINHAM, 2002; PEDLEY et al., 2004; SCHLOSSBERG, 2006).

3.1.1. Fatores de risco para a infecção de micobactérias oportunistas ambientais.

Doenças pulmonares pré-existentes como, por exemplo, silicose, pneumoconiose (pneumonia causada por inalação de poeira), pulmão negro e a exposição ocupacional à poeira são fatores de risco nas infecções por micobactérias oportunistas ambientais (WOLINSKY, 1979; WALLACE JR, 1994). Outros fatores de risco incluem anomalias estruturais do tórax (ISEMAN et al., 1991), fibrose cística (WALLACE JR, 1994), e proteinose alveolar pulmonar (WITTY et al., 1994). Crianças nas idades de desenvolvimento da dentição têm risco de contrair linfadenites cervicais causadas por *M. avium* (WOLINSKY, 1995). Casos de famílias inteiras com infecções causadas por micobactérias oportunistas ambientais têm sido relatadas com frequência por vários autores (ENGBAEK, 1964; UCHIYAMA et al., 1981; LEVIN et al., 1995). Os relatos familiares evidenciaram, nesses indivíduos, mutações nos genes receptores de interferon- γ (JOUANGUY et al., 1996), receptores de IL-12 (ALTARE et al., 1998), ou mesmo no gene da IL-12 (OTTENHOFF et al., 1998), sendo estes fatores correlacionados com o aumento da susceptibilidade às micobactérias. Imunosupressão devido ao câncer (WINTER et al., 1985), infecção por HIV (HORSBURGH JR, 1992), e transplantes (SIMPSON et al., 1982) são também fatores de riscos para aquisição destas micobactérias.

Existem também indivíduos que não possuem nenhuma predisposição a esses fatores de risco e mesmo assim são infectados com micobactérias oportunistas ambientais. A maioria desses pacientes são pessoas idosas e geralmente do sexo masculino (REICH e JOHNSON, 1991; KENNEDY e WEBER, 1994).

3.2. Isolamento, identificação e caracterização das micobactérias oportunistas ambientais.

Ao contrário da infecção por *M. tuberculosis*, não há evidências da transmissão humano-humano quando se trata de micobactérias ambientais (WOLINSKY, 1979). O reconhecimento deste fato levou os pesquisadores a tentar determinar se as micobactérias poderiam ser isoladas de amostras de água ou do solo (WOLINSKY e RYNEARSON, 1968; GOSLEE e WOLINSKY, 1976). Evidências da presença de micobactérias no meio ambiente foram também demonstradas pelo fato de que mais de 60% dos residentes da região sudeste dos EUA mostrou evidências de infecções prévias por outras micobactérias que não o *M. tuberculosis* (EDWARDS et al., 1969; WIJSMULLER e ERICKSON, 1974). Esses estudos utilizaram um proteína purificada preparada de uma cultura de *M. intracellulare* (PPD-B; EDWARDS et al., 1969). A partir dessas pesquisas iniciais, outras evidenciaram a existência de micobactérias em vários tipos de ambientes pelo mundo todo. Esses estudos têm fornecido indicações sobre a distribuição geográfica das micobactérias baseando-se na sua fisiologia e genética, descobrindo, assim, os caminhos pelo qual elas infectam os seres humanos (ZUMLA e GRANGE, 2002; PRIMM et al., 2004; NORBY et al., 2007).

Devido ao predomínio de isolamentos de *M. kansasii* e do complexo *M. avium* em pacientes doentes, a maioria das pesquisas tem se focado em pesquisar formas de recuperar e identificar essas espécies (FALKINHAM, 2002).

Um outro tópico ainda pouco estudado está relacionado à resistência das micobactérias ambientais aos desinfetantes e também sobre as exigências nutricionais dessas bactérias nos meios de cultura (ferro, micobactina, temperatura e pH) (FALKINHAM, 2002; PEDLEY et al., 2004).

3.3. Isolamento e identificação.

A maior dificuldade em se isolar micobactérias de amostras ambientais é a sua multiplicação lenta. O método de cultura tem sido o padrão ouro para se evidenciar uma

infecção mesmo dependendo de um longo tempo de incubação necessário para o desenvolvimento das colônias de micobactérias (2 a 8 semanas). O crescimento lento das colônias micobactérias resulta de uma sobreposição de colônias contaminantes de outros microrganismos de multiplicação mais rápida, o que pode dificultar a visualização das colônias de micobactérias. Tentativas para eliminar os contaminantes por meio de diversas técnicas de descontaminação têm sido realizadas (SCHLOSSBERG, 2006; PALOMINO et al., 2007). Esses tratamentos se baseiam na resistência parcial das micobactérias aos ácidos, bases, ou detergentes. Contudo, a descontaminação também reduz o número de micobactérias e, conseqüentemente, a sensibilidade da detecção (BROOKS et al., 1984). É possível a realização do cultivo direto de micobactérias, sem a descontaminação das amostras com baixas contagens microbianas como, por exemplo, águas de bebida (FALKINHAM et al., 1980; FALKINHAM et al., 2001) e aerossóis (WENDT et al., 1980).

Apesar de diferentes métodos de descontaminação para isolamento de micobactérias de amostras ambientais já terem sido comparados, é muito difícil criar uma regra específica de isolamento devido aos diferentes tipos de amostras, diferentes meios de cultura para o primeiro isolamento e diferentes distribuições geográficas das micobactérias (FALKINHAM, 2002). Ainda mais que as micobactérias são diferentes entre si em relação a susceptibilidade aos processos de descontaminação, como por exemplo, *M. ulcerans* que é muito sensível aos processos de descontaminação (PALOMINO et al., 1998). Além do mais, muitas espécies de micobactérias necessitam de condições ou substâncias específicas para a multiplicação. Por exemplo, alguma forma de ferro é necessária para a multiplicação de *M. haemophilum* (DAWSON e JENNIS, 1980). A micobactina é necessária para a multiplicação crescimento de *M. avium* subespécies *paratuberculosis* (LAMBRECHT e COLLINS, 1992), e a presença de sangue estimula a multiplicação de *M. genavense* (MAIER et al., 1995). Condições microaeróbias aceleram a multiplicação de *M. ulcerans* (PALOMINO et al., 1998). O pH

ácido e condições aeróbias promovem a multiplicação de *M. genavense* (REALINI et al., 1998) e a combinação de pH ácido e piruvato estimula a multiplicação de *M. malmoense* (KATILA et al., 1989). Temperatura de incubação inferior à 37°C favorece o crescimento de *M. haemophilum* (32° C) (DAWSON e JENNIS, 1980) e de *M. marinum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* (30° C) (CLARK e SHEPARD, 1963).

3.3.1. Isolamento de micobactérias presentes na água.

Na maior parte dos estudos envolvendo a água, inicialmente as micobactérias dispersas em grandes volumes d'água (100 – 1000 mL) são concentradas através de centrifugação (FALKINHAM et al., 2001) ou filtração (GLOVER et al., 1994). Em seguida o sedimento poderá ser semeado diretamente nos meios de cultura ou descontaminados por ácidos minerais (HCl, H₂SO₄) e bases (NaOH), ácidos orgânicos (ácido oxálico) e detergentes (cloreto de acetilpiridínio), (SONGER, 1981). Contudo, todos os métodos de descontaminação além de reduzirem a população de outras bactérias e fungos, diminuem também o número de micobactérias (BROOKS et al., 1984).

Métodos têm sido comparados pelas quantidades e variedades de micobactérias recuperadas (KAMALA et al., 1994), sendo que os que recuperam a maior quantidade e variedade de micobactérias utilizam uma descontaminação menos agressiva, como por exemplo o CCP (SCHULZE-ROBBECKE, 1993).

A descontaminação utilizando o cloreto de acetilpiridínio foi empregada com sucesso no isolamento de micobactérias em biofilmes em canos dos sistemas de águas potáveis das cidades (FALKINHAM et al., 2001). Pérolas magnéticas (Magnetic beads) revestidas com anticorpos anti-micobactérias têm sido utilizados para concentrar e isolar micobactérias da água (ROBERTS e HIRST, 1997).

3.3.2. Isolamento de micobactérias do solo.

Duas dificuldades são encontradas no isolamento de micobactérias do solo, poeira e turfa. Primeiro que estes materiais contêm um alto número de microorganismos de multiplicação rápida que podem formar colônias sobrepondo e mascarando as colônias de micobactérias (FALKINHAM, 2002). Segundo que as micobactérias aderem-se fortemente às partículas do solo (BROOKS et al., 1984).

Grande quantidade de micobactérias podem ser isoladas do solo quando este é tratado com polissacaridasas (THOREL et al., 1991). Também é possível utilizar lâminas de vidro revestidos com cera e parafina para o isolamento de micobactérias e nocardia do solo apenas colocando os slides diretamente no solo (OLLAR et al., 1990).

Como consequência, após os métodos de descontaminação, assim como nos casos de isolamento de micobactérias de escarros e de fezes, o número verdadeiro de micobactérias do solo não pode ser definido com certeza e precisão (FALKINHAM, 2002).

3.3.3. Identificação de micobactérias.

Em muitos laboratórios, a identificação de espécies de micobactérias é baseada no crescimento “in vitro” e determinação das atividades de seus metabólitos. Tais testes fenotípicos são trabalhosos e requerem muito tempo para execução podendo demorar desde alguns dias até semanas para se completar a identificação. Além disso, para muitas espécies de NTM, esses testes não são específicos (CHIMARA et al., 2008) e consequentemente as identificações podem apresentar resultados ambíguos ou mesmo errados (SPRINGER et al., 1996). Como consequência, métodos rápidos e com maior capacidade discriminatória têm sido desenvolvidos. Após o isolamento das colônias micobacterianas, o método químico para determinação do perfil dos ácidos micólicos pode ser utilizado para sua identificação (LEITE et al., 1998).

3.3.3.1. Métodos dos ácidos micólicos.

Os ácidos micólicos são os principais compostos da parede das micobactérias, podendo variar o seu tipo estrutural, mas não apresentam mais do que dois pontos de insaturação. Esses ácidos micólicos de cadeia longa, ramificados em α e hidroxilados em β são utilizados na taxonomia por ser uma propriedade fenotípica estável entre as espécies de micobactérias. Cada espécie ou grupo de espécies sintetizam um conjunto de ácidos micólicos, cujo perfil ou padrão são revelados pelas técnicas de cromatografia. A separação dos diferentes ácidos micólicos determinando os perfis depende dos grupamentos químicos da estrutura da molécula, que pode apresentar de 1 a 2 insaturações e diferentes funções oxigenadas (GOODFELLOW e MAGEE, 1998).

As técnicas de cromatografia são cromatografia gasosa (GLC – “gas-liquid chromatography”), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – “highperformance liquid chromatography”) e a cromatografia em camada delgada (TLC – “thin-layer chromatography”) (TORTOLI, 2003).

Na cromatografia de camada delgada, os ácidos micólicos são carregados por uma fase móvel líquida, através de uma fase estacionária sólida de sílica gel e separados de acordo com seus grupos funcionais (LEÃO et al., 2004). Os componentes menos polares, ácidos micólicos α (tipo I) e α' (tipo II), são arrastados com maior facilidade. Os ácidos micólicos polares, onde as cadeias longas são substituídas pelas funções metoxi (tipo III), ceto (tipo IV), epoxi (tipo V), carboxi (tipo VI) e ω -1-metoxi (tipo VII) são carregados com maior dificuldade. O ácido micólico tipo I está presente em todas as micobactérias e os demais estão distribuídos variavelmente entre as diferentes espécies. Devido ao limitado número de ácidos micólicos, muitos padrões são compartilhados por mais de uma espécie (TORTOLI, 2003) como pode ser observado na Figura 1.

Perfis de ácidos micólicos	Espécies
Apenas α (I)	<i>M.brumae</i> , <i>M.fallax</i> , <i>M.triviale</i>
α , α' (I, II)	<i>M.abscessus</i> , <i>M.chelonae</i>
α , α' , metoxi (I, II, III)	<i>M.agri</i>
α , α' , epoxi (I, II, V)	<i>M.chitae</i> , <i>M.confluentis</i> , <i>M.farcinogenes</i> , <i>M.fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> , <i>M.fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i> , <i>M.peregrinum</i> , <i>M.porcinum</i> , <i>M.senegalense</i> , <i>M.smegmatis</i>
α , α' , ceto (I, II, IV)	<i>M.genavense</i> , <i>M.malmoense</i> , <i>M.simiae</i> , <i>M.lentiflavum</i>
α , α' , ceto, carboxi (I, II, IV, VI)	<i>M.chubuense</i> , <i>M.diernhoferi</i> , <i>M.duvalii</i> , <i>M.gilvum</i> , <i>M.obuense</i> , <i>M.parafortuitum</i> , <i>M.shimoidei</i> , <i>M.vaccaae</i>
α , ceto, carboxi (I, IV, VI)	<i>M.aichiense</i> , <i>M.aurum</i> , <i>M.austroafricanum</i> , <i>M.avium</i> subsp. <i>avium</i> , <i>M.avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , <i>M.chlorophenolicum</i> , <i>M.conspicuum</i> , <i>M.flavescens</i> , <i>M.intracellulare</i> , <i>M.komossense</i> , <i>M.lepraemurium</i> , <i>M.nonchromogenicum</i> , <i>M.neoaurum</i> , <i>M.phlei</i> , <i>M.poriferae</i> , <i>M.pulveris</i> , <i>M.rhodesiae</i> , <i>M.scrofulaceum</i> , <i>M.sphagni</i> , <i>M.terrae</i> , <i>M.tokaiense</i> , <i>M.xenopi</i>
α , ceto (I, IV)	<i>M.leprae</i>
α , metoxi, ceto (I, III, IV)	<i>M.africanum</i> , <i>M.asiaticum</i> , <i>M.bovis</i> , <i>M.bovis</i> BCG, <i>M.celatum</i> , <i>M.gastri</i> , <i>M.gordonae</i> , <i>M.haemophilum</i> , <i>M.kansasii</i> , <i>M.marinum</i> , <i>M.microti</i> , <i>M.szulgai</i> , <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.ulcerans</i>
α , α' , metoxi, ceto (I, II, III, IV)	<i>M.thermoresistibile</i>
α , α' , carboxi	<i>M.cookii</i>

FIGURA 1. Perfis de ácidos micólicos de micobactérias*.

*Adaptado de Goodfellow e Magee, 1998.

3.3.3.2. Métodos que utilizam biologia molecular.

Métodos genotípicos geram resultados rápidos e precisos na identificação de espécies micobacterianas. Contudo, sondas de DNA disponíveis comercialmente cobrem apenas uma pequena quantidade de espécies de micobactérias, além do mais os reagentes usados são muito caros. Kits comerciais empregando sondas (Gen-Probe, San Diego, CA) ou

amplificações (Roche Amplicor PCR assay, Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ) também são disponíveis (CHIMARA et al., 2008).

Como alternativa aos testes bioquímicos que podem levar semanas para fornecer resultados, além de serem procedimentos trabalhosos e demorados, as técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para uma rápida identificação das micobactérias (MARTIN et al., 2007). Métodos comerciais como AccuProbe (Genprobe, San Diego, Calif.), INNO-LiPA (Innogenetics, Ghent, Belgium) or GenoType Mycobacteria (Hain Diagnostika, Nehren, Germany) já mostraram ser confiáveis (YAM et al., 2006; TORTOLI, 2003; RICHTER et al., 2006; LEBRUN et al., 2006) enquanto que o sequenciamento do gene 16S rRNA é considerado o padrão ouro para identificação bacteriana (TORTOLI, 2003).

Fragmentos de DNA ou inserções únicas de sequências em uma espécie em particular podem servir como alvos para sondas ou para métodos de identificação envolvendo PCR. Detecção por PCR quantitativas pode ser possível usando a técnica do número mais provável (*most probable number (MPN)-PCR*) (FODE-WAUGHAN, et al., 2001). Por exemplo, *M. ulcerans* contém uma única sequência repetida (ROSS et al., 1997) e múltiplas cópias de uma única sequência de inserção *IS2404* (STINEAR et al., 1999) que pode ser usado para identificação. *Microarrays* (microarranjos) tanto do DNA total (KUSONOKI et al., 1991) como espécie-específico das sequências do 16S rRNA (TROESCH et al., 1999) têm sido desenvolvidos para identificação de uma larga variedade de espécies de micobactérias.

Telenti et al. (1993) descreveram um método com base no DNA para identificação de espécies de micobactérias na qual uma porção do gene *hsp65*, responsável pela codificação da proteína de 65 kDa chamada *heat shock protein*, foi amplificado por PCR e então recortado com enzimas de restrição e analisado. Essa metodologia é conhecida como PRA-hsp65 e requer somente um aparelho de PCR e um equipamento para eletroforese em gel de agarose, podendo ser realizado em algumas horas. As diferentes espécies de micobactérias revelam

padrões diferentes de fragmentos de restrição e assim a espécie de um isolado desconhecido pode ser determinada pela comparação de fragmentos publicados por outros pesquisadores (TELENTI et al., 1993; DEVALLOIS et al., 1997; BRUNELLO et al., 2001; ROCHA et al., 2002; RASTOGI, 2003; HAFNER et al., 2004; LEAO et al., 2004) e também pela utilização *on-line* de uma base de dados na *internet* que facilita muito o processo de identificação (PRASITE, 2007).

Técnicas moleculares que analisam sequências nucleotídicas podem ser usadas essencialmente em qualquer espécie bacteriana, porém requer tanto amplificação como sequenciamento (CHIMARA et al., 2008). Genes específicos têm sido muito utilizados, o gene 16S rRNA foi o primeiro gene usado para a identificação bacteriana (ROGALL et al., 1990). É geralmente aceito que esse gene seja o melhor alvo para se estudar relações filogenéticas em nível de espécie. Devido a sua presença em todas as bactérias ele é constantemente funcional e apresenta áreas altamente conservadas. Além disso, muitas sequências estão disponíveis em bancos de dados disponibilizados ao público na internet. O gene *hsp65*, que está presente em todas as micobactérias, pertence a família dos genes precursores da proteína *Hsp* (*heat-shock protein*). Essas proteínas são altamente imunogênicas com um excepcional grau de conservação evolucionária. Elas atuam no transporte intracelular e na construção de proteínas (DEVULDER et al., 2005).

A metodologia do sequenciamento do gene *hsp65* para identificação de micobactérias tem o potencial de se tornar uma ferramenta precisa, confiável e eficaz para identificação de isolados micobacterianos provenientes de isolados clínicos e ambientais. Esta técnica tem a vantagem de ser mais rápida e confiável que os testes bioquímicos. Além disso, os resultados do sequenciamento podem ser usados para se fazer uma correlação entre os espécimes isolados e proporcionar um suporte para sua identificação (SENNA et al., 2008).

3.4. Os *habitats* das micobactérias oportunistas ambientais

3.4.1. Água.

3.4.1.1. Lagos, lagoas, rios e córregos.

Um grande número de micobactérias oportunistas ambientais têm sido isoladas de águas naturais (GOSLEE et al., 1976; KAZDA et al., 1979; FALKINHAM et al., 1980; LEITE et al., 1988; ICHIYAMA et al., 1988; KIRSCHNER JR et al., 1992; IIVANAINEN et al., 1993; SABATER e ZARAGOZA, 1993; VON REYN et al., 1993; NORBY et al., 2007), como nos pântanos de águas marrons e ácidas da costa sudeste dos EUA (KIRSCHNER JR et al., 1992) e águas drenadas de solos de florestas boreais e solos turfosos da Finlândia (IIVANAINEN et al., 1993). Em um trabalho na Finlândia, foram verificados altos índices de micobactérias em musgos *Sphagnum* incluindo *M. avium* e *M. intracellulare* nos solos turfosos desse país (KAZDA, 1978). *M. ulcerans* foi detectado em amostras de águas usando uma combinação de enriquecimento imunomagnético e PCR (ROBERTS e HIRST, 1997) e de pântanos e campos de golf por PCR (ROSS et al., 1997) dentro de uma área onde um surto de *M. ulcerans* ocorreu.

Alteração na frequência de isolamento de espécies comumente encontradas nas águas também está ocorrendo. Apesar de *M. scrofulaceum* ter sido frequentemente isolado em águas no passado (FALKINHAM et al., 1980; STINE et al., 1987), este fato pareceu não ocorrer mais no começo dos anos 2000 (FALKINHAM et al., 2001), mesmo sendo esta micobactéria apontada como o agente causador da linfadenite em crianças nos dias atuais (WOLINSKY, 1995).

3.4.1.2. Águas potáveis.

Uma grande variedade de micobactérias oportunistas ambientais foram isoladas e recuperadas de águas potáveis (tabela 3). Desde o começo da década de 90, foi dada ênfase ao isolamento e contagem de *M. avium* em águas devido ao grande número de infecções por essa bactéria em pacientes com AIDS (HORSBURGH JR, 1992). Revisões da frequência de

isolamentos de todas as espécies de micobactérias indicam que não se tem um resultado consistente entre amostras diferentes de um mesmo local (ENGEL et al., 1980; COLLINS et al., 1984). Assim, repetições de mesmas amostras são necessárias para a confirmação da presença de micobactérias em qualquer sistema com águas (FALKINHAM et al., 2002).

Representantes do complexo *M. avium* têm sido isolados de amostras de água potável (TISON et al., 1968; GOSLEE et al., 1976; TUFFLEY e HOLBECHE, 1980; SCARLATA et al., 1985; DU MOULIN e STOTTMEIER, 1986; GLOVER et al., 1994; MONTECALVO et al., 1994; PETERS et al., 1995; COVERT et al., 1999; FALKINHAM et al., 2001), águas de banheiros públicos (SAITO e TSUKAMURA et al., 1976), águas de hospitais (STINE et al., 1987, DU MOULIN et al., 1988; GRANHAM et al., 1988), e águas de hemodiálise (CARSON et al., 1988). Além dessas, outras espécies de micobactérias têm sido isoladas de águas potáveis incluindo *M. kansasii* (MCSWIGGAN e COLLINS, 1974; ENGEL et al., 1980; LEVY-FREBAULT e DAVID, 1983; WRIGHT et al., 1985; FISCHEDER et al., 1991; PETERS et al., 1995), *M. marinum* (PARK e BREWER et al., 1976; LEITE et al., 1988), *M. malmoense* (PETERS et al., 1995), *M. scrofulaceum* (STINE et al., 1987), *M. xenopi* (TISON et al., 1968; MCSWIGGAN e COLLINS, 1974; COSTRINI et al., 1981; WRIGHT et al., 1985; SLOSAREK et al., 1993; SNIADACK et al., 1993; PETERS et al., 1995), *M. fortuitum* (BURNS et al., 1991; SCARLATA et al., 1985; CARSON et al., 1988; FISCHEDER et al., 1991; KURITSKY et al., 1983), *M. abscessus* (ZHANG et al., 1997), e *M. chelonae* (KURITSKY et al., 1983; CARSON et al., 1988; FISCHEDER et al., 1991; PETERS et al., 1995).

Tortoli (2003), estudando novas espécies de micobactérias desde o começo da década de 1990, afirma que espécies como *M. brumae*, *M. alvei*, *M. botniense*, *M. cookii*, *M. genavense*, *M. tusciae*, *M. palustre*, *M. bohemicum* podem ter como fontes naturais o solo e águas provenientes de lagos, rios, e sistemas de distribuição. Sendo assim, essas espécies

pouco estudadas de micobactérias não tuberculosas podem ser potencialmente patogênicas aos seres humanos.

Muitas dessas novas espécies de micobactérias, recentemente descritas, provavelmente já foram isoladas nas décadas passadas, porém naquela época foram consideradas variantes das espécies oficialmente reconhecidas, tudo isso devido a falta de métodos mais precisos de identificação, principalmente os métodos de biologia molecular (TORTOLI, 2003).

Casos de técnicos de laboratórios com pseudo-infecções devido à presença de micobactérias oportunistas ambientais nas águas e nos instrumentos de laboratórios usados na detecção e isolamento de micobactérias também foram publicados (STINE et al., 1987; GRAHAM JR et al., 1988, SNIADACK et al., 1993).

Micobactérias oportunistas ambientais não foram recuperadas de 31 amostras de águas engarrafadas de poços artesianos em dois estudos independentes (COVERT et al., 1999; HOLTZMAN et al., 1997), o que confirma o fato de que micobactérias são raramente isoladas de águas de profundidade (MARTIN et al., 1987; FALKINHAM et al., 2001).

3.4.1.3. Biofilmes.

Os biofilmes podem ser as fontes mais importantes de micobactérias oportunistas ambientais e, talvez, a base da sua persistência em sistemas de águas de bebida (tabela 3). Micobactérias, incluindo *M. avium* e *M. intracellulare*, têm sido constantemente isoladas de biofilmes presentes nos sistemas de distribuição de águas potáveis e o número de micobactérias em biofilmes pode ser tão alto quanto 10^4 - 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) por cm^2 (IIVANAINEN et al, 1999; FALKINHAM et al., 2001).

Considerando que os sistemas de distribuição de águas potáveis possuem milhares de quilômetros de canos, o número de micobactérias em suspensão não é mantido pela

introdução de águas do exterior mas sim pelas grandes quantidades de biofilmes (FALKINHAM, 2002).

Tabela 3. Habitats das micobactérias oportunistas ambientais.*

Habitats Gerais	Habitats Específicos
Águas naturais	Lagos, lagoas, estuários, pântanos, rios
Águas potáveis	Sistemas de distribuição, sistemas dos edifícios
Biofilmes	Canos, tubagens, filtros
Solo	Solos, turfa, terra de vasos
Aerosóis	Gotículas d'água, aerosóis em ambientes fechados, poeiras
Fômites	Broncoscópios, catéteres
Edifícios	Paredes úmidas ou encharcadas

*Fonte: FALKINHAM (2002).

Devido às espécies de micobactérias possuírem alta hidrofobicidade e alta resistência aos metais pesados, são consideradas as primeiras bactérias a formarem biofilmes rapidamente. Biofilmes de *M. kansasii* em tubagem de silicone aparecem em três semanas após os tubos serem inseridos no sistema de distribuição de água quente (35-45°C) que já continham *M. kansasii*. Após dez meses, os biofilmes continham 2×10^5 UFC/cm² (SCHULZE-ROBBECKE e FISCHEDER, 1989). Biofilmes de *M. fortuitum* de quase 10^6 UFC/cm² formaram-se depois de duas horas de incubação a 37°C em superfícies de silicone (HALL-STOODLEY e LAPPIN-SCOTT, 1998). A rápida formação e os altos números de células dos biofilmes de *M. fortuitum* ocorreram provavelmente devido ao número de células em suspensão (10^8 UFC/cm²; HALL-STOODLEY e LAPPIN-SCOTT, 1998).

Micobactérias podem colonizar os aparelhos de filtração de água. Alguns tipos de filtros que utilizam carbono e prata foram estudados e mostraram-se colonizados por *M. avium* e *M. fortuitum* (RODGERS et al., 1999). Na realidade, estes filtros potencializam a

multiplicação de *M. avium* (RODGERS et al., 1999). A colonização e a multiplicação de *M. avium* foi devido a sua presença natural nas águas potáveis e também a sua habilidade de se desenvolver em águas de bebida (GEORGE et al., 1980, CARSON et al., 1988; FALKINHAM et al., 2001), a resistência a metais (FALKINHAM et al., 1984), e hidrofobicidade (STORMER e FALKINHAM, 1989). Estudos mostram também que as micobactérias são capazes de se aderir a membranas de diacetato de celulose usadas em sistemas de osmose reversa para o tratamento e purificação de águas (RIDGWAY et al., 1984).

A presença de micobactérias oportunistas ambientais em biofilmes pode ter um impacto direto na saúde de pessoas enfermas. Um caso de choque séptico causado pelo complexo *M. avium* em um paciente foi atribuído à colonização dessas micobactérias em seu cateter central venoso (SCHELONKA et al., 1994). Biofilmes micobacterianos, principalmente *M. chelonae*, foram encontrados nos sistemas de águas de consultórios dentários (SCHULZE-ROBBECKE, 1993).

3.4.2. Solo.

Os solos, assim como as fontes de águas naturais, abrigam uma grande variedade de micobactérias oportunistas ambientais (NORBY et al., 2007; tabela 3). Infelizmente, muitos dos estudos foram arbitrariamente focados em uma única espécie para identificar sua fonte ambiental. Trabalhos publicados mostram o isolamento de *M. kansasii* (PAULL, 1973; COSTALLAT et al., 1977), complexo *M. avium* (WOLINSKY e RYNEARSON, 1968; PAULL, 1973; REZNIKOV e LEGGO, 1974; COLTALLAT et al., 1977; REZNIKOW e DAWSON, 1980; ICHIYAMA et al., 1988), *M. malmoense* (SAITO et al., 1994), e *M. fortuitum* (JONES e JENKINS, 1965; WOLINSKY e RYNEARSON, 1968; PAULL, 1973).

Outros trabalhos também confirmam a presença de micobactérias em solos, como por exemplo o isolamento de *M. kansasii*, do complexo *M. avium* e *M. fortuitum* das poeiras caseiras (REZNIKOV et al., 1971; TSUKAMURA et al., 1974).

Foram encontradas micobactérias oportunistas ambientais em solos de florestas de coníferas (MARTIN et al., 1987). Isso confirma estudos de solos turfosos onde foram isoladas *Mycobacterium* spp. em 89 % das amostras, complexo *M. avium* em 55 %, e *M. avium* em 27% do total de amostras (YAJKO et al., 1995). Micobactérias, incluindo *M. avium* e *M. intracellulare*, foram também isoladas de sedimentos anaeróbios em rios (IIVANAINEN et al., 1999).

3.4.3. Aerosóis.

Apesar de poucos trabalhos documentarem o isolamento de micobactérias de aerosóis (tabela 3), são importantes pois abordam uma forma frequente de transmissão de micobactérias oportunistas ambientais. Aerosóis podem ser coletados e os microrganismos quantificados em UFC usando o amostrador de impacto de Andersen (ANDERSEN, 1958). Respingos sobre superfícies com água contendo micobactérias podem ser colhidos abrindo uma placa de Petri contendo meio específico para crescimento micobacteriano a 10cm da superfície a ser analisada (WENDT et al., 1980). A não ser que haja uma quantidade substancial de poeira no ar, colônias micobacterianas podem ser isoladas depois da incubação. Para evitar contaminação por fungos anemófilos os meios de cultura podem ser acrescidos de verde de malaquita (concentração final de 0.0005%), sem afetar o crescimento de micobactérias. Devido a possibilidade de se medir o volume dos aerosóis (WENDT et al., 1980), pode-se calcular a concentração de micobactérias nas gotículas e então determinar qual a concentração dessas bactérias na gotículas dos aerosóis em comparação com a concentração da suspensão (PARKER et al., 1983).

Espécies pertencentes ao complexo *M. avium* têm sido isolados de gotículas e aerossóis gerados por rios na natureza (WENDT et al., 1980). Em experimentos laboratoriais, Parker et al. (1983) demonstraram que 10^2 a 5×10^3 células de *M. avium* e *M. intracellulare* podem ser encontradas suspensas em aerossóis. Micobactérias incluindo as espécies do complexo *M. avium* têm sido isoladas de poeiras geradas por correntes de ar através de rios, campos de agricultura e parques (FALKINHAM et al., 1990).

Um grande número de estudos tem relatado casos de pneumonia ocupacional que podem ocorrer pela inalação de aerossóis contendo micobactérias oportunistas ambientais. Essas pneumonias foram relatadas em operadores de máquinas que ficavam expostos a aerossóis provenientes dos produtos de limpeza de suas máquinas (SHELTON et al., 1999), sugerindo que as micobactérias são resistentes aos compostos de amônia quaternária usados em limpezas no ramo de siderurgia (RUTALA et al., 1991). Inflamações dos pulmões também foram relatadas em salva-vidas que trabalhavam em piscinas cobertas (ROSE et al., 1998). Várias micobactérias foram isoladas de piscinas (DAILLOUX et al., 1980), banheiras de hidromassagem e de imersão (HAVELAAR et al., 1985), confirmando assim a alta resistência das micobactérias a cloração (TAYLOR et al., 2000). É de se esperar que os aerossóis sejam muito ricos em micobactérias devido a sua parede hidrofóbica e a grande concentração de gotículas em suspensão (PARKER et al., 1983).

3.4.4. Prédios embolorados.

Micobactérias foram isoladas de edifícios úmidos e bolorentos (ANDERSSON et al., 1997) e *M. avium* de edifícios encharcados, durante a sua demolição (HUTTUNEN et al., 2000). Essas observações, sozinhas, não são surpreendentes no que diz respeito à presença de micobactérias em águas naturais e de bebida, contudo os estudos provaram que essas micobactérias isoladas de prédios com bolores eram potentes indutores das respostas inflamatórias (HUTTUNEN et al., 2000). Pode-se concluir que algumas síndromes

respiratórias associadas à ambientes fechados, úmidos e embolorados são, provavelmente, devido às micobactérias ou aos seus metabólitos (FALKINHAM, 2002).

3.4.5. Instrumentos.

Há uma variedade enorme de estudos que documentam a presença de micobactérias em broncoscópios. Como notado anteriormente, biofilmes em equipamentos de limpeza e em consultórios dentários contém uma grande variedade de micobactérias (SCHULZE-ROBBECKE, 1993). Estudos mostram que os broncoscópios são comumente contaminados com *M. avium* (GUBLER et al., 1992), *M. intracellulare* (DAWSON et al., 1982), *M. xenopi* (BENNETT, 1994), e *M. chelonae* (TAKIGAWA et al., 1995), em decorrência da descontaminação inadequada de broncoscópios após sua utilização em pacientes infectados (GUBLER et al., 1992; TAKIGAWA et al., 1995). As fontes de contaminação micobacteriana desses broncoscópios foram identificadas como sendo um paciente (DAWSON et al., 1982) bem como a água contaminada de um hospital (GUBLER et al., 1992; BENNETT, 1994). A persistência de micobactérias em broncoscópios obviamente é devido à sua forte resistência aos desinfetantes (BEST et al., 1990).

3.4.6. Alimentos.

Yajko et al., 1995 encontraram micobactérias em 100 amostras de carne, 121 amostras de vegetais, 138 amostras de laticínios, e 38 amostras de ovos . Em duas (0,5 %) das 397 amostras de alimentos foram isoladas microrganismos do complexo *M. avium* e 12 (3%) dessas amostras foram isolados *Mycobacterium* spp. (YAJKO et al., 1995). Para Falkinham (2002), a provável origem das micobactérias encontradas em sete amostras de vegetais seria a água usada para lavá-los. Em amostras de leite cru foram isoladas *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. agri*, *M. bovis*, *M. marinum*, *M. gordonae*, (CHAPMAN et al., 1965; TACQUET et al., 1966; DUNN e HODGSON, 1982; LEITE et al.,

2003; KONUK et al., 2007) e 7% das amostras de leite pasteurizados continham *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MILLAR et al., 1996).

3.4.7. Animais e aves.

Apesar das micobactérias oportunistas ambientais terem sido isoladas de animais domésticos e selvagens, ainda não está claro, assim como no caso de plantas, quando a fonte é o animal ou o meio ambiente (FALKINHAM, 2002). Macacos infectados com SIV (vírus da imunodeficiência símia) adquiriram a infecção por *M. avium* a partir de água potável (MANSFIELD e LACKNER, 1997). *M. avium* foi isolado de suínos com tuberculose cervical, dos linfonodos mesentéricos de suínos (BERGMAN e HOLMBERG, 1979) e aves domésticas (SCHAEFER et al., 1973).

3.4.8. Vários tipos de amostras.

M. avium tem sido isolado do tabaco, dos filtros e dos papéis que envolvem os cigarros (EATON et al., 1995). Uma variedade de micobactérias, incluindo *M. avium* e *M. intracellulare*, foi isolada de solos turfosos (KIRSCHNER JR et al., 1992). Micobactérias de multiplicação rápida não-identificadas foram isoladas de solos que continham bactérias fixadoras de nitrogênio (SAGARDOY e CITTÁ, 1985).

Contaminação por micobactérias em culturas de células de origem animal e vegetal tem sido constantemente publicada (COOPE et al., 1983; TABER et al., 1991; BUEHRING et al., 1995). Devido ao fato dos laboratórios raramente realizarem testes de contaminação micobacteriana e as micobactérias oportunistas ambientais serem resistentes aos desinfetantes e antibióticos, a contaminação de culturas de células deve ser muito mais freqüente do que é referenciado (FALKINHAM, 2002). Em casos de cultura de tecidos vegetais não é possível saber se as micobactérias estavam presentes no tecido vegetal original e sobreviveram à preparação do tecido para cultura, ou alternativamente foram introduzidas pela água utilizada para preparar o meio de cultura (TABER et al., 1991). Micobactérias do complexo *M. avium*

foram isoladas dos revestimentos, feitos a partir de pinheiros, dos criadouros de aves de postura e de suínos (ZORAWSKI et al., 1983).

3.5. Infecções recentes em seres humanos por micobactérias não tuberculosas no Brasil.

UEKI et al. (2005) avaliaram a diversidade das espécies de micobactérias não-tuberculosas identificadas no estado de São Paulo, no período de 1991 a 1997. De um total de 1248 pacientes, 1.199 (96,1%) tiveram suas cepas identificadas e 3,9% apresentaram resultados não-conclusivos. As dez espécies encontradas foram pertencentes ao complexo *M. avium* (MAC), *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. gordonae*, *M. terrae* e *M. nonchromogenicum*. Concluíram que as espécies de micobactérias não-tuberculosas mais freqüentemente isoladas no estado de São Paulo neste estudo foram as pertencentes ao MAC e *M. kansasii*.

ZAMARIOLI et al. (2008) estudaram a presença de micobactérias não tuberculosas em escarros de pacientes portadores ou não de HIV na Baixada Santista (SP) no período de 2000 a 2005. Foram analisadas 194 isolados bacterianos e identificadas 13 diferentes espécies: *M. kansasii*; complexo *M. avium*; *M. fortuitum*; *M. peregrinum*; *M. gordonae*; *M. terrae*; *M. nonchromogenicum*; *M. intracellulare*; *M. flavescens*; *M. bohemicum*; *M. chelonae*; *M. shimoidei*; e *M. lentiflavum*. Para os autores, esses resultados mostram a importância da realização sistemática da identificação de MNT na rotina laboratorial e sua integração com a clínica, podendo contribuir na caracterização da doença e ações de efetivo controle.

VIANA-NIERO et al. (2008), estudaram um surto recente de infecções que afetaram 312 pacientes que sofreram diferentes procedimentos invasivos (cirurgias por laparoscopias, injeções, mesoterapia (aplicação de medicamentos na pele ou subcutânea) que ocorreram entre 2004 e 2005 na cidade de Belém - PA. Inicialmente as contaminações foram atribuídas

ao *M. abscessus*, porém após analisarem os isolados com várias técnicas moleculares concluíram que 298 pacientes que foram operados em vários hospitais foram infectados por uma única estirpe de *M. massiliense*. Os outros 14 pacientes que sofreram mesoterapia em clínicas privadas foram contaminados por várias estirpes de *M. bolletii*. Estudos como esse sugerem que cepas de *M. massiliense* estão sendo isoladas agora devido ao fato de terem capacidade de sobreviver em diferentes tipos de meio ambiente, serem altamente resistentes aos produtos desinfetantes e possuírem alta capacidade de formar biofilmes (VIANA-NIERO et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. Material.

A fazenda em São Carlos possui um rebanho de búfalas (*Bubalus bubalis*) para produção leiteira e os animais são mantidos em um sistema de semi-confinamento. Toda a água da propriedade, tanto para consumo de funcionários, proprietários, animais como para limpeza e higienização dos equipamentos é proveniente das duas minas, sem receber qualquer tratamento prévio.

Amostras de água foram colhidas das duas minas da propriedade (quatro torneiras das casas), um bebedouro dos animais, no córrego que corta a propriedade (dois pontos), totalizando sete pontos de colheita previamente estudados. Foram feitas seis colheitas, sendo duas no verão, duas no outono e duas no inverno, na tentativa de mostrar uma possível variação sazonal. As amostras foram encaminhadas para o laboratório de micobactérias Dr. Hugo David, da FCF/UNESP de Araraquara para pesquisa de micobactérias e outros microrganismos.

4.1.1. Amostras de águas analisadas.

Foram analisadas 42 amostras, sendo seis colheitas repetitivas de cada um dos sete pontos diferentes na fazenda.

4.1.1.1. Águas não tratadas.

Os pontos de colheitas foram: **(1)** Córrego antes de entrar na propriedade (Figura 2); **(2)** Torneira proveniente da Mina 1 perto da porteira (Figura 3); **(3)** Torneira proveniente da Mina 2 que fica na parte de fora do estábulo (Figura 4); **(4)** Torneira proveniente da Mina 2 que sai da caixa d'água (dentro da casa) (Figura 5); **(5)** Torneira proveniente da Mina 2 que sai do aquecedor de água para limpeza do sistema de ordenha automática (Figura6); **(6)** Bebedouro das Búfalas (Figura 7); **(7)** Córrego depois de sair da propriedade e receber toda a água proveniente da limpeza do estábulo (Figura 8).



Figura 2-Ponte (Rio antes de entrar na propriedade).



Figura 3 - Mina 1 (Torneira perto da casa).



Figura 4- Torneira 1 da Mina 2 (parte de fora do estábulo) sai da caixa d'água).



Figura 5 - Torneira 2 da Mina 2 (caixa d'água) dentro da casa.



Figura 6 - Torneira 3 da Mina 2 (sai do aquecedor de água que é usado para limpar as ordenhadeiras).



Figura 7 - Bebedouro dos Búfalos.



Figura 8 - Rio depois da ponte (recebe toda a água que sai do estábulo).

4.1.2. Biofilmes.

Foram colhidas amostras de biofilmes dos seguintes pontos de colheita: **(S1)**Torneira proveniente da Mina 1 perto da porteira (Figura 3), **(S2)**Torneira proveniente da Mina 2 que fica na parte de fora do estábulo (Figura 4), **(S3)**Torneira (dentro da casa) proveniente da Mina 2 que sai da caixa d'água (Figura 5), **(S4)**Torneira proveniente da Mina 2 que sai do aquecedor de água para limpeza do sistema de ordenha automática(Figura 6),**(S5)** Cano dentro do bebedouro das búfalas (Figura 7).

4.1.1.2. Colheita das amostras de águas e biofilmes.

As colheitas das amostras de águas das torneiras foram feitas da seguinte forma: A torneira foi aberta completamente e a água escoada por 3 a 5 minutos. Logo após o frasco estéril foi enchido até 1 Litro, sem lavá-lo com a amostra e fechado, identificado e mantido sob refrigeração até as análises das águas colhidas. Nos outros pontos de colheita, um litro de cada amostra foi colhido da superfície da água. A temperatura da água foi medida imediatamente logo após a colheita. Os frascos com as amostras de água foram mantidos sob refrigeração (4°C) por no máximo 4 horas até o processamento e medição de pH no laboratório.

Concomitantemente foi realizada a colheita de biofilmes e a técnica simplificada de descontaminação de KUDOH & KUDOH (1974). A técnica consistiu em usar zaragatoas para remover uma camada de biofilmes pré-existentes nos encanamentos e estas foram mergulhadas em tubos de ensaio contendo hidróxido de sódio a 3,0% (solução descontaminante) por 1 a 2 minutos para eliminar outras bactérias contaminantes, que não as do gênero *Mycobacterium*, sensíveis a esta solução. O excesso da solução de NaOH 3,0% foi retirado pela compressão da zaragatoa contra a parede do tubo, e semeado, em duplicata, no

meio Ogawa-Kudoh e submetidos à incubação nas temperaturas de 30 e 37°C com observação semanal.

4.2. Contagem das bactérias do grupo coliforme, bactérias aeróbias e *S. aureus*.

Para as análises dos coliformes totais e termotolerantes foram utilizadas placas Petrifilm para contagem de coliformes (Petrifilm *Coliform Count Plates* com temperatura de incubação de 35°C por 24hs) e para quantificação de bactérias heterotróficas foram utilizadas placas Petrifilm de contagem de microrganismos aeróbios (Petrifilm *Aerobic Count Plates* com temperatura de incubação de 35°C por 48hs). As análises de *S. aureus* foram feitas utilizando as placas Petrifilm para contagem rápida de *S.aureus* (Petrifilm *Staph Express Count Plates* com temperatura de incubação de 35°C por 24hs). Todas as placas Petrifilm foram utilizadas de acordo com as orientações do fabricante demonstradas na Figura 9 (3M, 2007), que estão de acordo com as metodologias de análises internacionais e incluídos no “*Official Methods of Analysis*” (AOAC INTERNATIONAL, 2007).



Figura 9. Esquema mostrando como utilizar as placas Petrifilm da 3M.

4.3. Cepas de Referência.

As cepas de referência utilizadas foram: *M.bovis* AN5 e *M. marinum* ATCC.

4.4. Isolados bacterianos.

Trinta e três isolados bacterianos provenientes de águas e biofilmes foram obtidos e identificados em nível de espécie.

4.5. Isolamento das micobactérias segundo Leite et al. (1991) modificado.

Os procedimentos utilizados na pesquisa de micobactérias dispersas nas águas de torneiras, córregos, minas, reservatórios, bebedouros e tanques seguiram a metodologia empregada por LEITE (1991), com algumas modificações.

4.5.1. Águas limpas.

Como as amostras eram provenientes de águas naturais e, portanto sem nenhum tipo de tratamento, ao chegarem ao laboratório foram retiradas amostras de 1mL para cada placa Petrifilm e o volume restante (994mL) foi clorado com 5ppm por 1 hora antes de ser filtrado. As amostras de água então foram concentradas em membranas filtrante de nitrocelulose estéreis de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade (Millipore HAWG 04700), a seguir as membranas foram maceradas com 10mL de solução salina tampão fosfato (PBS - pH 7,2) estéril ou H₂O estéril, agitadas por 5 minutos e essas suspensões foram utilizadas para os procedimentos de isolamento de micobactérias. Após, o material retido na membrana foi tratado com 5 mL de solução de ácido sulfúrico a 4,0% por 10 minutos em temperatura ambiente, com uma gota de vermelho de fenol 0,4% como indicador de pH. Decorrido esse tempo, a neutralização foi realizada com a adição de 500-600µL de solução de hidróxido de sódio a 30% e gotas de solução de hidróxido de sódio a 3% para ajuste final do pH (pH=7,0). Em seguida a solução foi centrifugada a 2500 x g por 20 minutos, e descartou-se o

sobrenadante. Os sedimentos foram ressuspenso em 2 mL de água peptonada (ou PBS) e alíquotas de 0,2 mL dessa suspensão foram semeadas em quatro tubos contendo meio de Lowenstein-Jensen (LJ) sendo que dois tubos foram incubados à temperatura de 30°C e outros dois a 37°C, em dois tubos com meio Stonebrink e dois tubos de meio middlebrook 7H10. As leituras foram realizadas no 2°, 7°, 12°, 20°, 24° e 28° dias de incubação.

As colônias suspeitas foram confirmadas como sendo de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen. Em seguida foram ressemeadas em LJ ou 7H10 e incubadas nas temperaturas originais de isolamento (30 ou 37°C) e guardadas para identificação posterior da espécie.

4.5.2. Águas mais poluídas.

Após a cloração e maceração da membrana em solução salina (Item 4.5.1.), no material retido na membrana foi adicionado 7 mL do meio Brain Heart Infusion (BHI), por 6 horas a 37°C para induzir a passagem dos esporos para forma vegetativa, uma vez que esses sobrevivem à descontaminação e liquefazem todo meio de LJ, impossibilitando a recuperação de BAAR (COSTELLAT et al., 1977). Passado esse período, o material foi centrifugado a 2500 x g por 20 minutos (Excelsa 3 modelo 204-NR) e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram posteriormente tratados com 5 mL de solução de ácido sulfúrico a 4,0% por 10 minutos a temperatura ambiente com uma gota de vermelho de fenol a 0,4% como indicador de pH. A partir desse ponto, foram seguidos os mesmos procedimentos desenvolvidos para as águas limpas (Item 4.6.1.).

4.6. Identificação das micobactérias.

As micobactérias isoladas foram identificadas pela metodologia clássica quanto a álcool-ácido-resistência, aspectos fisiológicos (temperatura e velocidade de desenvolvimento da colônia), morfologia colonial e aspectos bioquímicos, seguindo os protocolos estabelecidos no manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias (BRASIL,

2008). Após o isolamento das micobactérias, foi realizada a análise do perfil dos ácidos micólicos (LEITE et al., 1995; TANAKA et al., 2003) e a técnica do PRA segundo LEAO et al. (2004), com algumas modificações.

As micobactérias foram enviadas ao Centro de Tuberculose e Micobactérias do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Porto, Portugal) para estudos posteriores durante o período da bolsa de doutorado sanduíche do CNPq.

Em Portugal, foram feitas técnicas de PCR e seqüenciamento dos fragmentos dos genes 16S rRNA (564 bp), *hsp65* (420 bp) segundo DEVULDER et al. (2005) para estudos filogenéticos dessas micobactérias, proporcionando assim uma melhor precisão na identificação dessas espécies.

4.6.1. Análise de ácidos micólicos.

Inicialmente os ácidos micólicos foram obtidos na forma livre e depois de serem extraídos foram submetidos à cromatografia em camada delgada (LEITE et al., 1995; LEITE et al., 2005).

4.6.1.1. Saponificação e purificação dos ácidos graxos.

A saponificação dos ácidos graxos foi realizada pela emulsão de três alçadas de cultura micobacteriana, retiradas do meio L.J., em 2,0 mL de solução de hidróxido de potássio a 5% em metoxietanol, com posterior aquecimento a 110°C, durante duas horas. Após esse período, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a solução foi acidificada com 1,0mL de ácido sulfúrico a 20%. Após a agitação em “vortex”, adicionou-se 2,0mL de água destilada, seguido de nova agitação. Em seguida, foram adicionados 5,0mL de éter etílico, seguido por nova agitação. A fase etérea, contendo os ácidos micólicos, foi transferida para outro tubo e essa operação foi repetida mais uma vez. Em seguida foi realizada a lavagem da fase etérea em 2,0mL de água destilada, por três vezes, e após essas lavagens o éter foi removido em banho-maria a 50°C.

Esta etapa da saponificação corresponde à etapa de libertação das ligações covalentes entre os ácidos micólicos e a estrutura subjacente (o arábino-galactano) da parede micobacteriana, que é um fator da resistência intrínseca aos agentes físico-químicos do meio ambiente (DAVID et al., 1989).

4.6.1.2. Metilação com diazometano.

Para promover a mobilidade dos ácidos micólicos em cromatografia de camada delgada (CCD), estes foram metilados inicialmente com diazometano. A metilação dos ácidos micólicos foi realizada pela adição de 1,0mL de diazometano, preparado a partir de hidróxido de nitrosometiluréia-potássio, a cada amostra, deixando-os em contato por 10 minutos, e posterior secagem em banho-maria a 50°C.

4.6.1.3. Cromatografia em camada delgada.

Para a realização da cromatografia em camada delgada, dissolveu-se o resíduo contendo os ácidos micólicos com 0,1mL de éter etílico. Com o auxílio de tubos capilares, as amostras foram aplicadas nas placas de sílica gel G (20x20cmx0,25mm – Merck ou Sigma) (cromatograma). Foram utilizados dois sistemas de solventes, 3 placas eluídas com diclorometano e 3 placas eluídas com éter etílico-éter de petróleo (12:88, v/v). Após a secagem das placas à temperatura ambiente, os cromatogramas foram revelados pela aspensão de uma solução de rodamina 0,01% em tampão fosfato 0,25M.

Foram determinados os perfis de ácidos micólicos pela comparação com os padrões conhecidos. Como padrões foram acrescentados nas placas de cromatografia os ácidos micólicos das seguintes espécies: *M. chelonae* (I, II), *M. fortuitum* (I, V), *M. tuberculosis* (I, III, IV) e *M. avium-intracellulare* (I, IV, VI), Figura 1.

4.6.2. Método do PRA (*PCR-restriction enzyme analysis*).

4.6.2.1. Termólise para obtenção do DNA bacteriano.

Uma quantidade de cultura micobacteriana proveniente de um raspado do meio de cultura foi misturada com 100µL-200µL tampão TE (Tris-Cl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%) em tubos *ependorf* e submetida a três ciclos de 10 minutos de fervura e congelamento(-20°C). O lisado foi mantido congelado até o momento do uso. Este DNA bacteriano foi utilizado em todos os estudos moleculares inclusive no do seqüenciamento.

4.6.2.2. Amplificação de DNA e geração dos fragmentos de restrição.

Para a amplificação do fragmento de 441 pares de bases (pb) do gene *hsp65* foram utilizados os *primers* Tb11-(5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT3') e Tb12-(5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT 3'). Para cada amostra foram utilizados 23µL de mistura reativa (Supermix, Gibco), 0,25µL de cada *primer* (Tb11 e Tb 12) e 3µL do lisado de DNA (template). O DNA foi submetido à desnaturação a 94°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. O último passo foi a extensão do DNA a 72°C por 7 minutos.

Após essa amplificação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% para se verificar se houve a amplificação do fragmento de 441pb, confirmando o gênero *Mycobacterium*.

No passo seguinte, duas alíquotas de 10µL do material amplificado foram digeridos pelas enzimas *BstE* II e *Hae* III (Gibco) para a identificação da espécie micobacteriana. A restrição com a enzima *BstE* II ocorreu a 60°C por uma hora e a restrição com a enzima *Hae* III a 37°C por uma hora.

Os fragmentos gerados pelas enzimas de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 4% com marcadores de peso molecular de 100 e 25pb (DNA ladder, Gibco).

4.6.2.3. Análise dos resultados do PRA.

As imagens dos géis foram processadas usando o AlphaImager[®] Imaging System (Alpha Innotech Corporation, California, USA). Com esse programa foram calculados os pesos moleculares de cada banda utilizando como referência as cepas padrão e os marcadores de peso molecular de 50 e 25pb. Foram analisados os padrões de restrições obtidos e as cepas identificadas de acordo com a base de dados do site (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) PRASITE, 2007.

4.6.3. PCR (*Poymerase Chain Reaction*) e Sequenciamento.

Primeiramente foi feita uma identificação das micobactérias pelas técnicas do PRA (PCR- restriction enzyme analysis) e pela técnica dos ácidos micólicos. Depois o DNA extraído por termólise (item 4.5.2.1.) foi congelado durante a padronização do sequenciamento feito em Portugal.

Em Portugal, a partir desse DNA congelado, foi padronizada uma única reação de PCR que pudesse ser utilizada por dois pares de primers diferentes (g2R / rM582R e Tb11 / Tb12) que amplificaram respectivamente os fragmentos de DNA dos genes que codificam o 16S rRNA e *hsp65* (Tabela 4). Após a realização da PCR de todas as micobactérias isoladas para confirmar o gênero *Mycobacterium*, foram escolhidos alguns isolados (que tiveram melhor amplificação e também apresentaram resultados conflitantes nos testes dos ácidos micólicos e PRA) e junto com algumas cepas padrão (*M. marinum* e *M. bovis*) foi realizado o sequenciamento desses genes e os estudos do material sequenciado como o BLAST para teste de similaridade e a construção de árvores filogenéticas (DEVULDER et al., 2005).

4.6.3.1. Preparação do DNA e PCR.

O DNA cromossomal foi liberado das células bacterianas pela termólise (item 4.6.2.1.) segundo LEÃO et al. (2004).

A amplificação do gene 16S rRNA foi feita com os *primers* g2R e rM582R (DE BEENHOUWER et al., 1995) que correspondem às posições 50-582 no *M. bovis* (SUZUKI et al., 2001). Teoricamente, todas as cepas podem ser amplificadas com esses *primers* por ser uma área altamente conservada (DEVULDER et al., 2005).

A amplificação do gene *hsp65* foi feita empregando *primers* derivados dos *primers* Tb11 e Tb12 (RINGUET et al., 1999) nas posições alvo 396-836 da sequência publicada do *M. tuberculosis* (SHINNICK, 1987).

Tabela 4. Primers utilizados na PCR.

Gene	Primer	Direção*	Sequencia (5'-3')
16S rRNA	g2R	F	GAGAATTCGTGCTTAACACATGCAAGTCG
	rM582R	R	ATGGATCCGTGAGATTTACGAACAACGC
<i>hsp65</i>	Tb11	F	ACCAACGATGGTGTGTCCAT
	Tb112	R	CTTGTCGAACCGCATACCCT

*F e R representam respectivamente *forward* e *reverse primer*.

4.6.3.2. Protocolo da PCR.

Depois de uma breve centrifugação do DNA bacteriano contido no *eppendorf*, 5-10µL do sobrenadante foi utilizado para amplificação. Foi preparado uma mistura reativa que pudesse ser usada para ambos os pares de primers (g2R e rM582R) e (Tb11 e Tb12) sendo que a reação de amplificação do termociclador foi a mesma: Um ciclo de 94°C por 10 minutos; quarenta e cinco ciclos (94°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto) e

terminando com 72°C por 7 minutos. Para verificar a amplificação 5-10µL do produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1% de acordo com a padronização prévia (LEÃO et al. 2004), com algumas modificações.

Tabela 5. Mistura reativa utilizada nas ampliações com os *primers* (g2R e rM582R) e (Tb11 e Tb12).

Reagentes	[] Stock	Volume 1x (µL)	Volume 10x (µL)	[] Final
H ₂ O MilliQ	-	19.8	198	-
Glicerol	50%	10	100	10x
Tampão Taq	10x	5	50	1x
MgCl ₂	25mM	3	30	1.5 mM
<i>Primer</i>	10µM	2.5	25	0.5 µM
<i>Primer</i>	10µM	2.5	25	0.5 µM
DNTP A	10mM	1	10	0.2 mM
DNTP T	10mM	1	10	0.2 mM
DNTP G	10mM	1	10	0.2 mM
DNTP C	10mM	1	10	0.2 mM
Taq Polimerase	5 U/µL	0.2	2	1 U/reacção
Vol. Total Mix	-	47	470	-
DNA bacteriano	-	5-	-	-

4.6.3.3. Sequenciamento.

As cepas que tiveram melhor amplificação foram selecionadas para o seqüenciamento, sendo então selecionadas seis amostras (amostras número: 18, 20, 24, 25 e mais dois padrões *M.bovis* e *M. marinum*).

4.6.3.4. Purificação do material amplificado.

O material amplificado foi purificado usando um Kit de purificação de PCR JETQUICK (GENOMED), conforme Figura 10.

Primeiramente em um tubo *ependorf* (A) a amostra foi preparada adicionando 400µL da solução H, que é uma solução de ligação (hidroclorato de guanidina e isopropanol) em um volume máximo de 100µL do produto amplificado (A). Em seguida, essa mistura foi colocada em uma coluna JETQUICK e centrifugada a 12.000 x g por um minuto e descartado o material que passou através da coluna (B). Após, foi adicionado à coluna 500µL da solução H2, que é a solução de reconstituição (etanol, NaCl, EDTA e Tris/HCl), centrifugado novamente a 12.000 x g por um minuto (C), e descartado novamente o que passou pela coluna e logo após centrifugado 12.000 x g por um minuto. Para finalizar, a coluna JETQUICK foi colocada dentro de um *ependorff* comum de 1.5mL ao qual foi adicionado de 50µL de água estéril ou tampão TE (10 mM Tris/HCl, pH 8.0) no centro da matriz de sílica da coluna para ser centrifugada a 12.000 x g por dois minutos (D). Após essa centrifugação, o produto final de PCR purificado no interior do *ependorff* estava pronto para ser utilizado (E).

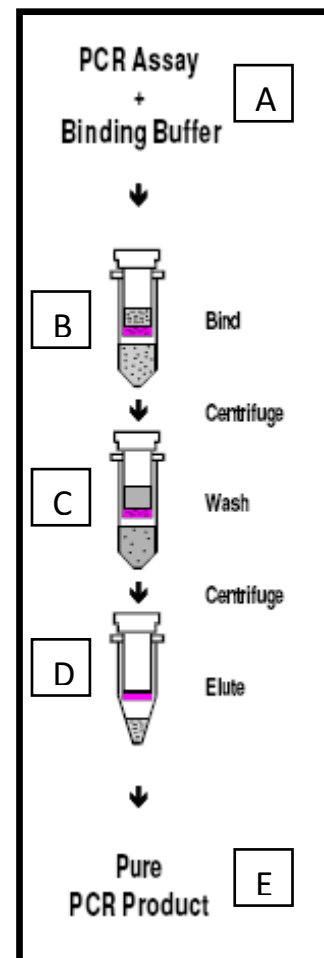


Figura 10. Esquema de purificação de DNA (JETQUICK).

4.6.3.5. PCR de seqüenciamento.

PCR para o seqüenciamento consistiu na amplificação do DNA anteriormente purificado com cada *primer* separadamente junto com *big dye thermocycle sequencing*, sistema que utiliza a estratégia de marcação de cada nucleotídeo terminal com fluorocromo de cor diferente. Na Tabela 6 foi detalhada a mistura reativa, sendo estabelecido o volume total de 10 μL para cada amostra.

A reação de seqüenciamento é similar a uma reação de PCR, onde uma pequena amostra de DNA é amplificada milhares de vezes *in vitro* e também faz uso de buffers, dNTPs, Taq, etc. Outra diferença da PCR é que nesta reação é utilizado apenas um *primer* e não um par de *primers*, pois ao seqüenciar um dos lados da dupla fita o outro é automaticamente conhecido ao mesmo tempo (FIGUEIREDO et al., 2003).

Tabela 6. Mistura para seqüenciamento do Big Dye V 1.1.

Reagente	Volume (μL)
Big Dye V 1.1	2,0 μL
DNA	2,8 μL
Primer	0,5 μL
H ₂ O	4,7 μL
Volume Final	10 μL

Como a PCR foi utilizada em seis amostras e cada uma amplificada com quatro *primers* diferentes (g2R e rM582R e Tb11 e Tb12), um total de 24 amostras foram submetidas ao seqüenciamento, sendo testados tanto o *primer forward* como *reverse* para se poder ter um

melhor controle dos resultados. Porém após a padronização da metodologia, o sequenciamento pode ser realizado apenas com o *primer forward*.

Para a PCR os seguintes ciclos foram utilizados: um ciclo de 94°C por 3 minutos; trinta e cinco ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos; 60°C por 4 minutos e terminando com 4°C para preservação do material amplificado.

4.6.3.6. Purificação dos produtos de seqüenciamento pelo etanol.

Para cada amostra, foi preparado um *ependorff* contendo 50µL de etanol 95%; 2,0µL de acetato de sódio 3M pH 4,6 e 1µL de glicogênio (para visualizar o sedimento). Nestes *ependorffs* foi adicionado todo o produto amplificado da reação anterior (PCR para seqüenciamento) sendo homogeneizado com a pipeta. Cada tubo foi agitado cuidadosamente em vortex e deixado à temperatura ambiente por uma hora seguida de centrifugação em velocidade máxima por 20 minutos. Todo o sobrenadante foi retirado e descartado cuidadosamente com uma pipeta. O sedimento foi lavado com 250µL de etanol 70% e levemente agitado com vortex. Os tubos foram novamente centrifugados em velocidade máxima por 5 minutos e logo após o sobrenadante foi retirado e descartado com cuidado. O sedimento (em *ependorff* com tampa aberta) foi secado em bloco a 90°C por um a dois minutos e depois mantido em temperatura ambiente por meia hora. Para finalizar foi guardado a 4°C para uso imediato, ou congelado para uso posterior (meses de conservação).

4.6.3.7. Preparação das amostras para seqüenciamento.

Os sedimentos foram ressuspensos em 30µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems). Foram então agitados em vortex e ressuspensos em *MicroAmp Optical tubes* (Tubos ópticos de polipropileno) devidamente identificados, e conservados a 4°C no escuro

até o momento exato do seqüenciamento automático no ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Minnesota,USA).

4.6.3.8. Análise dos produtos seqüenciados.

Os dados brutos vindos do seqüenciador foram analisados corrigindo-os com base nos picos do cromatograma, utilizando o software Bioedit (TIPPMANN, 2004). As seqüências foram então alinhadas usando o software Clustal X (LARKIN et al., 2007) e posteriormente cortadas e editadas para deixar no mesmo tamanho usando o software Proseq (CAI et al., 2002).

Finalmente para análise filogenética e construção de árvores foi utilizado o software MEGA 4.0 (KUMAR et al., 2008). O método utilizado na construção das árvores foi o método de “*neighbour-joining*” e a base de dados contendo 97 cepas do gênero *Mycobacterium* ATCC de Devulder et al. (2005) foi utilizada como referência. Como raiz (outgroup) das árvores foi utilizada a *Nocardia abscessus* DSM -44432T. Os detalhes de todas as cepas e os respectivos números de acesso estão no trabalho de DEVULDER et al., (2005).

Uma árvore filogenética é composta de nós e ramos, sendo que cada ramo conecta nós adjacentes. Os nós representam unidades taxonômicas e os ramos definem as relações entre essas unidades em termos de descendência e ancestralidade. O padrão de ramificação de uma árvore é chamado de topologia. O tamanho dos ramos (em um filograma) representa o número de mudanças que ocorrem em relação ao último nó. As unidades taxonômicas representadas pelos nós podem ser espécies, populações, indivíduos, proteínas ou genes (VIANEZ JÚNIOR, 2005).

Para se avaliar a estabilidade das árvores geradas foi usada a análise de “bootstrap” com 100 repetições para os métodos “*Neighbor-Joining*”. O *bootstrap* é um método genérico para estimar variabilidade em estatística. Ele foi criado por Bradley Efron e tornou-se tão

importante que, em estatística, a década de 80 é chamada a década do *bootstrap*. Com relação à análise de *bootstrap*, somente nós que ocorrem mais do que em 90% dos casos são confiáveis (EFRON e HALLORAN, 1996).

4.6.3.9. Análise de similaridade

Para análise de similaridade, as cepas sequenciadas foram comparadas com a base de dados Genbank usando a ferramenta BLAST.

BLAST ou *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, 2008) é um algoritmo para comparação de informações biológicas como sequências de amino ácidos e nucleotídeos. Através do BLAST podem-se fazer comparações entre sequências duvidosas ou de interesse com aquelas presentes no banco de dados da internet (GenBank). Genbank é uma base de dados de sequências de acesso público mantida nos EUA pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2008).

5. RESULTADOS.

5.1. Resultado da análise microbiológica.

Nas Tabelas 7, 8 e 9 são apresentados os resultados obtidos referentes ao local de colheita, número e porcentagem de amostras que atenderam ou não ao padrão estabelecido (BRASIL, 2004), em relação à coliformes totais, coliformes termotolerantes, bactérias heterotróficas e *S.aureus*.

Os resultados das médias das contagens de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos Microrganismos heterotróficos, Coliformes Termotolerantes, Coliformes Totais e *S.aureus* estão todos discriminados na Tabela 10. Também na mesma tabela estão os pontos de colheita das amostras de água, o pH, temperatura e a época do ano que as amostras foram colhidas além do total de cepas micobacterianas isoladas de cada ponto de colheita.

Tabela 7. Número e porcentagem de amostras de cada ponto de colheita que atenderam e não atenderam ao padrão para bactérias heterotróficas.

Ponto de colheita***	Amostra*	Não atenderam (>500UFC/mL)	Atenderam (<500UFC/mL)
	Nº	n (%)	n (%)
Córrego	1	6 (14,3)	0
Mina 1	2	2 (4,8)	4
Torneira 1	3	4 (9,5)	2
Torneira 2	4	6 (14,3)	0
Torneira 3	5	2 (4,8)	4
Bebedouro	6	6 (14,3)	0
Córrego	7	6 (14,3)	0
Total		32(76,3)	10(23,7)

*Foram analisadas um total de 42 (100%) amostras de água.

**Padrões microbiológicos estabelecidos pela Portaria nº 518 de 25/3/2004 da ANVISA e RIISPOA, 2006.

*** Foram analisadas seis amostras de cada ponto de colheita.

Tabela 8. Número e porcentagem de amostras de cada ponto de colheita indicando a presença e ausência de coliformes totais e termotolerantes e as amostras com resultado superior a 1000 UFC de coliformes termotolerantes por 100mL de água***.**

Ponto de colheita****	Amostra*	Totais (presença)	Totais (ausência)	Termotolerantes (presença)	Termotolerantes (ausência)	Termotolerantes >1000 UFC/mL
	Nº	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Córrego	1	6 (14,3)	0(0,0)	3 (7,1)	3 (7,1)	0
Mina 1	2	4 (9,5)	2(4,8)	2 (4,8)	4 (9,5)	0
Torneira 1	3	6 (14,3)	0(0,0)	6 (14,3)	0 (0,0)	0
Torneira 2	4	6 (14,3)	0(0,0)	6 (14,3)	0 (0,0)	0
Torneira 3	5	4 (9,5)	2(4,8)	2 (4,8)	4 (9,5)	0
Bebedouro	6	6 (14,3)	0(0,0)	4 (9,5)	2 (4,8)	0
Córrego	7	6 (14,3)	0(0,0)	6 (14,3)	0 (0,0)	6 (14,3)
Total		38(90,5)	4(9,5)	29(69)	13(31)	6(14,3)

*Foram analisadas um total de 42 (100%) amostras de água.

**Padrões microbiológicos estabelecidos pela Portaria nº 518 de 25/3/2004 da ANVISA.

***Padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução nº 357 de 17/3/2005 do CONAMA.

**** Foram analisadas seis amostras de cada ponto de colheita.

Tabela 9. Número de amostras em de cada ponto de colheita que foi positivo para a presença de *S.aureus*.

Ponto de colheita**	Amostra*	n (%)
Córrego	1	1 (3,6)
Mina 1	2	1 (3,6)
Torneira 1	3	0 (0,0)
Torneira 2	4	1 (3,6)
Torneira 3	5	0 (0,0)
Bebedouro	6	4 (14,3)
Córrego	7	1 (3,6)
Total		9(32,1)

*Foram analisadas um total de 28 (100%) amostras de água.

**Foram analisadas quatro amostras de cada ponto de colheita.

Tabela 10. Temperatura média da água, pH, número de isolados de micobacterianos de crescimento lento e rápido, populações de microrg. heterotróficos (UFC/mL), coliformes termotolerantes, colif. totais e *S. aureus* nos diferentes pontos de colheita de amostras de água.

Pontos de colheita	Nº do ponto de colheita	Temp. (média)	pH (média)	*Micobactérias		Coliformes Heterotróficos (UFC/mL)			Coliformes Termotolerantes (UFC/mL) x 100			Coliformes Totais (UFC/mL) x 100			<i>S.aureus</i> (UFC/mL)		
				Rápido	Lento	Verão	Outono	Inverno	Média	Verão	Outono	Inverno	Média	Verão	Outono	Inverno	Média
Córrego	1	24°C	7.46	0	1	8,1x10 ²	7,8x10 ²	8,7x10 ²	2,5x10 ²	0	5x10	1,5 x10 ³	1,1 x10 ³	1,8 x10 ³	2	0	2
Mina 1	2	23°C	8.01	0	13	6x10 ²	2,8x10 ²	2,1x10 ²	2,0x10 ²	0	0	2,7 x10 ³	0	7,5 x10 ²	1	0	1
Torneira 1	3	25°C	8.10	0	10	1,3x10 ³	2,3x10 ²	8,1x10 ²	1,5 x10 ²	100	4,5 x10 ²	1,2 x10 ³	1,0 x10 ³	3,0 x10 ³	0	0	0
Torneira 2	4	26°C	8.05	0	5	8,8x10 ²	5,5x10 ²	8,9x10 ²	4,5 x10 ²	1,0 x10 ²	2,0 x10 ²	2,7 x10 ³	1,8 x10 ³	2,0 x10 ³	3	0	3
Torneira 3	5	30°C	8.08	0	1	1,3x10 ³	3,1x10 ²	0,5x10	5,0 x10 ²	0	0	2,6 x10 ³	1,4 x10 ³	0	0	0	0
Bebedouro	6	26°C	7.59	0	0	2,3x10 ³	1,3x10 ³	1,5x10 ³	1,5 x10 ²	5,0 x10 ²	1,0 x10 ²	1,4 x10 ³	2,7 x10 ³	1,2 x10 ³	10	3	13
Córrego	7	25°C	7.69	3	0	1,3x10 ³	2,1x10 ³	-	5,9 x10 ³	4,0 x10 ³	4,2 x10 ³	1,3 x10 ⁴	1,0 x10 ³	8,2 x10 ³	0	2	2

5.2. Identificação de Micobactérias nas amostras de água de biofilmes.

5.2.1. Ácidos Micólicos.

As Figuras 11, 12 e 13 mostram placas de sílica gel com os resultados do método químico da análise do perfil de ácidos micólicos, baseado na técnica de LEITE et al. (1995). Como referência foram utilizados os ácidos micólicos das cepas padrão *M. tuberculosis* (TB), *M. avium* (AV), *M. fortuitum* (F) e *M. smegmatis* (S), sendo identificados 6 tipos de ácidos micólicos (I, II, III, IV, V e VI) formando diferentes perfis de acordo com grupos de microrganismos identificados. Os resultados dos ácidos micólicos são apresentados na Tabela 11. As cepas números 01, 03, 05, 06, 21, 25, e 27 não puderam ser analisadas por esse método, ou por não haver massa bacteriana suficiente para o experimento ou por não apresentarem resultados nas placas de sílica gel.

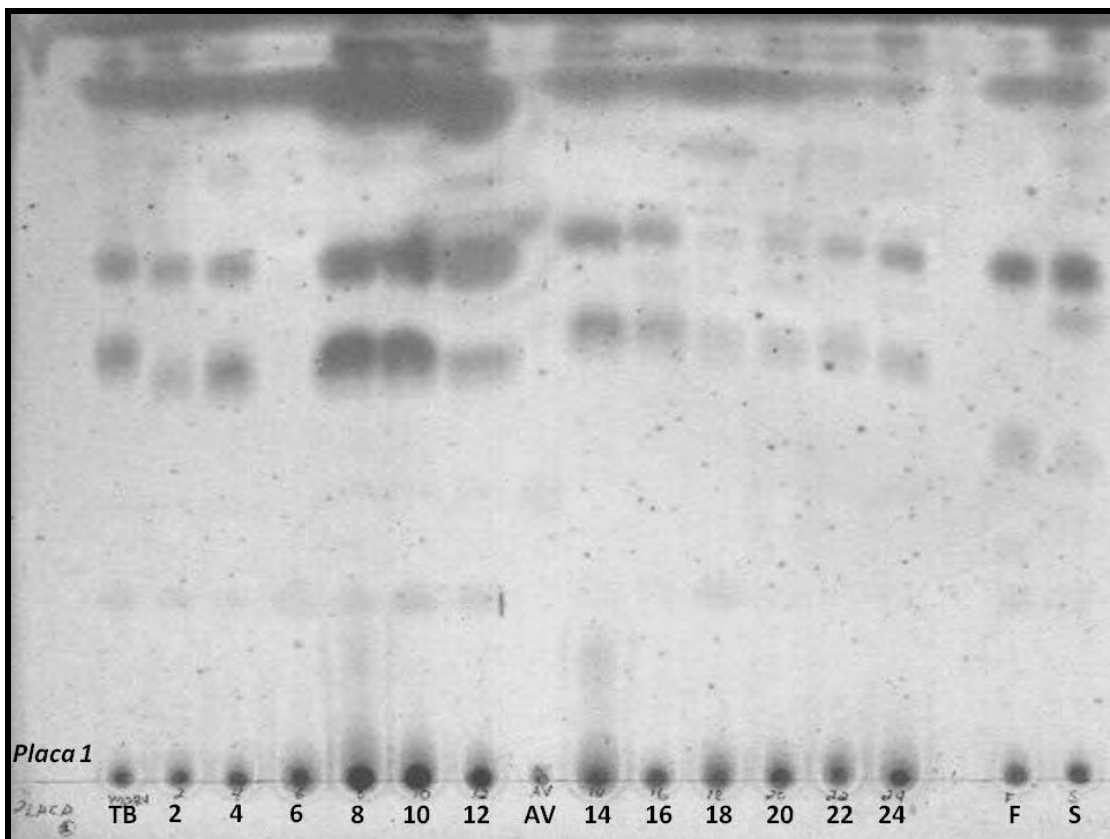


Figura 11: Perfil dos ácidos micólicos, em placa de sílica gel de vidro e eluição em diclorometano (DCM).

Na figura anterior (Figura 11) são apresentados os perfis de ácidos micólicos das amostras 02, 04, 06, 08 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24. Os padrões utilizados foram *M. tuberculosis* (TB) (I,III, IV), *M. avium* (AV)(I,IV,VI), *M. fortuitum*(F) e *M.smegmatis*(S) (I,(II),V).

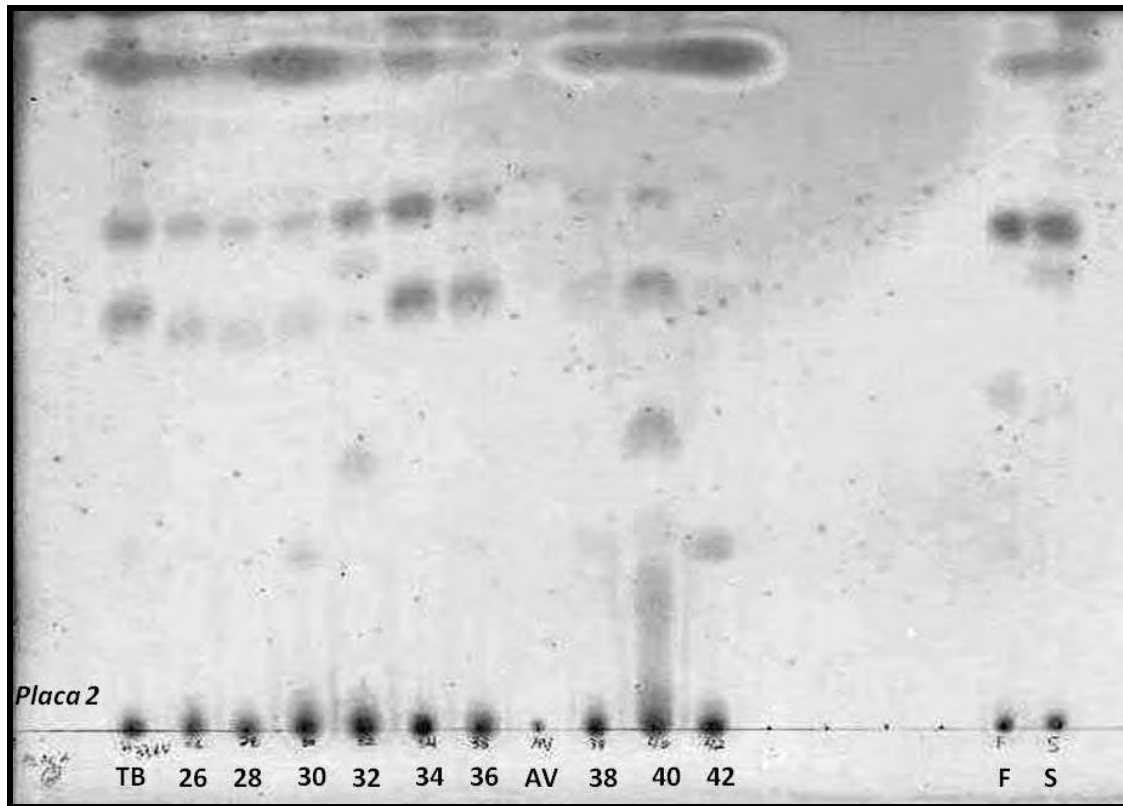


Figura 12: Perfil dos ácidos micólicos, em placa de sílica gel de vidro e eluição em diclorometano (DCM).

Nesta placa (Figura 12) foram testadas as amostras 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42. Os padrões utilizados foram *M. tuberculosis* (TB) (I,III, IV), *M. avium* (AV) (I,IV,VI), *M. fortuitum*(F) e *M. smegmatis* (S)(I,(II),V).

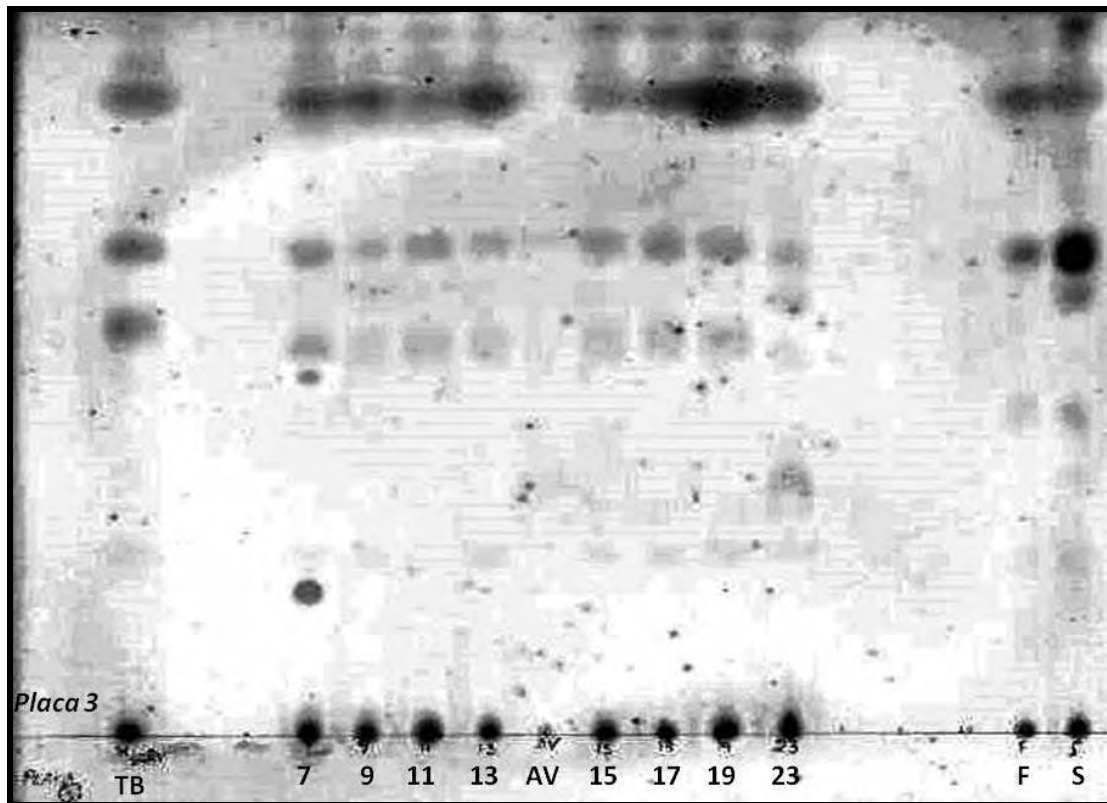


Figura 13: Perfil dos ácidos micólicos, em placa de sílica gel de vidro e eluição em diclorometano (DCM).

Nesta placa (Figura 13) foram testadas as amostras 07, 09, 11, 13, 15, 17, 19, 23. Os padrões utilizados foram *M. tuberculosis* (TB)(I,III, IV), *M. avium* (AV)(I,IV,VI), *M. fortuitum*(F) e *M.smegmatis* (S)(I,(II),V).

Tabela 11. Resultado da análise dos perfis dos ácidos micólicos, após comparação com os padrões.

AMOSTRAS	PERFIS DOS ÁC. MICÓLICOS
02	I,III,IV
04	I,III,IV
07	I,III,IV
08	I,III,IV
09	I,III,IV
10	I,III,IV
11	I,III,IV
12	I,III,IV
13	I,III,IV
14	I,III,IV
16	I,III,IV
17	I,III,IV
18	I,III, IV
19	I,III,IV
20	I,II,IV
23	I,IV,VI
24	I,III,IV
26	I,III,IV
28	I,III,IV
30	I,III,IV
32	I,IV,VI
34	I,III,IV
36	I,III,IV
38	I,III,IV
40	I, IV,VI
42	I,III,IV
<i>M. tuberculosis</i>	I, III, IV
<i>M. avium</i>	I, IV, VI
<i>M. smegmatis - M. fortuitum</i>	I, (II), V

Foi verificado um predomínio de micobactérias com perfil I,III,IV para ácidos micólicos (Tabela 11), referente ao *M.gordoniae*.

5.2.2. Técnicas Moleculares.

5.2.2.1. PRA (PCR-restriction enzyme analysis).

As Figuras 14, 15 e 16 mostram os géis de agarose a 4% com os resultados da digestão das enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III* do DNA das 33 micobactérias isoladas neste trabalho. Ao lado esquerdo estão os resultados da digestão do DNA das amostras pela enzima *BstE II* e do lado direito estão os resultados da digestão das amostras pela enzima *Hae III*. Na fig.14 estão os resultados da digestão do DNA dos isolados micobacterianos numerados de 1 a 12 pelas enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Também estão no gel os marcadores de peso molecular de 100pb e 25pb e a letra P corresponde ao perfil de *M.bovis* empregado como referência.

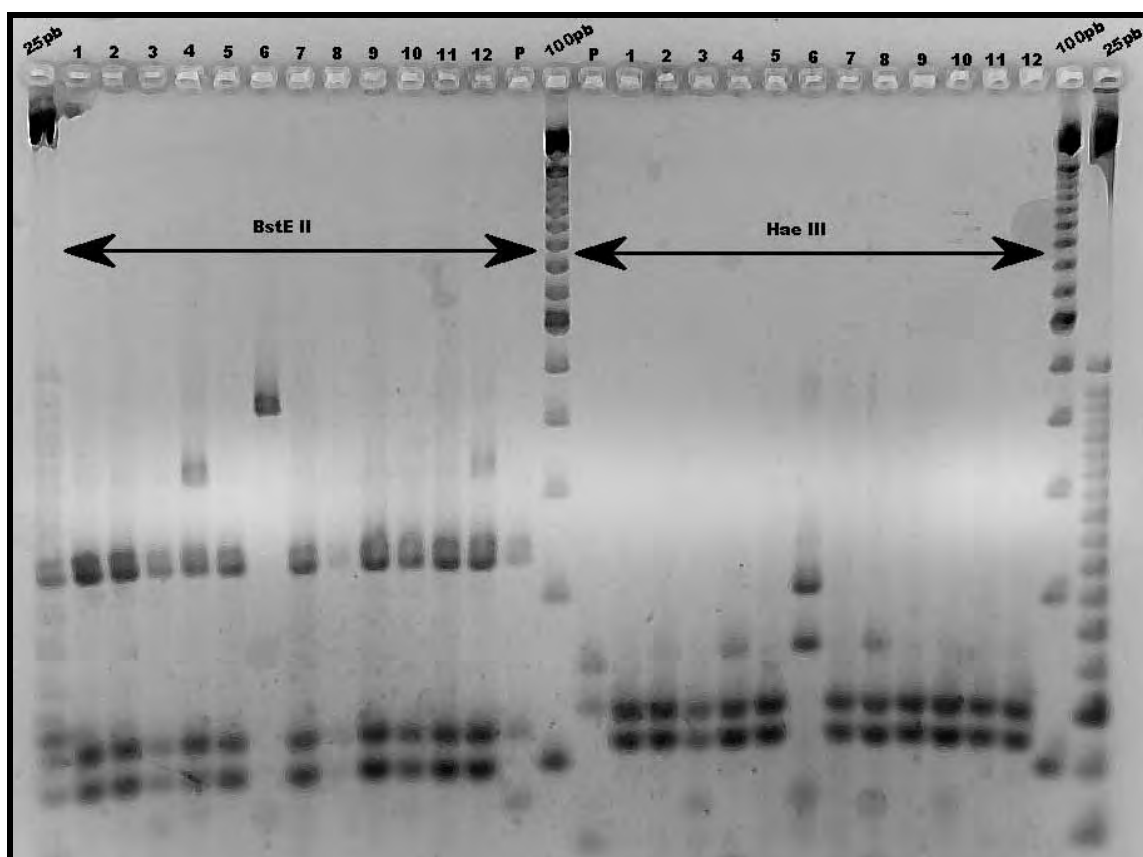


Figura 14. Gel de eletroforese a 4% das amostras de DNA submetidas à digestão pelas enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Os isolados micobacterianos estão numerados de 1 a 12.

Na fig.15 estão os resultados da digestão do DNA dos isolados micobacterianos numerados de 13 a 26 pelas enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Também estão no gel os marcadores de peso molecular de 100pb e 25pb e a letra P corresponde ao perfil de *M.bovis* empregado como referência.

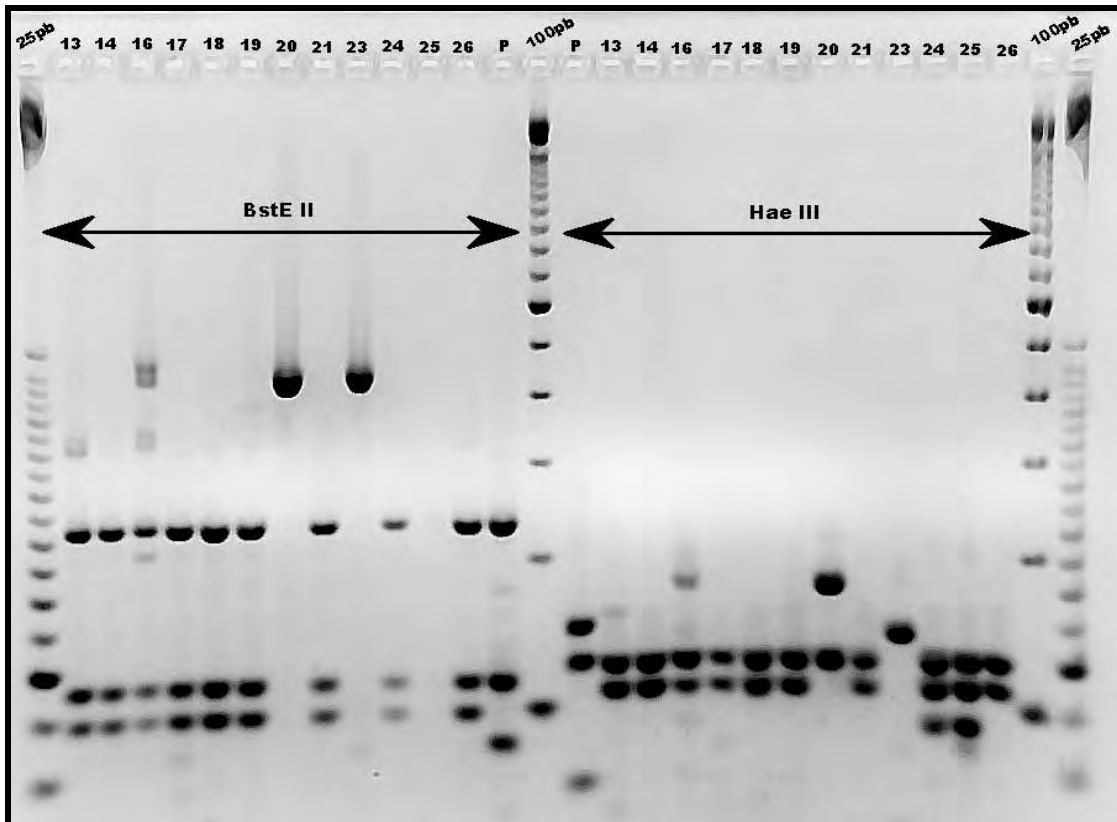


Figura 15. Gel de eletroforese a 4% das amostras de DNA submetidas à digestão pelas enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Os isolados micobacterianos estão numerados de 13 a 26.

Na fig.16 estão os resultados da digestão do DNA dos isolados micobacterianos numerados de 27 a 42 pelas enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Também estão no gel os marcadores de peso molecular de 100pb e 25pb e a letra P corresponde ao perfil de *M.bovis* empregado como referência.

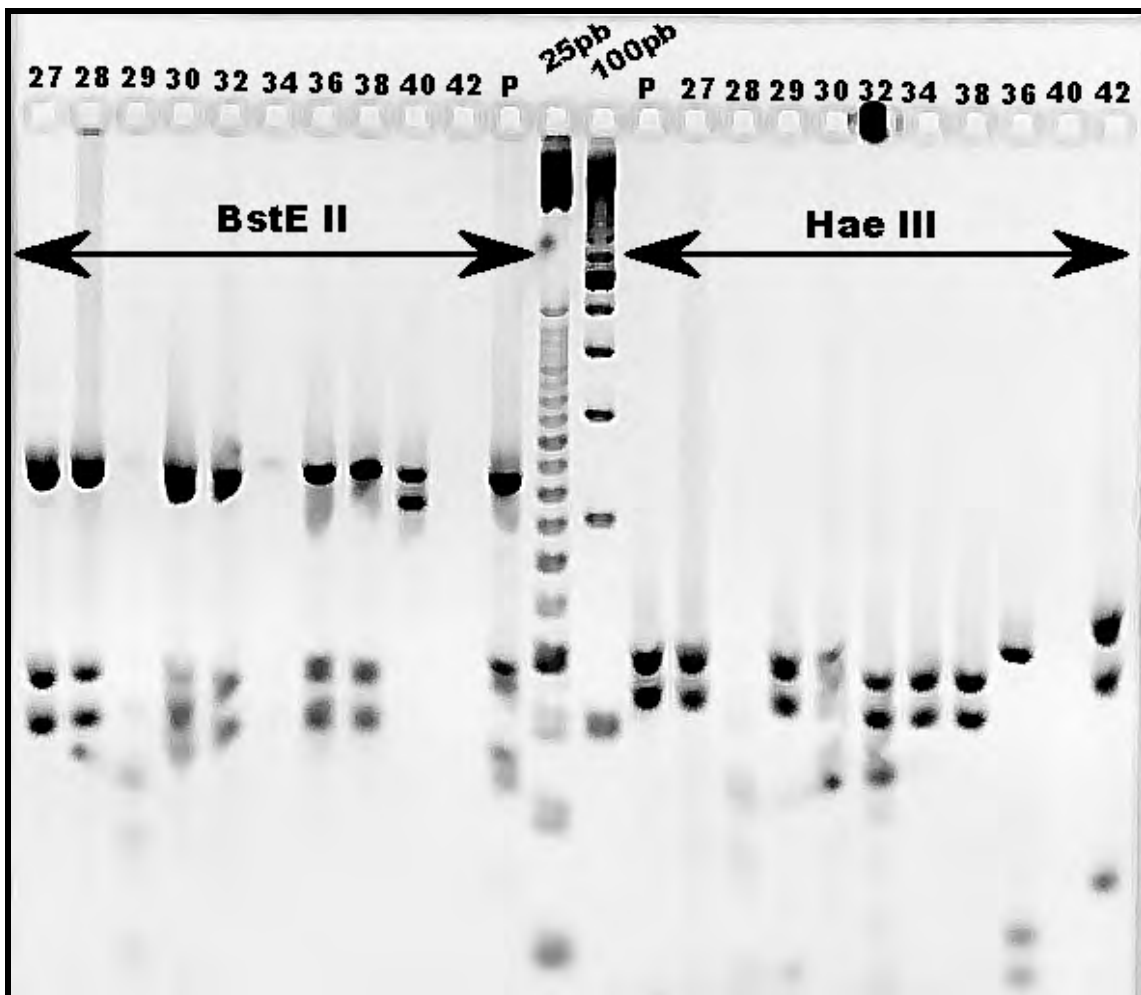


Figura 16. Gel de eletroforese a 4% das amostras de DNA submetidas à digestão pelas enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Os isolados micobacterianos estão numerados de 27 a 42.

5.2.2.2. Padronização da PCR.

Todas as 33 amostras de DNA micobacteriano isoladas neste trabalho foram submetidas a PCR. Na Figura 17, são apresentados os resultados do PCR empregando os pares de *primer* Tb11 e Tb12 para amplificação do fragmento do gene *hsp65*, utilizando o programa de amplificação proposto por LEAO et al. (2004), com algumas modificações.

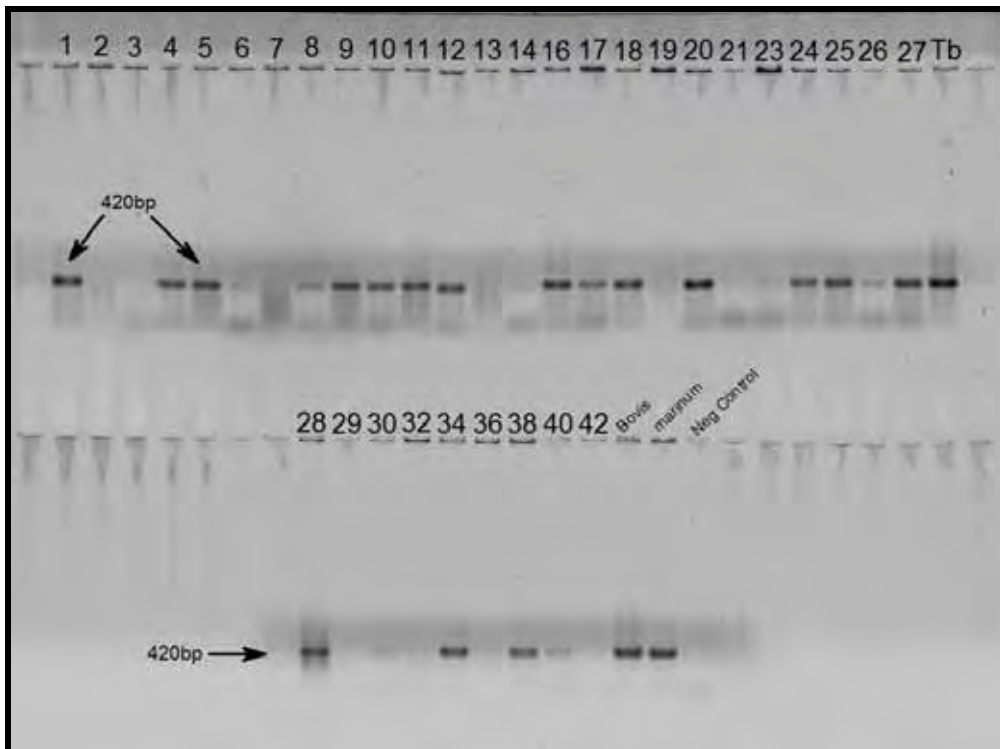


Figura 17. Gel de eletroforese a 1% das amostras de DNA micobacteriano submetidas à amplificação pelos *primers* Tb11 e Tb12 (420bp). Além de um controle negativo, *M.bovis* e *M. marinum* foram utilizados como controle positivo da reação.

Na Figura 18, são apresentados os resultados da PCR empregando os pares de *primer* g2R e rM582R para amplificação do fragmento do gene 16S r RNA, utilizando o programa de amplificação de LEAO et al. (2004), com algumas modificações.

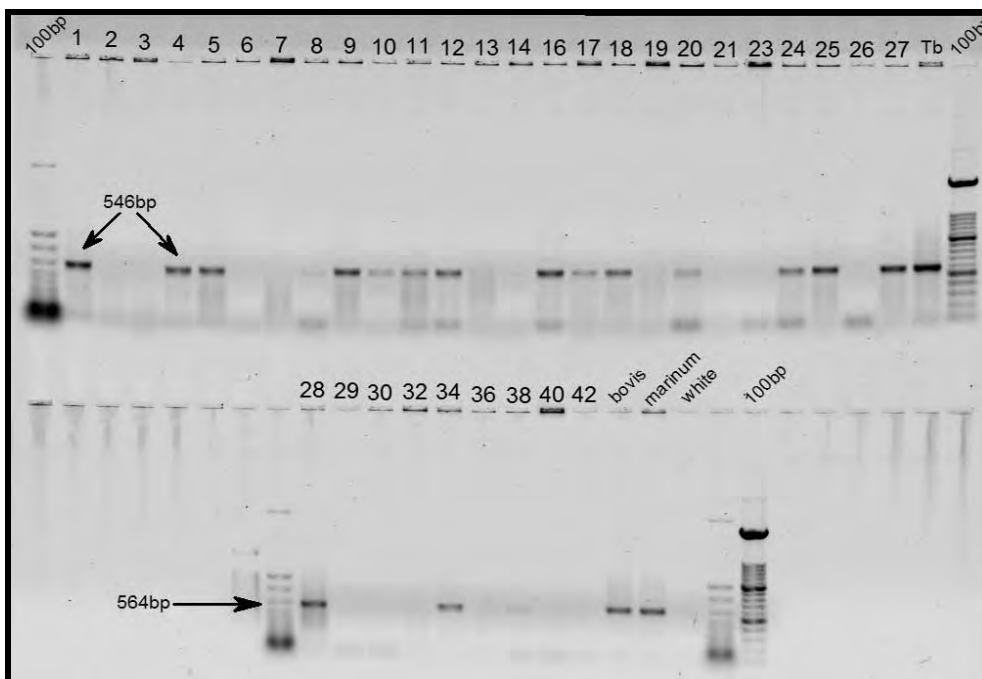


Figura 18. Gel de eletroforese a 1% das amostras de DNA micobacteriano submetidas à amplificação pelos *primers* g2R e rM582R (564bp). Além de um controle negativo, *M.bovis* e *M. marinum* foram utilizados como controle positivo da reação.

5.2.2.3. Seqüenciamento.

Como visto nas figuras 17 e 18, nem todas as micobactérias amplificaram nas reações de PCR (que precederam ao seqüenciamento) gênero específico. Isso pode ser devido ao fato do DNA ter sido extraído por termólise (faz com que o seu tempo de conservação seja mais curto do que uma extração tradicional de DNA), ter sido transportado para Portugal em temperatura ambiente ou ter ficado muito tempo conservado em temperaturas de no máximo -10°C. Porém, todas essas micobactérias já tinham sido identificadas pelo método do PRA (Item 4.5.2.1.) logo após a extração do DNA bacteriano e confirmado o gênero e a espécie em todas elas.

O seqüenciamento foi realizado com as cepas número 18, 20, 24, 25 e mais dois padrões (*M. bovis* e *M. marinum*). Essas cepas foram escolhidas porque tiveram ótima amplificação em ambos os pares de *primers* (figura 17 e 18) e também devido ao fato de terem tido uma identificação inconclusiva nos métodos do PRA e ácidos micólicos.

5.2.2.4. Árvores filogenéticas do gênero *Mycobacterium*.

As árvores filogenéticas do gênero *Mycobacterium* foram feitas a partir dos dados de sequenciamento dos genes 16S rRNA e *hsp65* (Fig. 19 e 20). A concatenação de ambos os genes (16S rRNA e *hsp65*) em uma única árvore está representada na Figura 21. O método utilizado na construção das árvores foi o método de “*neighbour-joining*” e seis cepas sequenciadas foram incluídas dentro da árvore que já continha 97 cepas do gênero *Mycobacterium* ATCC. Como raiz das árvores foi utilizada a *Nocardia abscessus* DSM - 44432T. Os detalhes de todas as cepas e os respectivos números de acesso estão no trabalho de DEVULDER et al., (2005).



Figura 19. Árvore filogenética do gênero *Mycobacterium* utilizando seqüências do gene 16S rRNA. Setas vermelhas mostram onde estão as amostras 18, 20, 24, 25 e os padrões (bovisp e marip). Os números no dendograma são a porcentagem de ocorrência em 100 árvores “bootstrapped”.



Figura 20. Árvore filogenética do gênero *Mycobacterium* utilizando seqüências do gene *hsp65*. Setas vermelhas mostram onde estão as amostras 18, 20, 24, 25 e os padrões (bovisp e marinp). Os números no dendograma são a porcentagem de ocorrência em 100 árvores “bootstrapped”.



Figura 21. Árvore filogenética do gênero *Mycobacterium* derivada da concatenação dos genes 16S rRNA e *hsp65*. Setas vermelhas mostram onde estão as amostras 18, 20, 24, 25 e os padrões (bovisp e maring). Os números no dendograma são a porcentagem de ocorrência em 100 árvores “bootstrapped”.

Na tabela 12 estão os resultados do sequenciamento das cepas 18, 20, 24,25 mais os padrões *M.bovis* e *M.marinum* (controle positivo da reação). Os resultados do sequenciamento das referidas cepas foram comparados com Genbank utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST, 2008).

Tabela 12. Identificação e porcentagem de similaridade de quatro micobactérias isoladas mais dois controles positivos (*M.bovis* e *M. Marinum*) em comparação com os dados do Genebank usando a ferramenta de BLAST.

Cepas	Sequenciamento 16S rRNA (564bp)	Sequenciamento <i>hsp65</i> (441bp)
18	<i>M.gordonae</i> (99%)	<i>M.gordonae</i> (98%)
20	<i>M.lentiflavum</i> (91%)	<i>M.lentiflavum</i> (98%)
24	<i>M.gordonae</i> (98%)	<i>M.gordonae</i> (97%)
25	<i>M.gordonae</i> (99%)	<i>M.gordonae</i> (97%)
<i>M.bovis</i>	<i>M.bovis</i> (98%)	<i>M.bovis</i> (99%)
<i>M.marinum</i>	<i>M.marinum</i> (99%)	<i>M.marinum</i> (98%)

^a Números indicam as porcentagens de similaridade entre as amostras estudadas com cepas sequenciadas presentes na base de dados do GenBank.

Tabela 13. Identificação e origem da amostra, meio de cultivo, temperatura de incubação, velocidade de crescimento, resultados do PRA (*BstEII* e *HaeIII*), ácidos micólicos e sequenciamento dos genes 16S rRNA e *hsp65* de 33 isolados micobacterianos. Destacados em cinza estão os quatro isolados (18,20,24 e 25) que foram sequenciados segundo a metodologia padronizada neste trabalho.

Nº do tubo	⁶⁰ Nº amostra	Amostra	Meio	Cor	Temp.°C	Cresc.	<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	PRA	Ác.Micólicos	16S rRNA	<i>hsp65</i>
1	S2	^(b) Biofilme	Ogawa	ouro	37	Lento	223/106/92	127/111	<i>M.gordonae3</i>			
2	S2	Biofilme	Ogawa	laranja	30	Lento	224/107/93	127/111	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
3	S3	Biofilme	Ogawa	ouro	37	Lento	226/107/91	125/111	<i>M.gordonae3</i>			
4	S2	Biofilme	Ogawa	amarelo	30	Lento	225/107/94	125/111	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
5	S1	Biofilme	Ogawa	ouro	37	Lento	228/109/92	125/111	<i>M.gordonae3</i>			
6	S3	Biofilme	Ogawa	am. claro	30	Lento	454	211/175	<i>M.lentiflavum1</i>			
7	S1	Biofilme	Ogawa	laranja	37	Lento	238/115/98	130/113	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
8	S2	Biofilme	Ogawa	ouro	30	Lento	236/115/97	130/114	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
9	2	Água	LJ	laranja	37	Lento	236/115/98	130/114	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
10	S1	Água	LJ	ouro	30	Lento	228/113/99	130/115	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
11	2	Água	LJ	laranja	37	Lento	229/114/100	130/115	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
12	S2	Biofilme	Ogawa	ouro	30	Lento	230/114/101	130/115	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
13	S2	Biofilme	Ogawa	laranja	37	Lento	238/116/99	130/117	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
14	5	Água	LJ	laranja	30	Lento	238/115/99	131/118	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
16	3	Água	LJ	laranja	30	Lento	236/116/99	123/109	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
17	2	Água	LJ	laranja	37	Lento	238/116/99	124/110	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
18	S1	Biofilme	Ogawa	amarelo	30	Lento	236/117/99	133/113	<i>M.gordonae3</i>			<i>M.gordonae</i>
19	2	Água	LJ	laranja	37	Lento	234/117/99	133/119	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
20	4	Água	LJ	laranja	30	Lento	428	184/132	<i>M.triviale</i>			<i>M.lentiflavum</i>
21	2	Água	7H10	laranja	37	Lento	232/119/103	132/119	<i>M.gordonae3</i>			
23	7	Água	LJ	amarelo	37	Rápido	432	138/55	<i>M.flavescens1</i>			I,IV,VI
24	3	Água	LJ	laranja	30	Lento	235/120/105	131/116/100	<i>M.gordonae10</i>			<i>M.gordonae</i>
25	3	Água	LJ	laranja	37	Lento	232/117/99	131/116	<i>M.gordonae3</i>			<i>M.gordonae</i>
26	2	Água	LJ	amarelo	30	Lento	234/120/105	130/116	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
27	2	Água	LJ	laranja	37	Lento	235/115/99	138/122	<i>M.gordonae3</i>			
28	4	Água	LJ	ouro	30	Lento	243/115/99	127/111	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
30	2	Água	LJ	ouro	30	Lento	235/117/102	128/112	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
32	7	Água	LJ	amarelo	30	Rápido	447	141/62/55	<i>M.flavescens1</i>			I,IV,VI
34	3	Água	LJ	laranja	30	Lento	235/118/102	128/112/95	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
36	2	Água	LJ	amarelo	30	Lento	233/118/101	129/111	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
38	1	Água	LJ	ouro	30	Lento	232/116/101	129/112	<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV
40	7	Água	LJ	amarelo	30	Rápido	231/206	137/60/55	<i>M.phlei1</i>			I,IV,VI
42	4	Água	7H10	laranja	30	Lento			<i>M.gordonae3</i>			I,III,IV

^(a) Todos os dados e resultados das micobactérias isoladas neste trabalho estão descritos e detalhadas na Tabela 13. Na segunda coluna está o item “Nº da Amostra”, onde cada número representa o local onde a amostra foi colhida na fazenda: **(1)** Córrego antes de entrar na propriedade; **(2)** Torneira proveniente da Mina 1 perto da porteira, **(3)** Torneira proveniente da Mina 2 que fica na parte de fora do estábulo; **(4)** Torneira proveniente da Mina 2 que sai da caixa d’água (dentro da casa); **(5)** Torneira proveniente da Mina 2 que sai do aquecedor de água para limpeza do sistema de ordenha automática; **(6)** Bebedouro das Búfalas; **(7)** Córrego depois de sair da propriedade e receber toda a água proveniente da limpeza do estábulo.

^(b) Biofilmes também foram colhidos e estudados dos seguintes locais da fazenda: **(S1)** Torneira proveniente da Mina 1 perto da porteira; **(S2)** Torneira proveniente da Mina 2 que fica na parte de fora do estábulo; **(S3)** Torneira proveniente da Mina 2 que sai da caixa d’água (dentro da casa); **(S4)** Torneira proveniente da Mina 2 que sai do aquecedor de água para limpeza do sistema de ordenha automática; **(S5)** Cano dentro do bebedouro das búfalas.

6. DISCUSSÃO.

As placas Petrifilm usados neste trabalho para contagem de microrganismos heterotróficos, coliformes totais e termotolerantes e *S. aureus* foram de alta praticidade e sensibilidade, e assim como Santana et al. (2002), foi observado pouca liquefação do gel, apenas em amostras muito contaminadas, dificultando a interpretação dos resultados.

SANTANA et al. (2002) compararam os métodos rápidos simplate TPC- CI (*Total Plate Count – Color Indicator*) e Petrifilm^R AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. Concluíram que principal a vantagem das placas Petrifilm em relação aos métodos convencionais é a sua conveniência: são prontas para uso, eliminando as etapas de preparação dos meios de cultura e vidrarias necessários, ocupam menos espaço em incubadoras, geladeiras, armários, autoclaves, têm descarte mais fácil, não quebram, não derramam, podem ser congeladas para contagem posterior ou reanálise. Apesar de sua praticidade e sensibilidade, observaram que freqüentemente nas placas Petrifilm^R ocorria a liquefação do gel, dificultando a interpretação dos resultados. Estas mesmas observações foram feitas por CURIALE et al. (1990), BLACKBURN et al.(1996) e ROLIM et al. (1998).

Beloti et al. (2003), em seu trabalho, concluíram que as placas Petrifilm EC (contagem de coliformes totais e *E. coli*) podem ser usadas em águas naturais de rios, lagos e lagoas, além de ter mostrado uma boa correlação com o método padrão (NMP). As placas Petrifilm são mais práticas de serem usadas e rápidas nas leituras dos resultados, evitando repiques e o uso de grande quantidade de vidraria e meios de cultura como é usado no método tradicional (BELOTI et al., 2003).

Consoli et al. (2006), realizaram um estudo com um total de 56 amostras utilizando técnica da membrana filtrante associado ao meio de cultura Petrifilm – EC para detecção de coliformes total e fecal avaliando o grau de concordância com Colilert e obtiveram resultado de 94,6% de concordância entre as duas metodologias.

WU et al. (2008), após utilizarem placas Petrifilm para testar o isolamento de *E.coli*, afirmaram que essas placas consistem em um filme plástico revestido com agentes seletivos, nutrientes e um agente geleificante. E como resultado as placas mostraram somente colônias visíveis de *E.coli*, eliminando a necessidade da identificação de cada colônia e permitindo a contagem direta dessas bactérias nas placas.

A Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 da ANVISA (BRASIL, 2004), que descreve uma norma de qualidade da água para consumo humano, diz no seu capítulo IV, Art. 11, e Tabela 1, que o padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano é ausência de Coliformes Totais em 100mL da amostra e ausência de *E.coli* em 100mL da amostra. No parágrafo 7, diz ainda que a contagem de bactérias heterotróficas não deva exceder as 500 UFC por mL de amostra. Analisando as Tabelas 7 e 8 dos resultados em comparação com a legislação, podemos concluir que 90,5% das amostras foram classificadas como fora dos padrões em relação a coliformes totais e 69% das amostras foram classificadas como fora dos padrões em relação a coliformes termotolerantes. Trinta e duas amostras (76,3%) apresentaram contagens acima de 500 UFC/mL para microrganismos heterotróficos. Os pontos de colheita que apresentaram as populações mais baixas para microrganismos heterotróficos (Tabela 8) foram os pontos 2 (Mina 1) e 5 (Torneira 3). Ambos os resultados eram esperados, pois a Mina 1 é a mais isolada da propriedade e sem contato com animais, portanto menor probabilidade ser contaminada e a Torneira 3 é proveniente do reservatório que fornece

água para a limpeza do sistema de ordenha da propriedade. Esta água sofre aquecimento acima de 30°C e um produto de limpeza na tentativa de eliminar os microrganismos do sistema de ordenha.

As amostras que apresentaram as populações mais baixas para coliformes totais e termotolerantes (tabela 7) foram novamente as amostras provenientes dos pontos de colheita 2 (Mina 1) e 5 (Torneira 3). Porém a Portaria nº 518 estabelece que, água para consumo humano em toda e qualquer situação incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes e outras devem apresentar ausência de bactérias do grupo dos coliformes (totais e termotolerantes) em 100 ml de amostra. Sendo assim, das amostras analisadas, 100% estão impróprias para o consumo humano. Esta contaminação pode ser devido à infiltração de fossas, que comprometem o lençol freático, defeitos na canalização ou ainda contato direto com fezes humanas ou de animais (PELCZAR, et al., 1997).

Domingues et al. (2007) analisaram 43 amostras de água de poços artesianos e fontes alternativas (águas hospitalares, poços rasos, fontes naturais canalizadas, vertentes e caixa d'água), pela contagem de bactérias heterotróficas na cidade de Santa Maria-RS. Das 22 amostras provenientes de caixa d'água em 10 (43,5%) detectou-se mais de 500 UFC/mL. A contagem de bactérias heterotróficas em poços rasos depende das condições do poço tais como profundidade, tipo de captação, distância entre o poço e a fossa sanitária, entre outros. Das 11 amostras de poços rasos, nove evidenciaram mais de 500 UFC/mL. Silva *et al* (2003), analisando a qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas em Feira de Santana, na Bahia, observaram também um resultado expressivo de amostras com mais de 500 UFC/mL. Das 119 amostras analisadas naquele estudo, 85 (71,4%) apresentaram populações maiores que 500 UFC/mL. Esses dados mostram que águas naturais sem qualquer tipo de tratamento

apresentam na sua maioria uma população acima de 500UFC/mL de microrganismos heterotróficos.

A Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005), dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Sobre as condições microbiológicas para águas usadas para dessedentação de animais criados confinados no capítulo IV, Art. 16 é estabelecido que estas não deverão exceder o limite de 1000 coliformes termotolerantes (*E.coli*) por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras, colheitadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. Com base na Tabela 7, pode-se concluir que as amostras provenientes do ponto de colheita 6, bebedouro dos animais, por apresentarem valores abaixo dos máximos preconizados pela resolução nº 357 do CONAMA, as águas deste bebedouro podem continuar sendo utilizadas para dessedentação de animais. Essa resolução do CONAMA só limita parâmetros para dessedentação de animais criados confinados, porém os animais da propriedade estudada são criados em um regime de semi-confinamento podendo variar para o sistema extensivo, que são os sistemas de criação mais utilizados no Brasil.

No Art.62, Item a do regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA) de 2006 (BRASIL, 2006) regulamenta que os estabelecimentos de produtos de origem animal destinados à alimentação humana devem examinar microbiologicamente as águas utilizadas nestes estabelecimentos, não devendo demonstrar uma contagem global acima de 500 germes por mL de água. As águas provenientes dos pontos de colheita 4 e 5, torneiras 2 e 3, respectivamente, são utilizadas na sala de ordenha para lavar os utensílios usados na obtenção do leite. Neste estudo, conforme a Tabela 7, o ponto de colheita 4 apresentou 100% de amostras com valores acima de 500UFC/mL e o ponto de colheita 5 apresentou 2 amostras (33,33%)

com valores acima de 500UFC/mL. Porém as amostras provenientes da torneira 3 (aquecida de 35-40°C e adição de hipoclorito para limpeza do sistema de ordenha) tiveram apenas 2 amostras fora do padrão do RIISPOA, fato esse que ocorreu provavelmente devido as falhas de sanitização dessa água, que devido às altas temperaturas e os produtos nela adicionados deveria estar dentro dos padrões estabelecidos.

Verifica-se nas Tabelas 7 e 8 elevadas porcentagens de todos os pontos de colheita de água fora dos padrões microbiológicos de potabilidade para água de consumo humano e para utilização na produção de alimentos. Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos obtidos por VIANA et al. (1973) que analisaram amostras de água provenientes de fontes localizadas no meio rural em Minas Gerais e verificaram que 87,2% das águas de poços rasos e 87,5% das águas de minas estavam em desacordo com os padrões microbiológicos de potabilidade do RIISPOA (BRASIL, 2006) e ANVISA (BRASIL, 2004). Assim como no estudo feito por Amaral et al., (2004) que analisaram amostras de água das fontes de abastecimento, saída do reservatório e do estábulo em 30 propriedades leiteiras. Verificaram que 90,0% das amostras das fontes 86,7% dos reservatórios e 96,7% dos estábulos encontravam-se fora dos padrões microbiológicos de potabilidade.

Na Tabela 8, pode-se destacar, na água utilizada para o consumo humano e no estábulo (ontos de colheita 2 a 5), a presença de coliformes termotolerantes, este é uma fato importante, pois a *E.coli* é considerada como o mais importante indicativo de poluição fecal das águas (BAUDISOVA, 1997) e, conseqüentemente um risco à saúde quando se consome água em que esta bactéria está presente. KRAVITZ et al. (1999) consideram a *E. coli* como o principal indicador de potabilidade para águas não tratadas.

Verifica-se na Tabela 9 que foram isoladas bactérias do gênero *Staphylococcus* nos pontos de colheita número 1,2,4,6 e 7, sendo os pontos mais importantes o número 4 (Torneira 2) que é usado para lavagem dos material utilizado na ordenha e para consumo humano além do ponto de colheita 6 proveniente do bebedouro dos animais. Apesar de a população ser muito baixa no ponto de colheita 5 (3 UFC/mL), ADESIYUN et al. (1997) citam que a água utilizada na lavagem de equipamentos de ordenha quando contaminada é uma importante fonte de *Staphylococcus* para o leite, fato muito importante sob o aspecto de saúde pública, pois uma vez no leite, caso exista condição de temperatura e a presença de *S.aureus* produtores de enterotoxinas, esses microrganismos podem se multiplicar e atingir números que produzem uma quantidade de toxina capaz de produzir intoxicação. Adverte-se que a toxina estafilocócica é termoresistente, não sendo destruída durante o processo de pasteurização do leite, causando casos de gastroenterites em crianças e idosos (MELCHIADES et al. 1993).

No que se referem à saúde animal, os resultados do presente estudo mostram que a água utilizada na produção de leite pode ser uma fonte importante de *S.aureus* para o úbere, principalmente considerando que os bubalinos apresentam problemas sanitários semelhantes aos bovinos, como a mastite. As perdas com a mastite não estão ligadas somente ao produtor, uma vez que ocorrem além da redução em quantidade, mudanças na composição do leite. Apesar de vários patógenos poderem causar a mastite, *S. aureus* é provavelmente o agente infeccioso mais importante por causar uma crônica e profunda infecção nas glândulas mamárias que é muito difícil de ser tratada (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007).

Pode-se supor que as chuvas dos meses de verão tiveram alguma influência nos resultados finais nas contagens de bactérias aeróbias, *S. aureus*, coliformes totais e termotolerantes devido ao fato da matéria inorgânica e orgânica junto com os

microrganismos do meio ambiente terem sido carregados para os corpos d'água por lixiviação. Apesar das poucas amostragens realizadas neste trabalho, este fato pode sugerir que as contagens de microrganismos foram mais elevadas no período do verão em relação aos períodos de outono e inverno onde se têm poucas precipitações (PAYNE, 1986; KANAI, 2006).

Não foi possível estabelecer uma relação entre o isolamento de micobactérias e os fatores ambientais. Um dos motivos, pode ter sido a impossibilidade de estabelecer uma contagem do número de micobactérias em UFC/mL e também ao fato de que as amostras de águas obtidas no período chuvoso (verão) estavam com uma quantidade alta de diversos microrganismos ambientais, o que dificultou muito o isolamento de micobactérias. Esta dificuldade de isolamento de micobactérias em amostras com intensa contaminação por outras bactérias pode ser devido a competição natural por nutrientes entre as micobactérias e os outros microrganismos. Isto justifica o isolamento apenas de micobactérias de crescimento rápido nas amostras mais contaminadas (ponto de colheita 7 do córrego). Por outro lado, as micobactérias de crescimento lento foram predominantemente isoladas de águas com menor grau de contaminação com outras bacterias (pontos de colheita 1, 2, 3, 4 e 5).

Outros autores concluíram que em um grande número de estudos com águas naturais, nenhuma correlação foi encontrada entre o número de micobactérias e a contagem de coliformes fecais (SZEWZYK et al., 2000; FALKINHAM, 2002), mostrando assim que os parâmetros tradicionais de qualidade da água não podem ser usados como indicadores para a presença de micobactérias na água (LEE et al., 2008).

O isolamento de micobactérias provenientes de água já é bem conhecido, já que é considerada um *habitat* natural e uma fonte de micobactérias ambientais (SCHULZE-RÖBBECKE et al., 1992), e a sua presença tem sido relatadas por diversos autores

(LEITE, 1991; DAILLOUX et al., 1998; NEUMANN et al., 1998; FALKINHAM et al., 2001; GRANUCCI, 2001, KANAI, 2006).

As amostras do córrego (pontos de colheita 1 e 7) apresentaram resultados bem distintos. O ponto de colheita 1, na qual as amostras de água foram colhidas no local onde o córrego entra na propriedade, foi isolada apenas uma micobactéria ambiental comumente encontrada em águas, *M.gordonae*, de crescimento lento (NASCIMENTO e GONTIJO FILHO, 1991). Por outro lado, no ponto de colheita 7, retirada no córrego no final da fazenda, após passar por toda a propriedade e receber toda a água e dejetos sem qualquer tipo de tratamento, foi verificado o isolamento de três isolados micobactérianos de crescimento rápido. Foram identificados dois isolados de *M. flavescens*, que apesar de ser considerado não patogênico, pode estar associado a infecções do trato respiratório, infecções de pele e até infecções disseminadas em humanos (LEAO et al., 2004) e um isolado de *M. phlei*, que é uma bactéria ambiental muito isolada de plantas e amostras de solos, sendo considerada também não patogênica, porém com alguns casos esporádicos de infecções em humanos já tendo sido relatados (SHIMIZU et al, 1987).

O fato do *M.gordonae* ter sido a micobactéria mais isolada neste trabalho se justifica pelo fato desta ser extremamente comum no meio ambiente e encontrada também em sistemas de águas potáveis e águas naturais além de possuir alta resistência ao cloro. (PEDLEY et al, 2004). É uma das micobactérias consideradas contaminantes em laboratório de micobacteriologia e apesar de serem consideradas não patogênicas podem causar algumas infecções em humanos (RUIZ PEREZ, et al.,1999).

As outras amostras foram todas provenientes de água de duas minas da propriedade. Nas amostras provenientes do ponto de colheita 2 (mina 1) foram isoladas 12 colônias de *M. gordonae*, sendo que quatro foram de biofilmes presentes na torneira

dessa mina. O ponto de colheita 2 foi o local que teve maior quantidade de colônias micobactérias isoladas, porém esses dados não indicam que seja o local mais contaminado. Pelos dados das Tabelas 7 e 8, o ponto de colheita 2 foi o menos contaminado com outros microorganismos e devido a isso houve maior facilidade em se cultivar micobactérias, sem a interferência de outras bactérias contaminantes. Contaminantes esses que dificultaram muito o isolamento de micobactérias nas amostras provenientes dos pontos de colheita 6 e 7 (bebedouro dos animais e rio após receber os dejetos, respectivamente), pois mesmo ao se utilizar métodos de descontaminação e a cloração das amostras com 5ppm de cloro, não foi possível cultivar micobactérias nas amostras provenientes de pontos de colheita mais contaminados (veja tabela 13) da propriedade. Nos pontos de colheita 3 e 4, provenientes de minas, portanto, uma água de melhor qualidade e com poucos microorganismos, foram isoladas colônias de micobactérias e além de isolar-se *M. gordonae*, isolou-se *M. lentiflavum* no ponto de colheita 4 tanto de amostras de água quanto de biofilme. *M. lentiflavum* é uma micobactéria pouco isolada e pouco estudada, mas foi encontrada em várias infecções humanas (LEAO et al., 2004) e no meio ambiente (SILVA ROCHA et al., 1999).

Todas as micobactérias isoladas nas amostras de água nesse trabalho (*M. gordonae*, *M. lentiflavum*, *M. flavescens* e *M. phlei*) foram resistentes a cloração de 5ppm. Sendo assim, esses dados estão de acordo com Prince et al. (2005), que isolaram *M. gordonae* das águas de uma abatedouro de aves no interior de São Paulo, com 27,9% das cepas de *M. gordonae* isoladas provenientes de águas tratadas com 5ppm de cloro, mostrando a grande resistência dessas micobactérias à cloração. Steed e Falkinham, (2006) estudaram a resistência de algumas espécies micobacterianas ao cloro e concluíram que *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, e *M. phlei* são espécies altamente resistentes à cloração e, portanto formam biofilmes

muito rapidamente. Esses dados corroboram dados encontrados nesse trabalho onde isolou-se *M. flavescens* e *M. phlei* em amostras de água com 5ppm de cloro.

Sabe-se que devido ao fato de MAC e outras micobactérias serem resistentes a desinfecção (cloramina, dióxido de cloro, ozônio etc) junto com a eliminação dos outros microrganismos por esses desinfetantes faz com que as micobactérias fiquem “livres” para se proliferarem na ausência de competição. Este fato ocorre nos sistemas de distribuição de água potável, que são considerados ambientes perfeitos para a multiplicação de micobactérias, ocasionando o aumento do número de seres humanos e animais expostos a esses microrganismos (PEDLEY et al., 2004). Miyamoto et al. (2000) observaram que cepas de *Mycobacterium* spp sobrevivem à exposição ao cloro em concentração de 4mg/L por mais de 60 minutos.

Outros fatores importantes para a sobrevivência das micobactérias são multiplicação em baixas concentrações de nutrientes, associação à biofilmes e interações com protozoários (VAEREWIJK et al., 2005). Por outro lado, a cloração das amostras de água também pode ter interferido e impedido o isolamento de micobactérias sensíveis ao cloro, como por exemplo, *M. marinum*, que sobrevive apenas alguns instantes quando exposto a concentrações de cloro livre maiores ou iguais a 0.6 mg/l (SCHLOSSBERG, 2006).

Considerando a porcentagem de amostras positivas em cada temperatura de incubação, obtivemos melhores resultados naquelas incubadas a 30°C (60,6%), contra 39,4% das amostras isoladas a 37°C (Tabela 10). Resultado similar foi obtido por NEUMANN et al. (1997) e KANAI (2006), que também obtiveram os melhores resultados naquela temperatura. Para se isolar micobactérias é imprescindível considerar a temperatura de incubação, dando preferência àquela próxima à temperatura do *habitat*

natural. No entanto, é necessária a utilização de mais de uma temperatura de incubação, pois essa pode se tornar seletiva (VAEREWIJCK et al., 2005).

Para o isolamento de micobactérias, houve diferença significativa entre os meios utilizados. No meio à base de ovo (Lowestein-Jensen) foram isoladas 20 e no meio 7H10 foram isoladas apenas 2 de um total de 22 micobactérias (Tabela 13). Esses dados não comprovam a afirmação de Jenkins (1991) nas quais meios à base de ovos favorecem o crescimento de micobactérias de crescimento rápido, em detrimento das espécies de crescimento lento.

Foram identificados 27 (81,8%) isolados como *M.gordonae*, sendo 17 (51,5%) provenientes de amostras de água e 10 (30,3%) provenientes de biofilmes. Portanto, a maioria dos isolados tanto em biofilmes quanto na forma livre foram *M.gordonae*, justificando que a sua alta prevalência na forma livre está totalmente associada à presença de biofilmes. Esses dados mostram que ações humanas no meio ambiente influenciam a distribuição e prevalência das micobactérias, pois devido ao fato de serem capazes de formar biofilmes, podem permanecer em um sistema na forma livre apesar de serem de crescimento lento. Os biofilmes podem ser fontes importantes de micobactérias não tuberculosas e serem responsáveis por infecções, doenças e até epidemias (SENNA et al., 2008).

Falkinham (2007) mostrou a importância de se estudar biofilmes bacterianos ao recriar um biofilme de *M. avium* cepa A5 em um cateter de plástico. Após testar a susceptibilidade a antibióticos concluiu que as células que cresceram no biofilme eram significativamente mais resistentes a claritromicina e rifampicina do que as células que estavam em suspensão.

A maior dificuldade em se isolar micobactérias de amostras ambientais é a sua multiplicação lenta. Cultura tem sido o método “padrão ouro” para se evidenciar uma

infecção mesmo dependendo de um longo tempo de incubação necessário para o desenvolvimento das colônias de micobactérias (dois a oito semanas). O crescimento lento das colônias micobacterianas resulta em uma sobreposição de colônias contaminantes de outros microrganismos de multiplicação mais rápida, o que pode dificultar a visualização das colônias de micobactérias. Tentativas para eliminar os contaminantes por meio de diversas técnicas de descontaminação têm sido realizadas (SCHLOSSBERG, 2006; PALOMINO et al., 2007).

A alta taxa de recuperação de micobactérias de crescimento lento em amostras de água tratada pode ser explicada pela eliminação de grande parte dos microrganismos devido ao tratamento da água, reduzindo desse modo a competição. De acordo com Kazda (1983), o nível de pureza das águas é importante para a proliferação de micobactérias que se multiplicam mal onde há grande número de outros microrganismos. Isso explica o fato de terem sido isoladas somente micobactérias de crescimento lento (*M.lentiflavum* e *M. gordonae*) nas amostras de água menos sujas e menos contaminadas com outros microrganismos provenientes dos pontos de colheita 1,2,3,4 e 5, como visto na Tabela 10. Esses resultados foram semelhantes ao de Leite et al. (1989), que das 36,7% de micobactérias de crescimento lento, 23,9% foram isoladas a partir de água tratada.

Nas amostras de águas com maior contaminação por outros microrganismos (pontos de colheita 6 e 7), somente foram identificadas micobactérias de crescimento rápido (*M.phlei* e *M. flavescens*). Nesse tipo de água, micobactérias de crescimento rápido são mais competitivas do que as de crescimento lento, sendo isoladas em maior número. O número de micobactérias isoladas, tanto nas amostras de águas quanto de biofilmes, pode estar subestimado por causa da perda de tubos por contaminação,

impossibilitando o crescimento dessas bactérias, assim como ocorreu com Kanai, (2006).

A espécie mais isolada foi a micobactéria de crescimento lento *M. gordonae*, que é também conhecida como “escotocromógeno de água de torneira”, por ser muito freqüente em água dos sistemas de abastecimento e distribuição (COLLINS et al., 1984; VAEREWIJCK et al., 2005). Neste trabalho, das 33 micobactérias isoladas, 27 (81,81%) foram identificadas como *M.gordonae*. Outros autores obtiveram resultados semelhantes, tais como Leoni et al. (1999) que, estudando água de piscina, isolaram *M. gordonae* em 73,5% das amostras. Leite et al. (1989) isolaram *M. gordonae* em amostras de água de piscina, torneira, aquários e tanques de piscicultura. No estudo realizado por Santos et al. (2005), dos 90,5% de micobactérias saprófitas isoladas no sistema de distribuição de água em Lisboa, 63,15% foram identificadas como sendo *M. gordonae*. Covert et al. (1999) verificaram que *M. gordonae* foi a única espécie isoladas em amostras de água tratada que apresentam águas subterrâneas como fonte.

Em outro trabalho semelhante, LEE et al. (2008), estudaram a presença de micobactérias ambientais em amostras de águas provenientes de um rio e amostras de água potável na Coréia do Sul. Foram isoladas das águas provenientes das torneiras quatro culturas de *M.lentiflavum* e uma cultura de *M.triplex*, das águas de superfície do rio foram isoladas quatro culturas de *M.gordonae*, três culturas de *M.terrae*, duas culturas de *M. intracellulare*, uma cultura de *M. lentiflavum* e mais outras espécies micobacterianas menos conhecidas. Este estudo confirma os resultados deste trabalho, pois também utilizaram para identificação das micobactérias a técnica do PRA e o seqüenciamento dos fragmentos do gene *hsp65*, além de terem também isolado *M.lentiflavum* e *M. gordonae*.

Das 33 culturas, na análise dos perfis de ácidos micólicos pela técnica da cromatografia em camada delgada, foi possível identificar: 22 (84,6%) isolados com perfil de ácidos micólicos I,II,IV; três (11,5%) isolados com perfil I,IV,VI e um (3,8%) isolado com perfil I,II, IV (Tabela 11). Os resultados dos ácidos micólicos concordaram em 100% com os resultados do seqüenciamento e com 99% dos resultados do PRA, diferindo apenas no isolado 20. Porém, mesmo o isolado número 20 (Tabela 13) onde o PRA indicava *M.triviale*, o perfil dos ácidos micólicos era I,II,VI, indicando o grupo (*M.genavense*, *M. malmoense*, *M.simiae* e *M.lentiflavum*), resultado esse confirmado pelo seqüenciamento como *M.lentiflavum*. Ferdinand et al., (2004) conseguiram também identificar vários isolados micobacterianos através da técnica dos ácidos micólicos e o seqüenciamento dos genes 16S rDNA e *hsp65*. Concluíram que a identificação baseada nos ácidos micólicos ao ser usada em conjunto com novas metodologias moleculares como o PRA e o sequenciamento dos genes 16S rRNA e *hsp65*, pode auxiliar muito a definir a taxonomia de espécies micobacterianas difíceis de identificar.

Em relação às técnicas de identificação, o PRA obteve resultados em 32 isolados (96,96%), a técnica dos ácidos micólicos em 22 isolados (84,61%) de um total de 33 isolados micobacterianos. O seqüenciamento identificou 100%, porém só foi testado em quatro isolados. No trabalho de LEITE et al. (2005), os autores obtiveram diferenças entre os resultados de identificação fenotípica e molecular em 14,4% das cepas. Além disso, a técnica dos ácidos micólicos utilizada por eles conseguiu detectar culturas mistas (mais de uma espécie de micobactéria) em 3 isolados, enquanto pelo PRA não houve essa detecção.

Em experimentos anteriores, Jordão Junior (2004) isolou micobactérias ambientais potencialmente patogênicas em amostras de leite provenientes de búfalos na

mesma propriedade na região de São Carlos estudada neste trabalho. Através do uso das técnicas do PRA e dos ácidos micólicos, as micobactérias encontradas foram *M. simiae*, *M. lentiflavum*, *M. kansasii*, *M. gordonae* e *M. flavescens*. Esses dados de Jordão Junior (2004) correlacionam com o trabalho atual, onde *M. flavescens* foi isolado das águas do rio depois de ponte, recebendo todos os resíduos da propriedade, principalmente os resíduos do curral onde a ordenha acontece todos os dias. O mesmo ocorreu com o *M. lentiflavum*, que foi isolado por Jordão Junior (2004) no leite cru das búfalas e que foi encontrado no presente trabalho em dois isolados de uma mesma torneira (ponto de colheita 4), proveniente de mina 2, sendo uma amostra de um biofilme da torneira e outra de uma amostra simples de água. A água da mina 2 é utilizada tanto para lavar os animais e estábulos quanto para a bebida dos mesmos, sendo uma possível fonte de contaminação dos animais, do leite e até das pessoas que lá trabalham.

Esses dados de Jordão Junior (2004) correlacionam com os resultados do atual estudo, pois duas micobactérias isoladas e identificadas em 2004 em amostras de leite (*M.lentiflavum* e *M.flavescens*) também foram encontradas agora em amostras de água da mesma propriedade. Isso reforça o fato de que as micobactérias estão no meio ambiente, como por exemplo, águas naturais, caixas d'água, encanamentos, solos, plantas, etc (FALKINHAM, 2002), podendo contaminar animais e alimentos e, posteriormente, os seres humanos.

Portanto, no geral, a grande maioria dos isolados, 30 (90,90%), foram de micobactérias de crescimento lento. Outra possível explicação para esse fato seria que as micobactérias ambientais são habitantes normais de uma grande variedade de ambientes que são seus habitats, por exemplo, águas naturais e águas tratadas, solos, aerossóis, protozoários, animais e humanos. Além do que as micobactérias ambientais possuem uma extraordinária resistência, podendo persistir em encanamentos mesmo

com baixíssimos níveis de nutrientes. (SENNA et al., 2008). Devido a isso, existe uma necessidade contínua em desenvolver novas técnicas de diagnóstico mais simples, rápidas e não tão caras. A seqüência completa do genoma de algumas espécies micobacterianas incrementou o desenvolvimento nessa área (ARNOLD, 2007).

Em relação à metodologia de seqüenciamento estudou-se a filogenia de um grupo de micobactérias usando dois genes 16S rRNA (564 bp), *hsp65* (441 bp) e a concatenação de ambos os genes. Esses genes foram usados como marcadores moleculares e assim utilizados na identificação de micobactérias.

Na análise de similaridade, o sequenciamento mostrou que o gene *hsp65* (98% de similaridade) é mais eficaz que o 16S rRNA (97,3% de similaridade) Esses dados são semelhantes aos encontrados por Ferdinand et al, (2004) onde a maior parte de seus isolados tiveram porcentagens de similaridades entre 95 e 99% usando também os genes *hsp65* e 16S rRNA.

A baixa porcentagem de similaridade no gene 16S rRNA, foi devido ao fato de que o sequenciamento da cepa 20 pelo gene 16S rRNA ter apresentado muitas falhas. Isso pode ser visto na árvore filogenética do gene 16S rRNA (figura 19), onde não se pode identificar a cepa 20 e também na tabela 9 onde essa amostra apresentou 91% de similaridade quando comparada com a cepa de *M. lentiflavum* do Genbank. Somente no gene *hsp65* (tabela 12), onde o sequenciamento de todas as amostras foi perfeito, o isolado 20 é identificado com sendo provavelmente *M. lentiflavum* com 98% de similaridade. Drancourt et al. (2000) sugerem que uma porcentagem de similaridade $\geq 99\%$ entre dois isolados pode definir espécies semelhantes ao se fazer a análise de similaridade comparando os dados obtidos no sequenciamento com a base de dados da internet(Genbank) pela ferramenta BLAST.

É de fundamental importância reconhecer que as árvores filogenéticas obtidas são hipótéticas. Deve-se, portanto testar a estabilidade e a confiança dos dados. Existem alguns métodos que permitem saber se os dados são bem estruturados ou se contém um bom sinal filogenético. Um dos métodos mais utilizados é o do *bootstrap* (VIANEZ JÚNIOR, 2005). Analisando-se as árvores filogenéticas pelos valores de *bootstrapps*, pode-se fazer uma comparação simples onde a árvore com as sequências do gene 16S rRNA (figura 18) possui 8 valores de *bootstrap* acima de 90%, valor considerado como significativo por Adekambi e Dracourt,(2004). A árvore com as sequências do gene *hsp65* (figura 19) possui 19 valores e árvore com a concatenação de ambos os genes (figura 20) possui oito valores. Portanto, a árvore da figura 19 pode ser considerada mais robusta e com dados mais confiáveis por possuir mais dados com altos (acima de 90%) valores de *bootstrap*. Nossos dados não estão de acordo com os de DEVULDER et al, (2005), onde afirmam que a concatenação de dois ou mais genes aumenta o poder discriminatório do método eliminando possíveis falhas quando se constrói uma árvore filogenética utilizando apenas um único gene.

Os valores de *bootstrap* indicam uma frequência de aparecimento de uma relação filogenética na árvore. Por exemplo, na figura19 no nó onde se encontram os isolados 18, 24 e 25 está o valor de *bootstrap* de 99% quando comparadas essas amostras com a cepa padrão *M.gordonae*, utilizada também na construção da árvore. Isso quer dizer que de 100 árvores que o software MEGA criou essa relação entre os isolados e a cepa *M. gordonae* apareceu em 99 árvores. Isso demonstra um alto grau de parentesco entre os isolados 18, 24 e 25 com a cepa padrão *M.gordonae*. No caso da análise de *bootstrap* somente nós que ocorrem mais do que em 90% dos casos são confiáveis (EFRON e HALLORAN, 1996).

É importante ressaltar que não existe uma única metodologia que se aplique a todos os estudos filogenéticos realizados com dados moleculares. Embora existam inúmeros algoritmos, procedimentos e softwares desenvolvidos para este tipo de análise, sua confiabilidade e praticidade são em todos os casos dependentes do tamanho e da estrutura dos dados analisados. As vantagens e desvantagens destes métodos estão sujeitas a debates científicos, devido ao fato de que o perigo de gerar resultados incorretos é maior na filogenia molecular computacional do que em muitos outros campos da ciência. Por vezes, o fator limitante neste tipo de análise não é o poder computacional, mas sim o entendimento que o pesquisador tem do que método computacional utilizado está fazendo com os seus dados (VIANEZ JÚNIOR, 2005).

A utilização desses marcadores moleculares como forma de identificação mais eficaz é comprovada por outros autores (FERDINAND et al., 2004; DEVULDER et al., 2005, LEO et al., 2004; GOMILA et al., 2007) e podem ser utilizados em casos onde tanto a identificação por métodos bioquímicos, métodos dos ácidos micólicos e até do PRA são inconclusivos. Assim como pode ser visto na Tabela 13, onde a cepa 20 foi identificada como sendo mais provavelmente *M.triviale* pelo PRA, somente após o sequenciamento foi possível chegar ao *M.lentiflavum*, confirmado pelos dados dos ácidos micólicos (perfil I,II,IV). Esse dados estão de acordo com LEE et al. (2008), que afirmam que a aplicação combinada do PRA com sequenciamento fornece resultados mais precisos e confiáveis que a técnica do PRA sozinha na identificação de micobactérias ambientais, principalmente provenientes de amostras de águas.

O uso de técnicas moleculares, particularmente análise das sequências do gene 16S rRNA, modificou profundamente as abordagens taxonômicas. Hoje em dia, mesmo essa metodologia mostrou-se limitada devido ao baixo polimorfismo do gene 16S rRNA. Devido a isso vários autores têm proposto novas alternativas, como por exemplo,

Devulder et al. (2005) que desenvolveram uma base de dados multigenes incorporando quatro genes (*16S rRNA*, *hsp65*, *rpoB*, *sod*) dentro do gênero *Mycobacterium*. O uso sequencial ou combinado de vários genes claramente levará ao refinamento dos métodos filogenéticos, fornecendo um entendimento melhor da complexidade evolutiva dentro dos grupos bacterianos no sentido de identificar e caracterizar novas espécies.

O advento da tecnologia do sequenciamento tem permitido a redefinição das espécies já existentes. Entretanto, uma das limitações do sequenciamento é que grande número de espécies ainda não são identificadas fazendo com que algumas cepas dessas espécies possam ser mal classificadas. O sequenciamento do gene *hsp65* atualmente tem uma pequena base de dados permitindo somente a identificação correta de espécies bem definidas e estudadas. O sequenciamento do gene 16S rDNA atualmente é considerado o mais preciso e confiável. Sendo assim, o isolamento e a caracterização de micobactérias provenientes do meio ambiente podem levar a identificação de patógenos que podem se disseminar no futuro devido ao aumento das imigrações humanas, viagens, mudanças climáticas e ecológicas no nosso mundo moderno (FERDINAND et al., 2004).

Neste trabalho observou-se a necessidade da utilização de mais de um procedimento de identificação de micobactérias, pois nenhum método chega a 100% de identificação. Outros trabalhos como o de HÄFNER et al. (2004) mostram a necessidade da combinação de diferentes métodos para resultados mais acurados na identificação de micobactérias. Notou-se também que a água utilizada nessa propriedade leiteira pode ser veículo de microrganismos patogênicos (micobactérias, *E.coli* e *S.aureus*) para o leite e para a glândula mamária dos animais. Sendo assim, existe a necessidade da desinfecção e controle da qualidade da água utilizada na propriedade com o objetivo de minimizar os riscos à saúde humana e animal.

7. CONCLUSÕES.

- As águas provenientes da Mina 2, onde se isolou *M.gordonae* e *M.lentiflavum*, podem ser consideradas uma potencial fonte de contaminação de animais, do leite e funcionários da fazenda.
- No presente trabalho não foi verificada relação entre as populações de microrganismos heterotróficos, coliformes totais, fecais e o isolamento de micobactérias, mostrando que os parâmetros tradicionais de qualidade da água não poderiam ser usados como indicadores para a presença de micobactérias na água.
- *M.gordonae* e *M. lentiflavum* podem ser encontradas tanto na forma livre dispersas em água como aderidos formando biofilmes.
- *M.flavescens* e *M. phlei* por serem micobactérias de crescimento rápido podem estar presentes em água densamente contaminada com outros microrganismos.
- A aplicação combinada do PRA e sequenciamento fornece resultados mais precisos e confiáveis que a técnica do PRA sozinha na identificação de micobactérias ambientais.
- A técnica dos ácidos micólicos fornece resultados muito precisos na identificação micobacteriana, com resultados equivalentes ao sequenciamento.
- O uso dos genes do 16S rRNA e *hsp65* como marcadores moleculares pode ser uma ferramenta poderosa para a identificação mais precisa de bactérias do gênero *Mycobacterium*, principalmente quando outros métodos convencionais não são tão eficazes.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Mediante todas essas conclusões, torna-se necessário o questionamento sobre a presença de micobactérias ambientais em alimentos e na água.

Uma medida preventiva seria o tratamento das águas das propriedades rurais produtoras de laticínios para evitar a contaminação dos alimentos produzidos. Uma vez que as micobactérias são altamente resistentes à cloração, deve-se ressaltar a importância da pasteurização do leite produzido para que tanto o leite como seus subprodutos não contenham micobactérias. Através dessa ação, a infecção de seres humanos seria impedida, evitando um grande risco à Saúde Pública.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

3M.3M™ PETRIFILM™ PLATE. Disponível em : http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Microbiology/FoodSafety/products/petri-film-plates/ Acesso: 16 mar de 2007.

ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.I. Relatedness of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk and human handlers in dairy farms in Trinidad. **J. Vet. Med.**, v.44, n.9, p.551-556, 1997

AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C.E.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, n.12, p.:3845-3849, 2007.

ALTARE, F.; DURANDY, A.; LAMMAS, D. et al. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. **Science**, v. 280, p.1432-1438, 1998.

AMARAL, L.A.; ROMANO, A.P. M.; NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.71, n.4, p.417-421, 2004.

AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; NADER FILHO, A. Qualidade higiênico-sanitária da água utilizada na indústria de alimentos de origem animal. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v. 14, n. 76, p. 73-76, 2000.

ANDERSEN, A.A. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. **J. Bacteriol.**, v.76, p.471-484, 1958.

ANDERSSON, M.A.; NIKULIN, M.; KÖLJALG, U. et al. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, n.2, p.387-393, 1997.

AOAC INTERNATIONAL, 2007. Disponível em : <http://www.aoac.org/> Acesso: 18 mar de 2007.

ARNOLD, C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.13, n.2, p.120-128, 2007.

BAUDISOVA, D. Evaluation of *E. coli* as the main indicator of faecal pollution. **Water Sci. Technol.**, v.35, n.11, p.333-336, 1997.

BELOTI, V.; SOUZA, J.A.; BARROS, M.A.F. et al. Evaluation of petrifilm™ EC and HS for total coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water. **Braz. J. of Microbiol.**, v.34, p.301-304, 2003.

BENNETT, S.N.; PETERSON, D.E.; JOHNSON, D.R. et al. Bronchoscopy-associated *Mycobacterium xenopi* pseudoinfections. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.150, p.245-250, 1994.

BERGMAN, R; HOLMBERG, O. Occurrence and characterization of “*avium*-like” mycobacteria isolated from animals in Sweden. **Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B.**, v.87, p.363-367, 1979.

BLACKBURN, C. W.; BAYLIS, C. L.; PETITT, S. B. Evaluation of PetrifilmR methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in a wide range of foods. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 22, p. 137-140, 1996.

BLAST. **Basic Local Alignment Search Tool**. 2008. Disponível em:<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> acesso:19 nov 2008.

BEST, M.; SATTAR, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S. et al. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, n.10, p.2234-2239, 1990.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Portaria nº 518, de 25 de março de 2004**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/> Acesso: 25 de ago. de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília, 2008.436p.

BRASIL. RIISPOA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. Disponível

em:http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,959510&_dad=portal&_schema=PORTAL Acesso: 25 de ago. de 2008.

BRASIL.CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/> Acesso: 25 de ago. de 2008.

BROOKS, R.W.; GEORGE, K.L.; PARKER, B.C. et al. Recovery and survival of nontuberculous mycobacteria under various growth and decontamination conditions. **Can. J. Microbiol.**, v.30, p.1112-1117, 1984.

BRUNELLO F, LIGOZZI M, CRISTELLI E. et al. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n. 8, p. 2799-2806, 2001.

BUEHRING, G.C.; PAN, C-Y.; VALESCO, M. Cell culture contamination by mycobacteria. **In Vitro Cell Dev. Biol. Animal**, v.31, p.735-737, 1995.

BURNS, D.N.; WALLACE RJ, J.R.; SCHULTZ, M.E. et al. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.144, p.1153-1159, 1991.

CAI, S.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. et al. Rational Design of DNA Sequence-Based Strategies for Subtyping *Listeria monocytogenes*. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n. 9, p. 3319-3325, 2002.

CARSON, L.A.; BLAND, L.A.; CUSICK, L.B. et al. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.54, n.12, p.3122-3125, 1988.

CERQUEIRA, M.M.O.P. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas Frescal em Pará de Minas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.46, n.6, p.723-728, 1994.

CHAGAS, S.D.; IARIA, S.T.; CARVALHO, J.P.P. Bactérias indicadoras de poluição fecal em águas de irrigação de hortas que abastecem o município de Natal – Estado do Rio Grande do Norte (Brasil). **Rev. Saúde Pública.**, v.15, p. 629-642, 1981.

CHAPMAN, J.S.; BERNARD, J.S.; SPEIGHT, M. Isolation of mycobacteria from raw milk. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.91, p.351-355, 1965.

CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; UEKY, S.Y. et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. **BMC Microbiol.**, v.8, n.48, p.1-12, 2008.

CLARK, H.F.; SHEPARD, C.C. Effect of environmental temperatures on infection with *Mycobacterium marinum* (*balnei*) of mice and a number of poikilothermic species. **J. Bacteriol.**, v.86, p.1057-1069, 1963.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Mycobacteria in water. **J. Appl. Bacteriol.**, v.57, p.193-211, 1984.

CONSOLI, M.A.F.; BRAGA, M.J.S.; FREITAS, S.L. et al. Estudo introdutório sobre o uso de petrifilm como meio base para a utilização de membrana filtrante na análise de água. **Analytica**, v.25, p.70-75, 2006.

COOPE, D.; VON GRAEVENITZ, A.; CORRALES, J. ET AL. Tissue culture contamination with nontuberculous mycobacteria. **Microbiol. Immunol.**, v.27, n.1, p.113-115, 1983.

COSTALLAT, L.F.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; RODRIGUES, A.C. Et al. Examination of soils in the Campinas rural area for microorganisms of the *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex. **Aus. Vet. J.**, v.53, p.349-350, 1977.

COSTRINI, A.M.; MAHLER, D.A.; GROSS, W.M. et al. Clinical and roentgenographic features of nosocomial pulmonary disease due to *Mycobacterium xenopi*. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.123, p.104-109, 1981.

COVERT, T.C.; RODGERS, M.R.; REYES, A.L. et al. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, n.6, p.2492-2496, 1999.

CURIALE, M. S.; SONS, T.; MCALLISTER, J. S. Dry rehydratable film for enumeration of total aerobic bacteria in foods: collaborative study. **J. of AOAC**, v. 73, n. 2, p. 242-248, 1990

- DAILLOUX, M.; LAURIAN, C.; WEBER, M.; et al. Water and nontuberculous mycobacteria. **Wat. Res.** v. 33, p.2219-2228, 1998.
- DAILLOUX, M.; HARTEMANN, P.; BEUREY, J. Study on the relationship between isolation of mycobacteria and classical microbiological and chemical indicators of water quality in swimming pools. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B.**, v.171, p.473-486, 1980.
- DAVID, H; V. LEVY-FREBAULT, V.; THOREL, M.F. **Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique** . [éd.] Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur, Paris: Institut Pasteur, 1989, 87p.
- DAWSON, D.J.; ARMSTRONG, J.G.; BLACKLOCK, Z.M. Mycobacterial cross-contamination of bronchoscopy specimens. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.126, p.1095-1097, 1982.
- DAWSON, D.J.; JENNIS, F. Mycobacteria with a growth requirement for ferric ammonium citrate, identified as *Mycobacterium haemophilum*. **J. Clin. Microbiol.**, v.11, n.2, p.190-192, 1980.
- DE BEENHOUWER, H.; LIANG, Z.; DE RIJK, P. et al. Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.11, p.2994-2998, 1995.
- DE KANTOR, I.N. Primary and acquired resistance in tuberculosis. **Medicina**, v.39, n.5, p. 693-694, 1979.
- DEVALLOIS, A.; GOH, K.S.; RASTOGI, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.11, p. 2969-2973, 1997.
- DEVULDER, G.; PÉROUSE DE MONTCLOS, M.; FLANDROIS, J.P. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.55, p. 293-302, 2005.
- DOMINGUES, V. O.; TAVARES, G.D.; STÜKER, F. et al. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias **Saúde**, v.33, n 1: p 15-19, 2007.

DU MOULIN, G.C. ; STOTTMEIER, K.D. ; PELLETIER, P.A. ET AL. Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. **J. Am. Med. Assoc.**, v.260, n.11, p.1599-1601, 1988.

DU MOULIN, G.C.; STOTTMEIER, K.D. Waterborne mycobacteria: an increasing threat to health. **A.S.M. News**, v.52, n.10, p.525-529, 1986.

DUNN, B.L.; HODGSON, D.J. 'Atypical' mycobacteria in milk. **J. Appl. Bacteriol.**, v.52, p.373-376, 1982.

DURBIN, G. W.; SALTER, R. Comparative analysis of a modified ecolite method, the colicomplete method, and a most-probable-number method for detecting *Escherichia coli* in orange juice. **J. Food Prot.**, v. 69, n.1, p.211-213, 2006.

EATON, T.; FALKINHAM, J.O. III.; VON REYN, C.F. Recovery of *Mycobacterium avium* from cigarettes. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.10, p.2757-2758, 1995.

EDWARDS, L.B.; ACQUAVIVA, F.A.; LIEVSAY, V.T. et al. An atlas of sensitivity to tuberculin, PPD-B and histoplasmin in the United States. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.99, p.1-131, 1969.

EFRON, B.; HALLORAN, E. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93, p.7085-7090, 1996.

ENGBAEK, H.C. Three cases in the same family of fatal infection with *M. avium*. **Acta Tuberc. Scand.**, v.45, n.2-3, p.105-117, 1964.

ENGEL, H.W.B.; BERWALD, L.G., HAVELAAR, A.H. The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tapwater. **Tubercle**, v.61, p.21-26, 1980.

FALKINHAM 3rd., J.O. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. **J. Med. Microbiol.**, v.56, p. 250-254, 2007.

FALKINHAM 3rd., J.O. Nontuberculous mycobacteria in the environment. **Clin. Chest. Med.**, v.23, n.3, p. 529-551, 2002.

FALKINHAM 3rd, J.O. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. **Can. J. Infect. Dis.**, v.14, n.5, p.281-286, 2003.

FALKINHAM 3rd, J.O.; GEORGE, K.L.; FORD, M.A. et al. Collection and characteristics of mycobacteria in aerosols. In: Morey, P.R.; Feeley, J.C.; Otten, J.A. (Ed.). **Biological Contaminants in Indoor Environments**, ASTM STP 1071. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1990, p. 71-81.

FALKINHAM 3rd, J.O.; GEORGE, K.L.; PARKER, B.C. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. VIII. Absence of mycobacteria in chicken litter. **Am Rev Respir Dis.**, v.139, p.1347-1349, 1989.

FALKINHAM 3rd, J.O.; GEORGE, K.L.; PARKER, B.C. et al. *In vitro* susceptibility of human and environmental isolates of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum* to heavy-metal salts and oxyanions. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.25, n.1, p.137-139, 1984.

FALKINHAM 3rd, J.O.; NORTON, C.D.; LE CHEVALLIER, M.W. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, n.3, p.1225-1231, 2001.

FALKINHAM 3rd, J.O.; PARKER, B.C.; GRUFT, H. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. I. Geographic distribution in the eastern United States. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.121, p.931-937, 1980.

FERDINAND,S.;LEGRAND, E.; SENG GOH, K. et al.Taxonomic and phylogenetic status of non-tuberculous mycobacteria in a Caribbean setting. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p.399–408, 2004.

FISCHEDE, R.; SCHULZE-RÖBBECKE, R.; WEBER, A. Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. **Zbl. Hyg.**, v.192, p.154-158, 1991.

FODE-WAUGHAN, K.A.; WIMPEE, C.F.; REMSEN, C.C. et al. Detection of bacteria in environmental samples by direct PCR without DNA extraction. **Bio. Techniques**, v.31, p.598-607, 2001.

FROTHINGHAM, R.; WILSON, K.H. Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. **J. Infect. Dis.**, v.169, n.2, p.305-312, 1994.

GEORGE, K.L.; PARKER, B.C.; GRUFT, H. et al. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. II. Growth and survival in natural waters. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.122, p.89-94, 1980.

GLOVER, N.; HOLTZMAN, A.; ARONSON, T. et al. The isolation and identification of *Mycobacterium avium* complex (MAC) recovered from Los Angeles potable water, a possible source of infection in AIDS patients. *Intl. J. Environ. Hlth. Res.*, v.4, p.63-72, 1994.

GOMILA, M.; RAMIREZ, A.; LALUCAT, J. Diversity of environmental Mycobacterium isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.73, n.12, p. 3787-3797, 2007.

GOODFELLOW, M.; MAGEE, J.G. Taxonomy of Mycobacteria. In: GANGADHARAM, P.R.J.; JENKINS, P.A. **Mycobacteria: basic aspects**. New York: Chapman & Hall, 1998. v.1, 1-71p. (Chapman & Hall Medical Microbiology Series).

GOSLEE, S.; WOLINSKY, E. Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v.113, p.287-292, 1976.

GRAHAM JR, L.; WARREN, N.G.; TSANG, A.Y. et al. *Mycobacterium avium* complex pseudobacteriuria from a hospital water supply. *J. Clin. Microbiol.*, v.25, n.5, p.1034-1036, 1988.

GRANUCCI, G.F. **Estudo das micobactérias veiculadas pelas águas da região de Itápolis – SP**. 2001.89f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2001.

GUBLER, J.G.H.; SALFINGER, M.; VON GRAEVENITZ, A. Pseudoepidemic of nontuberculous mycobacteria due to a contaminated bronchoscope cleaning machine. *Chest.*, v.101, p.1245-1249, 1992.

HAAGSMA, J. Bovine tuberculosis. **OIE Manual (Amendment 2)**, 1995, 11 p.

HAFNER, B.; HAAG, H.; GEISS, H.K. et al. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. *Mol. Cell. Probes*, v.18, n.1, p. 59-65, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; LAPPIN-SCOTT, H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. **FEMS. Microbiol. Ltrrs.**, v.168, p.77-84, 1998.

HAVELAAR, A.H.; BERWALD, L.G.; GROOTHUIS, D.G. et al. Mycobacteria in semi-public swimming pools and whirlpools. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B.**, v.180, p.505-514, 1985.

HOLTZMAN, A.E. ARONSON, T.W.; GLOVER, N. et al. Examination of bottled water for nontuberculous mycobacteria. **J. Food Protect.**, v.60, n.2, p.185-187, 1997.

HORSBURGH JR, C.R. Epidemiology of mycobacterial disease in AIDS. **Res. Microbiol.**, v.143, p.372-377, 1992.

HUTTUNEN, K.; RUOTSALAINEN, M.; IIVANAINEN, E. et al. Inflammatory responses in RAW264.7 macrophages caused by mycobacteria isolated from moldy houses. **Environ. Tox. Pharm.**, v.8, p.237-244, 2000.

ICHIYAMA, S.; SHIMOKATA, K.; TSUKAMURA, M. The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water, and dusts. **Microbiol. Immunol.**, v.32, n.7, p.733-739, 1988.

IIVANAINEN, E.; MARTIKAINEN, P.J.; VÄÄNÄNEN, P.K. et al. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, n.2, p.398-404, 1993.

IIVANAINEN, E.; MARTIKAINEN, P.J.; VÄÄNÄNEN, P.K. et al. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. **J. Appl. Microbiol.**, v.86, p.673-681, 1999.

ISEMAN, M.D; BUSCHMAN, D.L.; ACKERSON, L.M. Pectus excavatum and scoliosis. Thoracic abnormalities associated with pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium* complex. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.144, p.914-916, 1991.

JENKINS, P.A. Mycobacteria in the environment. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.**, v.70, p.1375-1415, 1991.

JONES, R.J.; JENKINS, D.E. Mycobacteria isolated from soil. **Can. J. Microbiol.**, v.11, n.2, p.127-133, 1965.

JORDÃO JUNIOR, C. M. **Pesquisa de micobactérias no leite de bubalinos**.2004. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2004.

JOUANGUY, E.; ALTARE, F.; LAMHAMEDI, S. et al. Interferon- γ -receptor deficiency in an infant with fatal Bacille Calmette-Guérin infection. **N. Engl. J. Med.**, v.335, n.26, p.1956-1961, 1996.

KAMALA, T.; PARAMASIVAN, C.N.; HERBERT, D. et al. Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, n.3, p.1021-1024, 1994.

KANAI, K.Y. **Detecção e identificação de micobactérias em corpos de água destinados à captação para abastecimento urbano da cidade de São Carlos – SP**. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

KATILA, M-L.; MATTILA, J.; BRANDER, E. Enhancement of growth of *Mycobacterium malmoense* by acidic pH and pyruvate. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.8, p.996-1000, 1989.

KAZDA, J.F. The principles of the ecology of mycobacteria. In: Ratledge, C.; Stanford, J. **The biology of mycobacteria**. London: Academic Press, 1983. v.2, 323-341p.

KAZDA, J. Verhehrung von mykobakterien in der grauen schicht der *Sphagnum*-vegetation. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B.**, v.166, p.463-469, 1978.

KAZDA, J.; MÜLLER, K.; IRGENS, L.M. Cultivable mycobacteria in *Sphagnum* vegetation of moors in south Sweden and coastal Norway. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B.*, 87:97-101, 1979.

KENNEDY, T.P.; WEBER, D.J. Nontuberculous mycobacteria. An underappreciated cause of geriatric lung disease. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v.149, p.1654-1658, 1994.

KIRSCHNER JR, R.A.; PARKER, B.C.; FALKINHAM, J.O. III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. X. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.145, p.271-275, 1992.

KONUK. M.; KORKAN, E.; DUGERBAKI, S. et al. Isolation and identification of Mycobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. **International J. of Food Microbiol.**, v.115, p. 343–347, 2007.

KRAVITZ, J.D.; NYAPHISI, M.; MENDEL, R.; et al. Quantitative bacterial examination of domestic water supplies in the Lesotho Highlands: water quality, sanitation and village health. **Bull. World Health Organ.**, v.77, n.10, p.829-836, 1999.

KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. **Bull. WHO**. V. 51, p. 71-82, 1974.

KUMAR, S.; NEI, M.; DUDLEY, J. et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Brief. Bioinform.**, 2008. (No prelo).

KURITSKY, J.N.; BULLEN, M.G.; BROOME, C.V. et al. Sternal wound infections and endocarditis due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex. **Ann. Intern. Med.**, v.98, p.938-939, 1983.

KUSUNOKI, S.; EZAKI, T.; TAMESADA, M. Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, n.8, p.1596-1603, 1991.

LAMBRECHT, R.S.; COLLINS, M.T. *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin dependence. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.15, p.239-246, 1992.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, N.P.; BROWN, R. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n.21, p.2947-2948, 2007.

LEAO, S.C., MARTIN, A., MEJIA, G.I., et al. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Brugges: Vanden BROELLE, 2004, 147p. Disponível em: <<http://www.esmycobacteriology.eu/genoid.htm>>. Acesso em: 30 de jul. de 2008.

LEBRUN L, WEILL FX, LAFENDI L. Et al. Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.6, p.2567-2574, 2005.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 28, n. 4, p. 371-409, 2002.

LEE, E.S.; LEE, M.Y.; HAN, S.H.; KA, J.O. Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface waters. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, n.7, p. 1207-1215, 2008.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A. et al. Isolation and Identification of Mycobacteria from Livestock Specimens and Milk Obtained in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p.319-323, 2003.

LEITE, C. Q. F.; BARRETO, A. M. W.; LEITE, S. R. A. Thin-layer chromatography of mycobactins and mycolic acids for the identification of clinical mycobacteria. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 192-199, 1995.

LEITE, C.Q.; DE SOUZA, C.W.; LEITE, S.R. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.93, n. 6, p. 801-805, 1998.

LEITE, C.Q.F. **Estudo epidemiológico das micobactérias das águas de algumas regiões do Estado de São Paulo.** Araraquara, 1991. 106f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

LEITE, C.Q.F.; FERRACINI JR., R.; FALCÃO, D. P. et al. Prevalência e distribuição de micobactérias nas águas de algumas regiões do Estado de São Paulo. **Rev. Microbiol.**, v. 20, p.432-441, 1989.

LEITE, C. Q. F.; GIANNINI, M. J. S. M.; FALCAO, D. P.; et al. Presence of *Mycobacterium marinum* and other oportunist mycobacteria in swimming pool waters in Araraquara, Sp. **Rev. Microbiol.**, Brasil, v. 19, n. 41, p. 354-359, 1988.

LEITE, C. Q. F. ; ROCHA, A. S.; LEITE, S. R. A.. A comparison of Mycolic Acids Analysis for Nontuberculous Mycobacteria Identification by Thin Layer

Chromatography and Molecular Methods. **Microbiol. Immunol.**, Japão, v. 49, n. 7, p. 571-578, 2005.

LEONI, E.; LEGNANI, P.; MUCCI, M.T. et al. Prevalence of mycobacteria in swimming pool environment. **J. Appl. Microbiol.**, v.87, p.683-688, 1999.

LEVIN, M.; NEWPORT, M.J.; D'SOUZA, S. et al. Familial disseminated atypical mycobacterial infection in childhood: a human mycobacterial susceptibility gene? **Lancet**, v.345, p.79-83, 1995.

LEVY-FREBAULT, V.; DAVID, H.L. *Mycobacterium kansasii*: contaminant du réseau d'eau potable d'un hôpital. **Rev. Epidém. Santé Publ.**, v.31, p.11-20, 1983.

LEWIS, D.J.; ATWILL, E. R.; LENNOX, M. S.; HOU, L.; KARLE, B.; TATE, K. W. Linking on-farm dairy management practices to storm-flow fecal coliform loading for California coastal watersheds. **Environ Monit Assess.** , v. 107, n. 1-3, p. 407-425, 2005.

MAIER, T.; DESMOND, E.; MCCALLUM, J. Isolation of *Mycobacterium genavense* from AIDS patients and cultivation of the organism on Middlebrook 7H10 agar supplemented with human blood. **Med. Microbiol. Lett.**, v.4, p.173-179, 1995.

MANSFIELD, K.G.; LACKNER, A.A. Simian immunodeficiency virus-inoculated macaques acquire *Mycobacterium avium* from potable water during AIDS. **J. Infect. Dis.**, v.175, p.184-187, 1997.

MARTIN, A.; UWIZEYE, C.; FISSETTE, K. et al. Application of the *hsp65* PRA method for the rapid identification of mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium. **J. Microbiol. Methods.**, v. 71, n.1, p. 39-43, 2007.

MARTIN, E.C.; PARKER, B.C.; FALKINHAM, J.O. III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria VII. Absence of mycobacteria in southeastern groundwaters. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.136, p.344-348, 1987.

MCSWIGGAN, D.A.; COLLINS, C.H. The isolation of *M. kansasii* and *M. xenopi* from water systems. **Tubercle**, v.55, p.291-297, 1974.

MELCHÍADES, L.E.A.; VEIGA, V.M.O.; RIBEIRO, M.T. et al. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica bovina. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v.48, n.288, p.80-81, 1993.

MILLAR, D.; FORD, J.; SANDERSON, J. et al. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, n.9, p.3446-3452, 1996.

MIYAMOTO, M.; YAMAGUCHI, Y.; SASATSU, M. Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of *Legionella* and nontuberculous mycobacteria. **Microbiol.**, v.101, p.7-13, 2000.

MONTECALVO, M.A.; FORESTER, G.; TSANG, A.Y.; et al. Colonisation of potable water with *Mycobacterium avium* complex in homes of HIV-infected patients. **Lancet**, v.343, p.1639, 1994.

NASCIMENTO, M. C. P.; GONTIJO FILHO, P. P. Ocorrência de micobacterias atípicas em ambientes aquáticos. **Jornal de Pneumologia**, v.17, p.166-168, 1991.

NEUMANN, M.; SCHULZE-RÖBBECKE, R.; HAGENAU, C.; BEHRINGER, K. Comparison of method for isolation of mycobacteria from water. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p.547-552, 1997.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> acesso:19 nov 2008.

NORBY, B.; FOSGATE, G.T.; MANNING, E.J. et al. Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. **Vet. Microbiol.**, v.124, p. 153-159, 2007.

OLLAR, R.A.; DALE, J.W.; FELDER, M.S. et al. The use of paraffin wax metabolism in the speciation of *Mycobacterium avium-intracellulare*. **Tubercle**, v.71, p.23-28, 1990.

OTTENHOFF, T.H.M.; KUMARARATNE, D.; CASANOVA, J-L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Trends Immunol.**, v.19, n.11, p.491-494, 1998.

PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007**: From basic science to patient care. TuberculosisTextbook.com, 2007. 686p.

PALOMINO, J.C.; OBIANG, A.M.; REALINI, L. et al. Effect of oxygen on growth of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.11, p.3420-3422, 1998.

PARK, U.K.; BREWER, W.S. The recovery of *Mycobacterium marinum* from swimming pool water and its resistance to chlorine. **J. Environ. Hlth.**, v.38, p.390-392, 1976.

PARKER, B.C.; FORD, M.A.; GRUFT, H. et al. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.126, p.652-656, 1983.

PAULL, A. An environmental study of the opportunist mycobacteria. **Med. Lab. Technol.**, v.30, p.11-19, 1973.

PEDLEY, S.; BARTRAM, J.; REES, G.; et al. **Pathogenic Mycobacteria in Water.** Cornwall : World Health Organization (WHO), 2004. 227p.

PELCZAR, J.R.M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceito e aplicações.** São Paulo-SP: McGraw-Hill, v.2, 1997. Cap. 30, p. 371-397.

PETERS, M.; MÜLLER, C.; RÜSCH-GERDES, S.; SEIDEL, C. et al. Isolation of atypical mycobacteria from tap water in hospitals and homes: is this a possible source of disseminated MAC infection in AIDs patients? **J. Infect.**, v.31, p.39-44, 1995.

PICOLI, S.U.; BESSA, M.C.; CASTAGNA, S.M.F. et al. Quantificação de coliformes, *S.aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.1, p. 64-69, 2006.

PRASITE. Identification of Mycobacteria. **Hospices cantonaux.** 2007. Disponível em : <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> acesso em: 11 out. 2008.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM, J.O.III. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 1, p. 98-106, 2004.

PRINCE, K.A.; COSTA, A.R.; MALASPINA, A.C. et al. Isolation of *Mycobacterium gordonae* from poultry slaughterhouse water in São Paulo State, Brazil. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.37, n.2, p.106-108, 2005.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988. **J. Comp. Pathol.**, Edinburg, v.99, p.357-399, 1988.

RASTOGI, N. An introduction to bacterial taxonomy, structure, drug resistance, and pathogenesis. In *Textbook-atlas of intestinal infections in AIDS* Edited by: Dionisio D. Milano, Italia , Springer-Verlag; 2003:89-115.

REALINI, L.; DE RIDDER, K.; PALOMINO, J-C. et al. Microaerophilic conditions promote growth of *Mycobacterium genavense*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.9, p.2565-2570, 1998.

REICH, J.M.; JOHNSON, R.E. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. Incidence, presentation, and response to therapy in a community setting. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.143, p.1381-1385, 1991.

REZNIKOW, M.; DAWSON, D.J. Mycobacteria of the *intracellulare-scrofulaceum* group in soils from the Adelaide area. **Pathol.**, v.12, p.525-528, 1980.

REZNIKOV, M.; LEGGO, J.H. Examination of soil in the Brisbane area for organisms of the *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex. **Pathol.**, v.6, p.269-273, 1974.

REZNIKOV, M.; LEGGO, J.H.; DAWSON, D.J. Investigation by seroagglutination of strains of the *Mycobacterium intracellulare – M. scrofulaceum* group from house dusts and sputum in southeastern Queensland. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.104, p.951-953, 1971.

RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S.; HILLEMANN, D. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for identification of mycobacterial species from cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, n.5, p.1769-1775, 2006.

RIDGWAY, H.F.; RIGBY, M.G.; ARGO, D.G. Adhesion of a Mycobacterium sp. to cellulose diacetate membranes used in reverse osmosis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.47, n.1, p.61-67, 1984.

RINGUET, H.; AKOUA-KOFFI, C.; HONORE, S. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p. 852–857, 1999.

- ROBERTS, B.; HIRST, R. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Mycobacterium ulcerans*. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.10, p.2709-2711, 1997.
- ROCHA, A. S.; BARRETO, A.M.W.; CAMPOS C.E.D. et al. Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of hsp65. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.11, p. 4191-4196, 2002.
- RODGERS, M.R.; BLACKSTONE, B.J.; REYES, A.L. et al. Colonisation of point of use water filters by silver resistant non-tuberculous mycobacteria. **J. Clin. Pathol.**, v.52, p.629-632, 1999.
- ROGALL, T.; FLOHR, T.; BÖTTGER, E.C. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. **J. Gen. Microbiol.**, v.136, n.9, p. 1915-1920, 1990.
- ROLIM, H. M. V.; RABELO, M.; PEREIRA, A. S. Uso de placas PetrifilmR na avaliação microbiológica de corantes e/ ou condimentos alimentares. **V CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS. VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS**, Águas de Lindóia, SP, 22-26 de Novembro de 1998.
- ROSE, C.S.; MARTYNY, J.W.; NEWMAN, L.S. et al. “Lifeguard Lung”: endemic granulomatous pneumonitis in an indoor swimming pool. **Am. J. Publ. Hlth.**, v.88, n.12, p.1795-1800, 1998.
- ROSS, B.C.; JOHNSON, P.D.R.; OPPEDISANO, F. et al. Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, n.10, p.4135-4138, 1997.
- ROTH, A.; FISCHER, M.; HAMID, M.E. et al. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.1, p.139-147, 1998.
- RUIZ PEREZ, A.; MEDEROS CUERVO, L. M.. Mycobacteriosis caused by *Mycobacterium gordonae*. First case reported in Cuba. **Rev. Cubana Med.Trop.**, v.51, p.128-129, 1999.
- RUTALA, W.A.; COLE, E.C.; WANNAMAKER, N.S. et al. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by 14 hospital disinfectants. **Am. J. Med.**, v.91, n.3B, p.267S-271S, 1991.

SABATER, J.F.; ZARAGOZA, J.M. A simple identification system for slowly growing mycobacteria. II. Identification of 25 strains isolated from surface water in Valencia (Spain). **Acta Microbiol. Hungar.**, v.40, n.4, p.343-349, 1993.

SAGARDOY, A.; CITTÁ, S. Occurrence, characteristics and multiplication of rapid grower mycobacteria in presence of legume root-nodule bacteria. **Rev. Lat-amer. Microbiol.**, v.27, p.97-104, 1985.

SAITO, H, TSUKAMURA, M. *Mycobacterium intracellulare* from public bath water. **Japan J. Microbiol.**, v.20, n.6, p.561-563, 1976.

SAITO, H.; TOMIOKA, H.; SATO, K. et al. *Mycobacterium malmoense* isolated from soil. **Microbiol. Immunol.**, v.38, n.4, p.313-315, 1994.

SANTANA, A.S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D.R.P. Comparação entre os métodos rápidos simplater TPC- CI e Petrifilmr AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, n.1, p. 60-64, 2002.

SANTOS, R.; OLIVEIRA, F.; FERNANDES, J.; et al. Detection and identification of mycobacteria in Lisbon water distribution systems. **Water Science & Technology**. 52:177-180, 2005.

SCARLATA, G.; PELLERITO, A.M.; DI BENEDETTO, M. et al. Isolation of mycobacteria from drinking water in Palermo. **Boll. Ist. Sieroter. Milan.**, v.64, n.6, p.479-482, 1985.

SCHAEFER, W.B.; BEER, J.V.; WOOD, N.A. et al. A bacteriologic study of endemic tuberculosis in birds. **J. Hyg. Camb.**, v.71, p.549-557, 1973.

SCHELONKA, R.L.; ASCHER, D.P.; MCMAHON, D.P. et al. Catheter-related sepsis caused by *Mycobacterium avium* complex. **Ped. Infect. Dis. J.**, v.13, n.3, p.236-238, 1994.

SCHLOSSBERG, D. **Tuberculosis & Nontuberculous Mycobacterial Infections**. 5 ed. New York: McGraw-Hill Professional, 2006. 525p.

SCHULZE-ROBBECKE, R. Mycobacteria in the environment. **Immun. Infekt.**, v.21, n.5, p. 126-131, 1993.

SCHULZE-RÖBBECKE, R.; FISCHEDER, R. Mycobacteria in biofilms. **Zbl. Hyg.**, v.188, p.385-390, 1989.

SHELTON, B.G.; FLANDERS, W.D.; MORRIS, G.K. *Mycobacterium* sp. as a possible cause of hypersensitivity pneumonitis in machine workers. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5, n.2, p.270-273, 1999.

SHIMIZU, M. T.; SILVA, E. A. M.; JORGE, A. O. C. et al. 1986/1987. Micobactérias isoladas de urinas de pacientes com suspeita de tuberculose urinária. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 8/9, p.167-171, 1986/1987.

SHINNICK, T. M. The 65-kilodalton of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.**, v.169, p.1080–1088, 1987.

SILVA ROCHA, A. C.; COSTA LEITE, H. M.; TORRES, A. B. et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. **J. Microbiol. Methods**, v.37, p.223-229, 1999.

SILVA, N. da; CANTUSIO NETO, R.; JUNQUEIRA, V.C.A. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. Campinas: ITAL, 2000. 99p.

SIMPSON, G.L.; RAFFIN, T.A.; REMINGTON, J.S. Association of prior nocardiosis and subsequent occurrence of nontuberculous mycobacteriosis in a defined, immunosuppressed population. **J. Infect. Dis.**, v.146, n.2, p.211-219, 1982.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília, DF: Embrapa, p.73-84, 1995.

SLOSÁREK, M.; KUBÍN, M.; JAREŠOVÁ, M. Water-borne household infections due to *Mycobacterium xenopi*. **Centr. Eur. J. Publ. Hlth.**, v.1, n.2, p.78-80, 1993.

SNIADACK, D.H.; OSTROFF, S.M.; KARLIX, M.A. et al. A nosocomial pseudo-outbreak of *Mycobacterium xenopi* due to a contaminated potable water supply: lessons in prevention. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v.14, n.11, p.636-641, 1993.

- SOINI, H.; SKURNIK, M.; LIIPPO, K. et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.8, p.2025-2028, 1992.
- SONGER, J.G. Methods for selective isolation of mycobacteria from the environment. **Can. J. Microbiol.**, v.27, p.1-7, 1981.
- SPRINGER B, WU W-K, BODMER T. Et al. Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.5, p.1100-1107, 1996.
- STEED, K.A.; FALKINHAM, J.O. 3RD. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. **Appl Environ Microbiol.**, v.72, n.6, p.4007-4011, 2006.
- STINE, T.M.; HARRIS, A.A.; LEVIN, S. et al. A pseudoepidemic due to atypical mycobacteria in a hospital water supply. **J. Am. Med. Assoc.**, v.258, n.6, p.809-811, 1987.
- STINEAR, T. ROSS, B.C.; DAVIES, J.K. et al. Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.4, p.1018-1023, 1999.
- STORMER, R.S.; FALKINHAM, J.O. 3RD. Differences in antimicrobial susceptibility of pigmented and unpigmented colonial variants of *Mycobacterium avium*. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, n.11, p.:2459-2465, 1989.
- SUZUKI, M.T.; BÉJÀ, O.; TAYLOR, L.T.; et al. Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. **Environ .Microbiol.**, v.3, n.5, p.323-331, 2001.
- SZEWZYK, U.; SZEWZYK, R.; MANZ, W. et al. Microbiological safety of drinking water. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.54, p.81-127, 2000.
- TABER, R.A.; THIELEN, M.A.; FALKINHAM, J.O. III. et al. *Mycobacterium scrofulaceum*: a bacterial contaminat in plant tissue culture. **Plant. Sci.**, v.78, p.231-236, 1991.

TACQUET, A. ; TISON, F.; EEVULDER, B. et al. La recherche de mycobacteries dan les boues de centrifugation industrielle du lait de vache. **Ann. Inst. Past. Lille**, v.17, p.173-179, 1966.

TAKEWAKI, S-I.; OKUZUMI, K.; MANABE, I. et al. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphim analysis for identification of mycobacterial species. **Intl. J. System Bacteriol.**, v.44, n.1, p.159-166, 1994.

TAKIGAWA, K.; FUJITA, J.; NEGAYAMA, K. et al. Eradication of contaminating *Mycobacterium chelonae* from bronchofibrescopes and an automated bronchoscope disinfection machine. **Respir. Med.**, v.89, p.423-427, 1995.

TANAKA, I.I.; ANNO, I.S.; LEITE, S.R. et al. Comparison of a multiplex-PCR assay with mycolic acids analysis and conventional methods for the identification of mycobacteria. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, n. 5, p.307-312, 2003.

TAYLOR, R.H.; FALKINHAM, J.O. III.; NORTON, C.D. et al. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.1702-1705, 2000.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.2, p.175-178, 1993.

THOREL, M.F.; MOREAU, R.; CHARVIN, M.; et al. Débusquement enzymatique des mycobactéries dans les milieux naturels. **Comp. Rend. Soc. Biol.**, v.185, p.331-337, 1991.

TIPPMANN, H.F. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis. **Brief. Bioinform.**, v. 5, n.1, p.82-87, 2004.

TISON, F. ; DEVULDER, B. ; TACQUET, A. Recherches sur la présence de mycobactéries dan la nature. **Rev. Tuberc. Pneumol.**, v.32, n.7, p.893-902, 1968.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clin. Microbiol. Rev.**,v. 16, n.2, p.319-354, 2003.

- TORTOLI, E. The new mycobacteria: an update. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 48, p.159–178, 2006.
- TORTORELLO, M. L. Indicator organisms for safety and quality--uses and methods for detection: minireview. **J. AOAC Int.**, v. 86, n. 6, p.1208-1217, 2003.
- TROESCH, A.; NGUYEN, H.; MIYADA, C.G. et al. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.1, p.49-55, 1999.
- TSUKAMURA, M.; MIZUNO, S.; MURATA, H. et al. A comparative study of mycobacteria from patients' room dusts and from sputa of tuberculous patients. **Jap. J. Microbiol.**, v.18, n.4, p.271-277, 1974.
- TUFFLEY, R.E. ; HOLBECHE, J.D. Isolation of the *Mycobacterium avium* – *M. intracellulare* – *M. scrofulaceum* complex from tank water in Queensland, Australia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.39, n.1, p.48-53, 1980.
- UCHIYAMA, N.; GREENE, G.R.; WARREN, B.J. et al. Possible monocyte killing defect in familial atypical mycobacteriosis. **J. Ped.**, v.98, n.5, p.785-788, 1981.
- UEKI, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; TELLES, M. A. S. et al. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.41, n.1, p.1-8, 2005.
- VAEREWIJCK, M.J.M.; HUYS, G.; PALOMINO, J.C. et al. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.29, p.911-934, 2005.
- VIANA, F.C. et al. Qualidade bacteriológica das águas de granjas avícolas do Estado de Minas Gerais: 1973. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, 27:119-24, 1975.
- VIANA-NIERO, C.; LIMA, K.V.; LOPES, M.L. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **J Clin Microbiol.**, v.46, n.3, 850-855, 2008.
- VIANEZ JÚNIOR, J. L.S. G. **Avaliação criteriosa das seqüências dos genes *rrn*, *rpoB* e *gyrB* como ferramentas em taxonomia microbiana. 2005.** 69f. Trabalho de

conclusão de cursos (Bacharel em Microbiologia e Imunologia) -, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes / UFRJ, Rio de Janeiro.2005.

VICTOR, T.C.; JORDAAN, A.M.; VAN SCHALKWYK, E.J. et al. Strain-specific variation in the *dnaJ* gene of mycobacteria. **J. Med. Microbiol.**, v.44, p.332-339, 1996.

VON REYN, C.F.; WADDELL, R.D.; EATON, T. et al. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.12, p.3227-3230, 1993.

WALLACE JR, R.J. Recent changes in taxonomy and disease manifestations of the rapidly growing mycobacteria. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.13, n.11, p.953-960, 1994.

WENDT, S.L.; GEORGE, K.L.; PARKER, B.C. et al. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.122, p.259-263, 1980.

WIJSMULLER, G.; ERICKSON, P. The reaction to PPD-Bathey. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.109, p.29-40, 1974.

WINTER, S.M.; BERNARD, E.M.; GOLD, J.W.M. et al. Humoral response to disseminated infection by *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* in acquired immunodeficiency syndrome and hairy cell leukemia. **J. Infect. Dis.**, v.151, n.3, p.523-527, 1985.

WITTY, L.A.; TAPSON, V.F.; PIANTODISI, C.A. Isolation of mycobacteria in patients with pulmonary alveolar proteinosis. **Medicine**, v.73, n.2, p.103-109, 1994.

WOLINSKY, E. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p.954-963, 1995.

WOLINSKY, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.119, p.107-159, 1979.

WOLINSKY, E.; RYNEARSON, T.K. Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.97, p.1032-1037, 1968.

- WRIGHT, E.P.; COLLINS, C.H.; YATES, M.D. *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply. **J. Hosp. Infect.**, v.6, p.175-178, 1985.
- WU, S.; CHOULIARA, E.; JENSEN, L.B.; DALSGAARD, A. Evaluation of Petrifilm Select *E. coli* Count Plate medium to discriminate antimicrobial resistant *Escherichia coli*. **Acta Vet. Scand.**, v.50, n.38, p.1-7. 2008.
- YAJKO, D.M.; CHIN, D.P.; GONZALEZ, P.C. ET AL. *Mycobacterium avium* complex in water, food, and soil samples collected from the environment of HIV-infected individuals. **J. AIDS Hum. Retroviruses**, v. 9, p.176-182, 1995.
- YAM, W.C.; YUEN, K.Y.; KAM, S.Y. et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. **J. Med. Microbiol.**,v.55, p. 529-536, 2006.
- ZAMARIOLI, L. A.; COELHO, A. G. V.; PEREIRA, C. M. et al. Estudo descritivo da frequência de micobactérias não tuberculosas na Baixada Santista (SP). **J. Bras. Pneumol.**, v.34, n.8, p.590-594. 2008.
- ZHANG, Y.; RAJAGOPALAN, M.; BROWN, B.A. et al. Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.12, p.3132-3139, 1997.
- ŻÓRAWSKI, C.; KARPIŃSKI, T.; SKWAREK, P. et al. *Mycobacterium intracellulare*, serotype 8 (Davis), existing in sawdust as a cause of mass infection of pigs. **Bull. Vet. Inst. Pulway**, v.26, n.1-4, p.1-5, 1983.
- ZUMLA, A.; GRANGE, J. Infection and disease caused by environmental mycobacteria. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 8, n.3, p. 166-172, 2002.