

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Paulo Cesar de Souza Caldas

**Identificação de espécies de Micobactérias de interesse médico através de um sistema da
PCR multiplex**

Rio de Janeiro

2016

Paulo Cesar de Souza Caldas

**Identificação de espécies de Micobactérias de interesse médico através de um sistema da
PCR multiplex**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Epidemiologia em Saúde Pública, do Departamento de Epidemiologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Epidemiologia em Saúde Pública. Área de concentração: Epidemiologia Aplicada a Serviços de Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Pais Ramos
Orientadora: Prof^ª. Dra. Haiana Charifker Schindler

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

C145i Caldas, Paulo Cesar de Souza
Identificação de espécies de Micobactérias de interesse médico através de um sistema da PCR multiplex. / Paulo Cesar de Souza Caldas. -- 2016.
76 f. : il. ; tab.

Orientador: Jesus Pais Ramos
Orientadora: Haiana Charifker Schindler.
Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

1. Micobactérias não Tuberculosas. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Técnicas de Laboratório Clínico. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.995

Paulo Cesar de Souza Caldas

Identificação de espécies de Micobactérias de interesse médico através de um sistema da PCR multiplex

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Epidemiologia em Saúde Pública, do Departamento de Epidemiologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Epidemiologia em Saúde Pública. Área de concentração: Epidemiologia Aplicada a Serviços de Saúde.

Aprovada em: 21 de novembro de 2016

Banca Examinadora

Prof^ª. Dra. Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Paulo Redner
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Jesus Pais Ramos (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2016

Dedico este trabalho aos meus pais, Odaléa de Souza Caldas (in memorian) e Paulo Caldas (in memorian) pela minha educação e por terem me dado oportunidade de estudar para que eu pudesse chegar até o aqui, a minha esposa Eliane que me incentivou a lutar pelos meus objetivos e a minha família, pelo carinho e pela paciência. A eles dedico este trabalho com todo o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, saúde e esperança e por estar sempre presente ao meu lado em todos os momentos da minha vida, aos meus pais (in memorian) pelo seu sacrifício para que eu tivesse uma formação escolar e profissional, a minha esposa Eliane por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e que com amizade e carinho sempre me incentivou e me fez acreditar que valia a pena seguir em frente mesmo quando eu pensava em desistir, a toda a minha família pela paciência, apoio e força.

A Dra. Ângela Werneck (in memorian) e Dra. Fátima Martins, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe no início da minha carreira na área de Micobacteriologia e pela experiência e conhecimentos que adquiri ao longo dos anos.

Ao Dr. Jesus Pais, meu orientador, pela amizade, confiança em mim depositada, pela paciência, orientação, a Dra. Haiana Charifker Schindler, orientadora e amiga, que acreditou no meu potencial desde o início, obrigado principalmente por me transmitirem seus conhecimentos, que tornaram possível o meu aprendizado e também a realização deste trabalho.

A Dra. Fátima Fandinho, chefe do Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Outras Micobacterioses do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSP/Fiocruz, pela amizade, apoio e incentivo e também por aceitar a fazer parte da minha banca de defesa.

Ao Dr. Paulo Redner pela disponibilidade e boa vontade sempre nos ajudando, bem como pelos ensinamentos científicos e também por aceitar a fazer parte da minha banca de defesa.

A Dra. Lílian Montenegro pelas sugestões enriquecedoras, quando da minha banca de qualificação e por aceitar fazer parte da banca de defesa como suplente.

Ao Dr. Luís Caetano M. Antunes que gentilmente aceitou participar como suplente da minha banca de defesa.

Ao Dr. Otávio M. Porto, coordenador do CRPHF, que me incentivou a me aventurar nesta empreitada.

A Karine, minha estagiária que tanto me ajudou com a realização das PCRs e a organização dos dados nas planilhas.

Aos meus colegas Carlos Eduardo e Mariza, por compartilharem seus conhecimentos e experiência em MNT, ao longo destes anos.

A minha amiga e colega Luciana Distásio, por aguentar a sobrecarga de trabalho quando estivemos ausentes nas semanas de aula.

A todos os colegas de trabalho que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos Doutores Paulo Basta e Jesus Pais pela coordenação deste curso de Mestrado Profissional em Epidemiologia e Controle da Tuberculose da ENSP.

As responsáveis pela limpeza diária do laboratório, pela paciência e por arrumar nossas bagunças,

A todos os colegas da turma do Mestrado Profissional do Rio de Janeiro e de Recife, pelo convívio e pelos bons momentos que passamos juntos nesta jornada. A todos os professores pelo convívio e aprendizado. O meus mais sinceros Muito Obrigado!

A ciência por si só é incapaz de responder todas as perguntas e, apesar de seu desenvolvimento, ela nunca vai.

LÉVI-STRAUSS, 1973, p.816

RESUMO

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies denominadas micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT), além do *M. leprae* constituem o gênero *Mycobacterium*. As espécies de MNT mais isoladas no Brasil são as do Complexo *M. avium* (44,4%), *M. kansasii* (13,7%), *M. fortuitum* (10,8%) e *M. abscessus* (9,5%). A identificação das MNT é realizada através de métodos baseados na avaliação de características das culturas e na realização de testes bioquímicos simples, porém demorados, além de alguns testes moleculares, que são na sua maioria caros. Este trabalho teve como objetivo avaliar uma PCR Multiplex em amostras de MNT isoladas no Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Outras Micobacterioses do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSP/Fiocruz no período de 2014 e 2015 e diferencia-las do Complexo *M. tuberculosis*. Todas as amostras foram previamente identificadas através da metodologia do PRA-*hsp65* (PCR com Análise de Enzima de Restrição). Para avaliar a concordância entre os diferentes testes foi utilizada a medida *Kappa*, que apresentou um excelente grau de concordância da PCR multiplex de 100% ($Kappa = 1$), para todas as espécies que foram utilizadas. A PCR Multiplex, mostrou ser uma ferramenta fácil de executar, rápida, e que possibilitou a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA alvo em uma única reação, resultando em economia de tempo e de reagentes, na identificação das espécies utilizadas. A PCR multiplex pode representar uma ferramenta alternativa de diagnóstico útil para a identificação laboratorial das micobactérias de interesse médico mais frequentemente isoladas.

Palavras-chave: Micobactérias não causadoras de Tuberculose. *Mycobacterium tuberculosis*. Reação em Cadeia da Polimerase. Diagnóstico Laboratorial.

ABSTRACT

The *Mycobacterium tuberculosis* complex and other species named non tuberculous mycobacteria (NTM), and *M. leprae* constitutes the genus *Mycobacterium*. The most isolated NTM species in Brazil are the complex *M. avium* (44.4%), *M. kansasii* (13.7%), *M. fortuitum* (10.8%) and *M. abscessus* (9.5%). The identification of NTM is carried out by methods based on evaluation of characteristics of the cultures and carrying out biochemical tests, simple but time consuming. This study aimed to evaluate a Multiplex PCR in isolated MNT samples at the National Reference Laboratory for Tuberculosis and Other Mycobacteriosis of Centro Referência Professor Hélio Fraga / ENSP / Fiocruz in 2014 and 2015 period and differentiates them from complex *M. tuberculosis*. All samples were identified previously by the *hsp65 PRA* methodology (PCR Restriction Enzyme Analysis). To evaluate the correlation between the different tests we used the Kappa measure, which presented an excellent degree of concordance of multiplex PCR of 100% (Kappa = 1), for all studied species that were the used. The Multiplex PCR has proved to be an easy tool to perform, quickly, and which enabled the simultaneous amplification of more than one target DNA sequence in a single reaction, resulting in time and economic reagents, identification of the species used. The multiplex PCR may represent a useful diagnostic alternative tool for laboratory identification of medical interest of mycobacteria more frequently isolated.

Keywords: Mycobacteria Nontuberculous. *Mycobacterium tuberculosis*. Polymerase Chain Reaction. Laboratory Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Planilha do Excel® para servir de referência na geração de números Aleatórios.....	41
Figura 2 -	Seleção das amostras usando um sistema de sorteio de números aleatórios aplicado à lista completa amostras estocadas.....	42
Figura 3 -	Planilha de controle de armazenamento das amostras identificadas no Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Outras Micobacterioses do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSP/Fiocruz.....	43
Figura 4 -	Padrões de bandeamento obtidos na PCR multiplex utilizando amostras de Crescimento Lento (A) e amostras de Crescimento Rápido (B).....	51
Figura 5 -	Padrão molecular (padrão de bandas) das Cepas de Referência obtidas pela PCR ultiplex.....	52
Figura 6 -	Fluxograma sugerido para ser incorporada no diagnóstico de rotina.....	57
Figura 7 -	Fragmentos resultantes da digestão om as enzimas BstEII (A) e HAEIII (B).....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação das Micobactérias proposta por Runyon em 1958.....	24
Tabela 2 -	Características do primeiro par de primers utilizados na PCR multiplex.....	47
Tabela 3 -	Características do segundo par de primers utilizados na PCR multiplex.....	47
Tabela 4 -	Características do terceiro par de primers utilizados na PCR multiplex.....	48
Tabela 5 -	Características do quarto par de primers utilizados na PCR multiplex.....	48
Tabela 6 -	Características dos primers para identificação do Grupo <i>M.fortuitum</i>	48
Tabela 7 -	Características dos primers para identificação do Grupo <i>M.chelonae-abscessus</i>	48
Tabela 8 -	Tamanhos dos fragmentos da PCR Multiplex em pares de bases para SGM.....	49
Tabela 9 -	Tamanhos dos fragmentos da PCR Multiplex em pares de bases para RGM.....	50
Tabela 10 -	Detecção das Espécies estudadas através da PCR multiplex.....	52
Tabela 11 -	Concordância da técnica de PCR multiplex utilizando como padrão ouro o PRA-hsp65 em cepas de micobactérias isoladas de amostras clínicas.....	53
Tabela 12 -	Características dos oligonucleotídeos utilizados na PCR PRA-hsp65.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS	Espécies Adicionais, de additional species
ATCC	<i>American Type Culture Colletion</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAMHI	Endonuclease de restrição isolada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BSTEII	Endonuclease de restrição isolada de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
C	Citosina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CfoI	Endonuclease de restrição isolada de <i>Clostridium formicoaceticum</i>
CM	Micobactérias Comuns, de Common Mycobacteria
CMTB	Complexo <i>M.tuberculosis</i>
CRPHF	Centro de Referência Professor Hélio Fraga
DATP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato A
DCTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato C
DGTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato G
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , de ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DTTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato T
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
ESAT-6	<i>Early Secretory Antigen</i>
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose Cística
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Guanina
GLC	<i>Cromatografia Gasosa, de gas-liquid chromatography</i>
H37RV	Cepa Padrão de referência de <i>M.tuberculosis</i>
HAE III.	Endonuclease de restrição isolada de <i>Haemophilus aegyptius</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
<i>Hsp 65</i>	<i>Proteínas de Choque Térmico de 65 kd, de “heat shock protein</i>
IS 6110	<i>Insertion Sequence 6110</i>
ITS	Região Espaçadora Interna, de Internal Transcribed Spacer

L-J	Löwenstein-Jensen
M.	<i>Mycobacterium</i>
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization– Time of Flight</i>
MNT	Micobactérias não Causadoras de Tuberculose
MOTT	<i>Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli</i>
MS	<i>Espectrometria de Massa, de Mass spectrometry</i>
NRUI	Endonuclease de restrição isolada a partir de uma cepa de <i>Escherichia coli</i> portadora do gene clonado de <i>Nocardia rubra</i>
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Reação de Polimerase em Cadeia, de Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PRA-hsp65	PCR com Análise de Enzima de Restrição da Proteínas de Choque Térmico de 65- kDa
RGM	Micobactérias de Crescimento Rápido, de Rapidly Growing <i>Mycobacteria</i>
RLU	Unidades Relativas de Luz
rpoB	Gene que codifica a subunidade β do RNA-polimerase
SAU96I	Endonuclease de restrição isolada de <i>Staphylococcus aureus</i>
SGM	Micobactérias de Crescimento Lento, de Slow-growing <i>mycobacteria</i>
16S rDNA	Gene que codifica a subunidade 16S do ribossomo
T	Timina
Taq DNA polimerase	Enzima DNA polimerase isolada de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão tris-borato EDTA
TLC	<i>Cromatografia de Camada Fina, de Thin-Layer Chromatography</i>
TRIS-EDTA	Tris (hidroximetil) ácido aminometano etileno diamina tetra acético
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrometro
KDa	kilodalton
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
α	Alfa
μL	Microlitros
mM	Milimolar
KCl	Cloreto de Potássio
U	Unidades
pmoles	Picomoles
V/cm	Volts por Centímetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Gênero <i>Mycobacterium</i>	20
2.2	Micobactérias não causadoras de tuberculose.....	20
2.3	Complexos de espécies de micobactérias.....	24
2.3.1	<i>Complexo M. tuberculosis</i>	24
2.3.2	<i>Complexo Mycobacterium avium (MAC)</i>	25
2.3.3	<i>Grupo Mycobacterium chelonae – abscessos</i>	25
2.3.4	<i>Grupo Mycobacterium fortuitum</i>	26
2.4	<i>Mycobacterium kansasii</i>	26
3	IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS	28
3.1	Identificação Fenotípica das MNT	28
3.1.1	Identificação pelo HPLC.....	28
3.1.2	Identificação pelo MALDI-TOF.....	29
3.2	Identificação Genotípica das MNT	30
3.2.1	PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase).....	30
3.2.2	O gene 16S rRNA.....	31
3.2.3	O gene <i>hsp65</i>	32
3.2.4	A região ITS.....	32
3.3	Sistemas que utilizam Hibridização de ácidos nucleicos	33
3.3.1	AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA, EUA).....	33
3.3.2	Inno-Lipa Mycobacteria V2, (Innogenetics, Ghent, Belgium).....	33
3.3.3	GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Nehren, Germany).....	34
3.3.4	SpeedOligo (Viracell, Granada, Spain).....	34
3.4	Sequenciamento de DNA	35
3.5	PRA- <i>hsp65</i> (Restriction fragment length polymorphism analysis of the <i>hsp65</i> gene)	35
3.6	PCR multiplex	37
4	JUSTIFICATIVA	38
5	OBJETIVO GERAL	39
5.1	Objetivos específicos	39

6	DESENHO DO ESTUDO	40
6.1	Amostras do Estudo	40
6.2	Cálculo Amostral	40
6.3	Seleção das Amostras	41
6.4	Critérios de Inclusão	42
6.5	Critérios de Exclusão	42
6.6	Procedimentos de Coleta de Dados	42
7	PLANO DE ANÁLISE	44
7.1	Análise Estatística	44
8	ASPECTOS ÉTICOS	45
9	MATERIAS E MÉTODOS	46
9.1	Cultivo Micobacteriano	46
9.2	Extração do DNA Genômico	46
10	PCR MULTIPLEX	47
10.1	Amplificação dos Fragmentos Específicos Pela PCR Multiplex	49
11	RESULTADOS	51
11.1	Otimização das Condições da PCR Multiplex	51
11.2	Determinação do Padrão Molecular pela PCR Multiplex	52
11.3	Comparação dos Resultados da PCR Multiplex e do PRA–hsp65	52
12	DISCUSSÃO	54
13	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE - Metodologia utilizada no PRA-hsp65 para identificação das espécies	75

1 INTRODUÇÃO

As micobactérias não causadoras de tuberculose podem ser encontradas em diversas espécies de animais, no solo, na água, no ar, nos alimentos e ambientes modificados pelo ser humano como, por exemplo, tubulações de esgoto (FALKINHAM III, 2008; SHAO Y *et al.*,2015).

As MNT muitas vezes são negligenciadas, elas podem ser saprófitas ambientais ubíquas e considerados como patógenos humanos oportunistas. Embora algumas espécies sejam comumente associadas com infecção humana, muitas destas espécies descritas ao longo das últimas décadas são considerados como potencialmente patogénicas (NUNES-COSTA *et al.*,2016).Foram primeiramente descritas no final do século XIX, logo após a identificação de *M. tuberculosis*. Entretanto, o reconhecimento dessas micobactérias como importantes patógenos, por causarem enfermidades em pacientes com doenças pulmonares crônicas, ocorreu somente na década de 50 (KANE; MANI, 2003).

Os primeiros quadros clínicos produzidos foram por muitos anos considerados ocasionais e quase sempre ligados a situações de imunodeficiência. Nos últimos 20 anos tem se tornado uma infecção relativamente frequente, relacionada ou não com quadros de imunodepressão (GÓMEZ, 2009).

As doenças causadas por micobactérias não causadoras de tuberculose , em pacientes com AIDS, vem aumentando desde de 1982 e as mais comentadas associadas com infecção pulmonar nestes pacientes são: *M. kansasii*, *M. abscessus* e *M. fortuitum*. (JOHNSON; WALLER; LEVENTHAL, 2008).

Os isolamentos de cepas de micobactérias não causadoras de tuberculose em amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares de pacientes com suspeita de tuberculose, têm sido descritos em diversos estudos no Brasil e em outros países (BARRETO; CAMPOS, 2000; COSTA *et al.*, 2009; MATOS *et al.*, 2004; NUNES-COSTA *et al.*, 2016; SHAO Y *et al.*,2015).

No Brasil, as espécies mais frequentemente associadas à doença pulmonar por MNT são: *M. kansasii* e *M. avium*. Outras espécies como, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. lentiflavum*, *M. abscessus* e *M. szulgai* são isoladas ocasionalmente (BARRETO; CAMPOS, 2000).

A infecção causada pelo *M. kansasii* muitas vezes apresenta sinais e sintomas similares a tuberculose pulmonar enquanto que o Complexo *M. avium* causa doença disseminada (BAINOMUGISA *et al.*,2015; GOPINATH K,2010).

As doenças causadas pelas MNT não são de notificação compulsória, sendo apenas

notificadas quando ocorrem casos de infecções hospitalares por procedimentos cirúrgicos (BRASIL,2009; NUNES-COSTA *et al.*,2016)

De 1998 a 2009, foram notificados 2.520 casos de infecções pós-cirúrgicas devido à micobactéria de crescimento rápido incluindo *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. massiliense*, distribuídas predominantemente em hospitais privados do país. Dos 23 estados do país, que tiveram casos notificados, dez concentraram 97,8% dos casos. (BRASIL, 2011).

As espécies de MNT mais isoladas no Brasil são as principais causadoras de doença pulmonar e ganglionar, infecções hospitalares, surtos e pseudo-surtos importantes. Essas e outras micobactérias tem sido encontrada em pacientes soropositivos infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida, contribuindo com o aumento do número das micobacterioses no Brasil (BARRETO; CAMPOS, 2000; BRASIL, 2005; DUARTE *et al.*, 2009; MELLO *et al.*, 2013; NUNES-COSTA *et al.*,2016).

A pouca infraestrutura dos laboratórios para realizar a cultura e identificar as MNT, tornam difícil o diagnóstico. Portanto, é necessário o desenvolvimento de um método alternativo que utilize marcadores moleculares que possam detectar e diferenciar o *M. tuberculosis* (MTB) e NTM (BAINOMUGISA *et al.* ,2015).

O diagnóstico convencional apresenta inúmeras dificuldades, pois as características clínicas das doenças pulmonares causadas por MNT são frequentemente similares às da tuberculose (PEDRO *et al.*, 2008) e a baciloscopia, além de possuir sensibilidade limitada, também não é capaz de diferenciar as espécies de micobactérias (HERNÁNDEZ *et al.*,2016).

A rápida identificação é um fator determinante para que se forneça ao doente o tratamento adequado, já que as patologias provocadas pelas diferentes espécies de micobactérias envolvem diferentes riscos e regimes terapêuticos específicos (BARRETO *et al.*, 2000; BROWN-ELLIOTT; WASER; WALLACE,2012; YAM *et al.*, 2006).

Os laboratórios realizam a identificação de vários isolados de micobactérias para definir a sua importância, classificando-as como verdadeiros patógenos, contaminante ambiental ou um potencial contaminante, por esta razão, a atual recomendação da ATS (American Thoracic Society) para estabelecer o diagnóstico de doença pulmonar por NTM é a coleta de pelo menos duas amostras de Escarro pela manhã em dias diferentes, ou uma de Lavado bronquio-alveolar (BARRETO *et al.*, 2000; GRIFFITH *et al.*,2007; KATOCH *et al.*, 2007; LEÃO *et al.*, 2005; VAN INGEN,2015).

A identificação das micobactérias é tradicionalmente realizada utilizando-se métodos baseados na avaliação das características das culturas e na realização de testes bioquímicos,

que são de execução simples, entretanto trabalhosos e muito demorados, pois são dependentes do crescimento bacteriano (BROWN-ELLIOTT; WASER; WALLACE,2012; HERNÁNDEZ-TOLOZA *et al.*,2016; KATOCH *et al.*, 2007; LEÃO *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas, com base em estudos genotípicos, novas metodologias vêm sendo desenvolvidas para possibilitar a identificação rápida e acurada das espécies de micobactérias. Estas ferramentas moleculares têm auxiliado na detecção de novas espécies de MNT (IOANNIS *et al.*, 2008; RAMIS *et al.*,2015; UEKI *et al.*, 2005).

Para melhorar a capacidade de identificação das MNT, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos rápidos, de fácil execução e também precisos, para aplicação na rotina de identificação de micobactérias, em laboratórios equipados para realização de técnicas de biologia molecular como alternativa aos métodos convencionais. (BAINOMUGISA *et al.* , 2015;BRUNELLO *et al.*, 2001.; CADMUS *et al.*,2016: RAMIS *et al.*,2015; TORTOLI, 2014).

Atualmente estão disponíveis no mercado sistemas para diagnóstico, tais como AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA, EUA), que é baseado na tecnologia de sondas de DNA para a identificação de bactérias, a tecnologia de sonda em linha (hibridação em tiras) que inclui um PCR (com primers biotinilados), hibridação reversa com diferentes sondas específicas de DNA imobilizadas em linhas paralelas sobre uma tira e detecção colorimétrica em instrumento automatizado: Inno LiPA Mycobacteria v2, (Innogenetics, Ghent, Belgium), GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Nehren, Germany) e o SpeedOligo (Vircell, Madrid, Spain) (IOANNIS *et al.*,2008; RAMIS *et al.*,2015).

Existem também outras metodologias, como a análise dos ácidos micólicos por HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), o Sequenciamento de genes específicos ou regiões espaçadoras, cujo mais importante gene alvo para a identificação de MNT é o que codifica o 16S rRNA e o MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization– time of flight), que é um método de espectrometria de massa para laboratórios clínicos e de pesquisa (BROWN-ELLIOTT; WASER; WALLACE,2012; TORTOLI ,2003).

A técnica de PRA-*hsp65* proposta por Telenti *et.al.* (1993) e Devallois *et al.* (1997) possibilita a identificação de diversas espécies de MNT e seus resultados apresentam uma boa correlação com os resultados de identificação bioquímica (CHIMARA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002; VERMA *et al.*,2015).

A PCR multiplex é uma ferramenta rápida, precisa, capaz de possibilitar a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA alvo em apenas uma única mistura reacional, resultando em uma economia de tempo e de reagentes (CORSETTI *et al.*, 2007;

HERNANDEZ *et al.*,2003; TANAKA *et al.*, 2003,). Esta técnica é uma ferramenta útil no diagnóstico de doenças micobacterianas. A PCR multiplex permite distinção entre o Complexo *M. tuberculosis* e MNT (BHATTACHARY *et al.*, 2003, POROCA *et al.*, 2009).

Neste trabalho foi utilizado um método molecular “in-house” baseado em um sistema de PCR multiplex em diferentes alvos genéticos, para a identificação de micobactérias não causadoras de tuberculosas (MNT) isoladas no Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Outras Micobacterioses do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSP/Fiocruz, tendo como comparação a identificação previamente realizada através da metodologia do PRA-*hsp65* (PCR com Análise de Enzima de Restrição) (CHIA *et al.*, 2012;TELENTI *et al.*, 1993).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Mycobacterium*

Atualmente, o gênero *Mycobacterium* contém aproximadamente 175 espécies e 13 subespécies (EUZÉBY, 2016). O gênero *Mycobacterium* é o único que está inserido na família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* e na classe *Actinomycetes* (JORDAN *et al.*, 2007; LEÃO *et al.*, 2005; SAVIOLA; BISHAI, 2006).

As principais características das bactérias do gênero *Mycobacterium* são a propriedade de álcool-ácido resistência (por isso são denominados de bacilos álcool-ácido resistentes ou BAAR), produção de ácidos micólicos, além de uma elevada concentração do conteúdo G+C (guanina e citosina) no seu DNA (ADÉKAMBI; DRANCOURT, 2004; JORDAN *et al.*, 2007; LEÃO *et al.*, 2005; SAVIOLA; BISHAI, 2006; SOLAR *et al.*, 2005).

As micobactérias possuem forma de bacilos retos ou levemente curvos com 0,2 - 0,7µm de diâmetro, 1,0 - 10µm de comprimento, são imóveis, não esporulados, sem cápsulas e aeróbios, embora algumas espécies sejam capazes de se desenvolverem em condições de microaerofilia. Apresentam crescimento lento ou rápido, podendo produzir colônias laranjas, amarelas, ou sem pigmento especialmente quando expostas à luz, com superfície grosseira e rugosa visíveis após 2 - 20 dias em temperatura ótima (ADÉKAMBI. & DRANCOURT, 2004; LEÃO *et al.*, 2005; JORDAN *et al.*, 2007).

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e outras denominadas micobactérias não causadoras de tuberculosas (MNT), além de *M. leprae*. O *M. tuberculosis* é a espécie de maior importância médica, por ser o principal agente etiológico da tuberculose (RAJU *et al.*, 2016).

2.2 Micobactérias não causadoras de tuberculose

No passado, as espécies de micobactérias não pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* foram descritos como micobactérias "atípicas", como MOTT (mycobacteria other than tubercle bacilli) e atualmente são denominadas de MNT (micobactérias não causadoras de tuberculose), como adotado pela American Thoracic Society (ATS) (KATOCH, 2004; JORDAN *et al.*, 2007).

A maioria das espécies das chamadas micobactérias não causadoras de tuberculose foi descrita no século passado. No Brasil, Costa Cruz descreveu em 1938, o *Mycobacterium*

fortuitum, que foi isolado de um abscesso cutâneo (LEÃO *et al.*, 2005; SOLAR *et al.*, 2005). Mais recentemente, Ramos *et al.* (2013) descreveram uma nova espécie denominada *Mycobacterium fragae*, isolado de 3 espécimes clínicos de um paciente com infecção pulmonar.

Esses microrganismos podem ser potencialmente patogênicos, saprófitos, oportunistas e letais, podendo ser isolados em amostras clínicas, água, solo, de outras fontes ambientais, objetos e alimentos, que são as fontes presumidas de infecção. Já foram encontrados em material médico tais como endoscópios e soluções cirúrgicas, e apresentam mais de 50 espécies associadas com doença em seres humanos (BONAITI *et al.*,2015; HERNÁNDEZ-TOLOZA *et al.*,2016; JARZEMBOWSKI; JORDAN *et al.*,2007; LEÃO *et al.*, 2005; WU; LU; LAI, 2009; YOUNG, 2008).

Apresentam elevada resistência aos antibióticos e desinfetantes, além de patogenicidade intracelular (NUNES-COSTA *et al.*,2016; PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004).

Vários estudos mostraram que as diferentes espécies de MNT exibem patogenicidade variada e diferentes padrões de sensibilidade aos antibióticos (SHAO Y *et al.*,2015).

A capacidade das MNT em produzir doença, é amplamente descrita na literatura e vem aumentando progressivamente a sua importância com o isolamento de diferentes espécies em laboratórios (ATS,1997; SHAO Y *et al.*,2015; TORTOLI, 2003; YEW *et al.*, 2011).

São um grupo diversificado de patógenos capazes de coletivamente causarem um considerável e muitas vezes negligenciado, aumento da carga de doença a nível mundial. Apesar das MNT causarem doença semelhante as causadas por *M. tuberculosis*, elas geralmente não respondem aos regimes clássicos de tratamento com drogas para tuberculose,resultando em erros de diagnóstico,particularmente em locais com poucos recursos (KEHRMANN *et al.*,2016; RAJU *et al.*,2016; TORTOLI *et al.*, 2014).

A situação epidemiológica global das doenças causadas por MNT é desconhecida, porque não é uma doença de notificação na maioria dos países, mas diversos relatos de infecções e surtos por NTM publicados sugerem aumento na proporção de casos atribuídos a estes agentes infecciosos. A maior parte destes dados são obtidos de estudos que são realizados no laboratório, a partir do isolamento de MNT principalmente em países da América do Norte, Europa e Japão (GRIFFITH, 2010; HERNÁNDEZ-TOLOZA *et al.*,2016; MOORE *et al.*,2010; NUNES-COSTA *et al.*,2016; STOUT; KOH; YEW,2016).

Os levantamentos epidemiológicos recentes, mostram evidências sugerindo que as doenças causadas por NTM são muito mais comuns do que se pensava, mais comum do que a TB no mundo industrializado, possivelmente aumentando a prevalência a nível mundial.

Apesar desta evidência, estes organismos continuam sendo pouco estudado (RAJU *et al.*,2016; STOUT; KOH; YEW,2016).

Vários estudos indicam que a incidência de NTM tem aumentando no mundo, e estima-se que a mortalidade por doença pulmonar causada por MNT, é de cerca de 30%, devido ao tratamento inadequado e elevada falência no tratamento (SHAO Y *et al.*,2015).

Em Ontário, Canadá, em 2010 a prevalência da doença foi estimada em 9,8 por 100.000 habitantes. Em um estudo recentemente a prevalência anual de isolamento de MNT em amostras respiratórias variou de 14,1 a 22,2 por 100 000 habitantes (AL HOUQANI *et al.*, 2011; MARRAS *et al.*,2010; PREVOTS,2015; STOUT; KOH; YEW,2016)

Nos EUA (Oregon), a prevalência estimada da doença pulmonar por NTM foi de 8,6 por 100 000 habitantes. Um estudo de base populacional no mesmo estado destacou uma crescente incidência da doença pulmonar por NTM de 4,8 por 100.000 habitantes em 2007 para 5,6 por 100.000 habitantes em 2012. Em outras partes do país, a prevalência foi estimada em 1,4 a 6,6 por 100 000 habitantes (PREVOTS *et al.*,2010; STOUT; KOH; YEW,2016; WINTHROP *et al.*,2010;).

Na Europa, devido à variação metodológicas de estudo e as diferenças populacionais estudadas, a prevalência do isolamento das MNT em amostras respiratórias e a prevalência de tais doenças são discrepantes (PREVOTS,2015; STOUT; KOH; YEW,2016 ;VAN INGEN *et al.*,2009).

Em um estudo realizado em Taiwan, em 2008 mostrou uma prevalência estimada de 7,94 por 100.000 pacientes com a doença, principalmente em idosos (LAI *et al.*,2010; STOUT; KOH; YEW,2016).

Na Austrália e na Nova Zelândia, alguns estudos de base populacional para tratar a epidemiologia do isolamento de MNT pulmonar e doença, os dados mais recentes sugerem um aumento da incidência da doença / prevalência de 3 por 100 000, onde o MAC tem sido a MNT mais comumente isolada associada com a doença pulmonar (FREEMAN *et al.*,2004; THOMSON,2010;PREVOTS,2015;STOUT;KOH;YEW,2016).

Os dados disponíveis de estudos realizados em países da América do Norte, Europa e Austrália e alguns países e áreas geográficas da Ásia oriental, como o Japão, Coreia do Sul e Taiwan, têm evidenciado um aumento contínuo da prevalência da doença nestes continentes (PREVOTS,2015; STOUT; KOH; YEW,2016) .

No Brasil, um estudo realizado por BARRETO *et al.* no ano de 2000, mostrou que as espécies de MNT mais isoladas no Brasil foram as do Complexo *M. avium* (44,4%), *M. kansasii* (13,7%), *M. fortuitum* (10,8%) e *M. abscessus* (9,5%). Estas espécies, em sua

maioria, foram encontradas na região sudeste (BARRETO; CAMPOS, 2000; BRASIL, 2005).

Em outro estudo foram analisadas a prevalência e as condições associadas a doenças pulmonares causadas por MNT no estado do Rio de Janeiro, e mostrou que os maiores percentuais de isolamento foram de *M. kansasii* (33.9%); *Complexo M. avium*, (30.4%); *M. abscessus*, (13.2%); e *M. fortuitum*, (8.0%) (MELLO *et al.*, 2013; NUNES-COSTA *et al.*, 2016).

Alguns estudos recentes têm citado o *M. kansasii* como a segunda causa de doença pulmonar produzida por MNT, sendo precedido pelo Complexo *M. avium-intracellulare* (CHEN *et al.*, 2012; DEL GIUDICE *et al.*, 2011; HOEFSLOOT *et al.*, 2013; MORRIS *et al.*, 2011; NUNES-COSTA *et al.*, 2016; SEISCENTO *et al.*, 2005; TELLES *et al.*, 2005; THOMSON, 2010). Já outros estudos, demonstraram um aumento significativo desta espécie, sobrepondo o Complexo *M. avium-intracellulare* em algumas regiões de países como Inglaterra, Japão, Israel e Brasil (BRAUN *et al.*, 2013; DAVIES *et al.*, 2012; MELLO *et al.*, 2013; PREVOTS, 2015), mostrando a existência da variabilidade geográfica desta espécie.

A maior diferença entre a tuberculose e as outras micobacterioses é a transmissão do *M. tuberculosis* de pessoa para pessoa através de aerossóis, sendo importante que o diagnóstico da tuberculose, seja realizado o mais rapidamente possível, para que a interrupção da sua propagação, seja realizada (SOINI; MUSSER, 2001).

Dados recentes parecem revelar a possibilidade de transmissão de MNT de humano para humano, em pacientes com fibrose cística, entretanto os autores não puderam demonstrar a maneira exata da transmissão (BRYANT *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ-TOLOZA *et al.*, 2016; RAJU *et al.*, 2016).

Em uma recente publicação de Ricketts *et al.* (2014), foi relatado um caso único no Reino Unido, que sugere a possibilidade de transmissão de humano para humano, onde uma mulher e seu marido foram infectados por cepas idênticas de *M. kansasii*, sem que nenhuma fonte comum fosse encontrada.

A divisão das micobactérias mais comumente isoladas, proposta por Runyon em 1958, é baseada na observação de características tais como: a pigmentação das colônias e a velocidade de crescimento, onde as micobactérias consideradas de crescimento lento apresentam um tempo de geração médio de 24 horas e necessitam de mais de uma semana para formar uma colônia, enquanto as micobactérias de crescimento rápido apresentam um tempo de geração de 2 a 5 horas e formam colônias visíveis em meio sólido em 7 dias ou menos (BRASIL, 2005). (Tabela-1)

Tabela1- Classificação das micobactérias proposta por Runyon em 1958

GRUPO	DESCRIÇÃO
I. Fotocromogênicas	Crescimento lento. Colônias não pigmentadas que adquirem cor que pode variar do amarelo para o laranja quando expostas à luz
II. Escotocromogênicas	Crescimento lento. Colônias adquirem cor que pode variar do amarelo ao laranja quando cultivadas na ausência ou presença da luz.
III. Não Cromogênicas	Crescimento lento. Colônias geralmente não pigmentadas (cor creme).
IV. Crescimento Rápido	Desenvolvem colônias nos meios de cultura em sete dias ou menos. Podem ser pigmentadas ou não.

Fonte: BRASIL (2005).

2.3 Complexos de espécies de micobactérias

As espécies que apresentam uma relação de antígenos citoplasmáticos, grande similaridade fenotípica e genética, que causem o mesmo espectro de doença formam um complexo, como o Complexo *M. tuberculosis*, Complexo *M. avium-intracellulare*, Complexo *M. chelonae-abscessus*. Entretanto com a descrição de novas espécies, incluídas no Complexo *M. fortuitum*, com diferentes espectros de doenças e novos perfis de sensibilidade aos antibióticos formaram então o conceito de Grupo, que tem melhor correlação com apresentação clínica e o perfil de sensibilidade, sendo este conceito atualmente o mais aceito para o Complexo *M. fortuitum*, que foi subdividido em Grupo *M. fortuitum* e Grupo *M. chelonae-abscessus* (BRASIL, 2009; BROWN-ELLIOTT E WALLACE, 2002).

2.3.1. Complexo *M. tuberculosis*

O complexo *M. tuberculosis* difere das outras micobactérias patogênicas principalmente pelos seus habitats e da sua transmissão, bem como a susceptibilidade aos agentes quimioterapêuticos padrões (PIERSIMONI; SCARPARO, 2008).

O *M. tuberculosis* juntamente com o *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microtii*, *M. caprae*, *M. pinipedii*, formam o Complexo *M. tuberculosis*. (BRASIL, 2005). Em estudos recentes outras espécies como o *M. mungi*, *M. orygis* e o *M. chimpanzee*, tem sido consideradas como pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* (PEDRO *et al.*, 2014).

A identificação do complexo *M. tuberculosis* é essencial para o diagnóstico da tuberculose, assim como a diferenciação dos seus membros é necessária para o tratamento

adequado dos doentes sendo também muito útil para fins epidemiológicos (PARSONS *et al.*, 2002).

2.3.2 Complexo *Mycobacterium avium* (MAC)

Segundo González-Pérez e colaboradores (2013), tradicionalmente, o MAC é composto por duas espécies, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*.

Atualmente, com os avanços na taxonomia molecular foram incluídas novas espécies neste complexo: *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium colombiense*, *Mycobacterium arosiense*, *Mycobacterium vulneris*, *Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium timonense* e *Mycobacterium bouchedurhonense* (CAYROU *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2010; VAN INGEN *et al.*, 2009).

Até recentemente, o *M. avium* era subdividido em três subespécies diferentes: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *silvaticum*. Estas três subespécies apresentam entre si diferenças fenotípicas, genotípicas e epidemiológicas (LÉVY-FRÉBAULT, 1990; RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001; THOREL; KRICHEVSKY, 1990). Mais recentemente, estirpes de *M. avium* isoladas a partir de amostras humanas, foram classificadas numa nova subespécie: *M. avium* subsp. *hominissuis*, uma importante causadora de doença pulmonar (IAKHIAEVA *et al.*, 2016; MIJS *et al.*, 2002).

2.3.3 Grupo *Mycobacterium chelonae* – abscessus

Este grupo é composto por 3 espécies: *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. immunogenum*. O nome Grupo *M. chelonae-abscessus* é usado para casos quando as espécies específicas não puderem ser identificadas pela metodologia utilizada. São associados com uma variedade de doenças diferentes. A mais comum é, provavelmente, doença pulmonar crônica, que geralmente ocorre em mulheres idosas com bronquiectasia ou pacientes com fibrose cística (FC), e responsáveis por aproximadamente 95% das infecções cutâneas disseminadas provocadas por Micobactérias de crescimento rápido (BROWN-ELLIOTT E WALLACE, 2002).

O grupo *M. chelonae-abscessus* está envolvido em vários surtos associadas a doenças, tais como infecções em ferida pós-cirurgia cardíaca (DE GROOTE; HUITT, 2006; NUNES-COSTA *et al.*, 2016; WALLACE *et al.*, 1989). Outros surtos de infecção envolveram cirurgia plástica, hemodiálise e surtos diversos incluindo infecções de feridas de laparoscopia,

lipoaspiração (DE GROOTE; HUITT,2006; MEYERS *et al.*,2002; NUNES-COSTA *et al.*,2016).

2.3.4 Grupo *Mycobacterium fortuitum*

O grupo *M. fortuitum* historicamente é constituído por três espécies: *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, e o Complexo terceira biovariante. Atualmente este grupo compreende as espécies *M. fortuitum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense*, *M. bonickei*, e *M. conceptionense*.*M.peregrinum*,*M.brisbanense*,*M.neworleansense* (SCHINSKY *et al.*,2004).Devido a falta de precisão na separação das espécies deste grupo, eles são muitas vezes referidas apenas como "*M. fortuitum*", como se fossem uma única espécie (BROWN-ELLIOTT E WALLACE, 2002).

Doença ocular (ceratite,úlceras da córnea) após trauma e Infecções cirúrgicas devido ao *M. fortuitum* estão bem documentados, especialmente em associação com cirurgia cardiotorácica. A fonte é, frequentemente, a contaminação da ferida,diretamente ou indiretamente, com água da torneira (HO *et al.*,2012; KHOSRAVI *et al.*,2015).

Este grupo é responsável por 60% dos casos de infecções cutâneas localizadas, causadas por RGM, mas raramente causam doença pulmonar crônica (NUNES-COSTA *et al.*, 2016; WALLACE *et al.*,1983).

Outras infecções hospitalares com este microrganismo incluem infecções por dispositivos implantados (por exemplo, cateteres) e abscessos em local da injeção. Pseudo-surtos têm sido associados com endoscópios contaminados (HO *et al.*,2012; KHOSRAVI *et al.*, 2015).

2.4 *Mycobacterium kansasii*

Foi descrito pela primeira vez em 1953 por Buhler e Pollack e eventualmente apresenta-se como um agente colonizador, sendo geralmente considerado um patógeno oportunista virulento em doenças humanas. No pulmão, pode desencadear doença com características clínicas e aspectos de imagem semelhantes à tuberculose (GRIFFITH *et al.*, 2007).

Semelhante a outras NTM, supõem-se que infecções por *M. kansasii* são adquiridas a partir do ambiente em vez da transmissão de humano para humano (STRAPAGIEL,2016 ;ZHANG *et al.*, 2004).

Embora o seu reservatório natural definitivo não tenha sido identificado, este microrganismo tem sido frequentemente isolado a partir da água de torneira, que é considerada como sendo o seu principal ambiente (STRAPAGIEL, 2016 ;ZHANG *et al.*, 2004).

Mycobacterium kansasii é a segunda espécie mais frequentemente isolada de amostras respiratórias no Brasil, sendo a espécie mais prevalente em pacientes com sintomas de doença pulmonar. Apesar de ser uma espécie de MNT clinicamente relevante e uma causa comum de infecção pulmonar, o *M. kansasii* é muitas vezes considerado o patógeno mais facilmente tratável, pois é geralmente suscetível as drogas antituberculose comuns, mostrando uma boa correlação entre os testes de sensibilidade e a resposta clínica (NUNES-COSTA *et al.*,2016).

É uma micobactéria reconhecida por suas características fotocromogênicas (produz pigmento amarelo quando exposto à luz), e crescimento lento (duas a quatro semanas) (ZHANG *et al.*, 2004).

3 IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

3.1 Identificação Fenotípica das MNT

A identificação fenotípica das MNT é baseada nas características do crescimento bacteriano e pelos testes bioquímicos, realizados a partir de um cultivo recente (crescimento ativo) (BARRETO *et al.*, 2008).

Os testes bioquímicos clássicos usados para determinar as características fenotípicas de algumas espécies de micobactérias mais comuns são: a velocidade de crescimento, produção de pigmento, redução do nitrato, produção da niacina, produção de catalase, inativação da catalase a 68°C, hidrólise do Tween 80, redução do telurito de potássio, absorção de ferro, arilsulfatase, produção de urease, crescimento em presença de açúcares (manitol, inositol, citrato de sódio) e crescimento em presença de agentes inibidores (ácido paranitrobenzóico, hidrazida do ácido tiofeno 2carboxílico, canamicina, cicloserina, ofloxacina, Agar MacConkey, hidroxilamina, etambutol, cloreto de sódio a 5%) (BARRETO *et al.*, 2008; JARZEMBOWSKI : YOUNG, 2008).

Para identificação de micobactérias a nível de espécie, com estes testes, são necessários de três a seis semanas, pois são realizados a partir de culturas puras e além disso, algumas espécies geneticamente distintas podem apresentar resultados fenotípicos e perfis bioquímicos indistinguíveis, similares ou idênticos (BRASIL, 2005). Várias espécies de micobactérias, em particular as mais recentemente descritas, não podem ser identificadas utilizando apenas os testes bioquímicos (BRASIL, 2005).

3.1.1 Identificação pelo HPLC

O estudo dos ácidos micólicos que se encontram na parede celular de todas as micobactérias destaca-se entre os métodos baseados em características fenotípicas. É uma metodologia alternativa para a identificação tradicional das micobactérias, que compreende a análise qualitativa da composição lipídica da parede celular destes microrganismos, que corresponde até 40% do seu peso seco (BARRETO *et al.*, 2006; BUTLER; GUTHERTZ, 2001; KELLOGG *et al.*, 2001; TORTOLI, 2003; VAN INGEN, 2015).

A análise desses ácidos é realizada através de cromatografia: cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia gasosa (GLC) e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Elas são baseadas nas diferentes solubilidades dos componentes entre duas fases

que se misturam: uma fase estacionária (líquida ou sólida) e uma móvel (gás ou líquido), que podem variar de acordo com o método de cromatografia utilizado (BUTLER ; GUTHERTZ, 2001; KELLOGG *et al.*,2001).

Dentre as diferentes metodologias, a análise de ácidos micólicos pela HPLC foi a que mostrou ser mais rápida, reprodutível, espécie específica e de aplicação universal na identificação micobacteriana, possuindo uma base de dados com vários perfis de ácidos micólicos de espécies de micobactérias bem caracterizados. Em 1989, foi incorporada na rotina de testes de identificação, sendo mais tarde em 1990, o teste padrão para identificação do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) dos Estados Unidos (BARRETO *et al.*,2006; BUTLER; GUTHERTZ, 2001; KELLOGG *et al.*,2001;).

A HPLC é um método complexo que requer uma infra-estrutura cara, sendo utilizada apenas em centros com pessoal treinado e com grande experiência (KELLOGG *et al.*,2001).

3.1.2 Identificação pelo MALDI-TOF

As metodologias de espectrometria de Massas têm sido utilizado na caracterização bacteriana a algum tempo. (ANHALT;FENSELAU,1975). Entretanto, o progresso significativo nesta área foi devido a introdução recente da desorção por ionização por laser assistido por matriz (MALDI-TOF) espectrometria de massa. Esta metodologia oferece uma impressão digital espectral característica, baseada em íons de massa adsorvida a superfície da célula. (HILLENKAMP *et al.*,1991; KARAS *et al.*,1988; MAZZEO *et al.*,2006).

As células são colhidas a partir de colônias bacterianas são aplicadas em uma placa de, depois cobertas com uma solução matriz sendo então colocadas em um espectrômetro de massa e mediante a irradiação por laser, as moléculas da amostra são ionizados e adsorvidas como íons gasosos. O software do aparelho quando termina o processo de aquisição e análise de dados usa automaticamente algoritmos estatísticos para gerar um perfil, baseado na razão entre o peso molecular e a carga. Para uma correta identificação de espécies é fundamental um banco de dados (BALADA-LLASAT;KAMBOJ;PANCHOLI,2013;MAZZEO *et al.*,2006;PIGNONE *et al.*,2006). Esta metodolgia permite a rápida identificação de micobactérias mais frequentemente isoladas, cultivadas em meio sólido, com a identificação dos perfis específicos das espécies, obtidas a partir de colônias isoladas.(BALADA-LLASAT; KAMBOJ; PANCHOLI, 2013; KEHRMANN *et al.*,2016; MAZZEO *et al.*,2006; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ *et al.*,2015).

Estão disponíveis comercialmente três sistemas MALDI-TOF MS para a identificação de bactérias: Maldi Biotyper (Bruker Daltronics, Bremen, Alemanha), Vitek MS (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França), e Andromas MALDI-TOF MS (Andromas, Paris, França). Os bancos de dados diferem entre os sistemas de MALDI-TOF (KEHRMANN *et al.*,2016).

3.2 Identificação Genotípica das MNT

Os métodos convencionais para a identificação de micobactérias são baseados em testes que levam várias semanas para um crescimento adequado, além do que muitas vezes não é possível a identificação exata, podendo levar a resultados ambíguos ou errados. Nas últimas décadas novas metodologias têm sido desenvolvidas utilizando ferramentas de biologia molecular. Estas técnicas são baseadas em PCR e na hibridização de DNA (DEVULDER;PEROUSE DE MONTCLOS;FLANDROIS,2005;ESCOBAR-ESCAMILLA *et al.*,2014; HANCE *et al.*,1989; LEBRUN *et al.*;1992; RUSSO; TORTOLI; MENICHELLA ,2006; SPRINGER *et al.*,1996).

Outras técnicas como o PRA-*hsp65*, envolvem a visualização de padrões dos fragmentos obtidos pelo corte da sequência amplificada por PCR com enzimas de restrição adequadas (TORTOLI,2003).

Existem outros sistemas que permitem identificação de todas as micobactérias a nível de espécie,sendo baseados no sequenciamento dos genes *hsp65*, ITS,16S rRNA, entretanto são limitados aos laboratórios especializados, devido ao alto custo dos equipamentos e também requerem pessoal especializado (JAGIELSKI *et al.*,2016; LOTZ *et al.*,2010).

3.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase)

Nesta metodologia as moléculas de DNA são amplificadas através da reação em cadeia da polimerase ou PCR, (polymerase chain reaction) que é uma técnica que permite a amplificação *in vitro* do DNA, num processo extremamente rápido. É basicamente uma série de reações enzimáticas catalisadas por uma DNA polimerase termoestável, que ocorre em 3 etapas que em conjunto formam um ciclo, o qual se repete um número específico de vezes (EISENSTEIN ,1990).

Os reagentes que frequentemente irão compor a PCR são: dois pequenos iniciadores (primers), sintetizados para serem complementares as sequencias específicas, grande quantidade dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP,dCTP,dGTP,dTTP),a

enzima Taq DNA-polimerase, Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) para permitir a ativação da Taq DNA-polimerase, o Tampão para manter o pH constante e o DNA com a sequência alvo de interesse, são colocados em um tubo de polipropileno (Tubo de PCR). (EISENSTEIN, 1990).

O tubo de PCR é colocado em uma máquina de PCR (Termociclador) que aumenta e diminui a temperatura de acordo com um programa. Os passos seguintes, de aquecimento e resfriamento, acontecem dentro da máquina e são controlados pelo programa (EISENSTEIN, 1990). Assim, o ciclo da PCR engloba a desnaturação, o anelamento e a extensão. A desnaturação consiste na separação da cadeia dupla do DNA em duas cadeias simples através do aumento da temperatura (geralmente superior a $90^\circ C$). O anelamento baseia-se na ligação dos oligonucleotídeos iniciadores ou “primers” à sequência alvo do DNA (hibridizando com a sequência complementar) a ser amplificada. A extensão consiste na polimerização propriamente dita, onde ocorre a incorporação dos nucleotídeos complementares à sequência alvo, utilizando os dNTPs em solução, pela Taq DNA-polimerase. (EISENSTEIN, 1990)

O resultado da reação de amplificação é verificado através da eletroforese dos produtos resultantes em gel de agarose, corado com brometo de etídio ou similar e visualizado em luz ultravioleta através de um equipamento de Fotodocumentação. Para determinar o tamanho dos produtos de amplificação utiliza-se um marcador de peso molecular (DNA Ladder). (EISENSTEIN, 1990)

Uma das vantagens da PCR sobre os métodos convencionais é a rapidez e a simplicidade da técnica permitindo a detecção de uma única molécula de DNA na amostra (EISENSTEIN, 1990; SILVA-PEREIRA, 2003).

A partir dos anos 90, foram descritos diversos ensaios de PCR *in-house*, para a detecção de micobactérias em amostras clínicas, onde cada laboratório usava seu próprio protocolo para extração de DNA e detecção dos produtos amplificados. Os alvos mais comumente usados foram o elemento de inserção IS 6110 e 16S rDNA (IOANNIS et al., 2008; TORTOLI, 2003).

Um dos critérios mais importantes na detecção e identificação de micobactérias por PCR, é a escolha certa das sequências alvo no genoma. Estes alvos devem estar presentes em todas as espécies de micobactérias e ausentes em outros organismos, ou então presentes em única espécie de micobactéria, no caso de diferenciação entre espécies (BATTACHARYA *et al.*, 2003).

3.2.2 O gene 16S rRNA

É o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo denominado 16S rRNA, está presente em todas as espécies bacterianas, e por conter regiões altamente conservadas e variáveis, onde as mutações ocorrem em ritmo lento e constante, é um alvo ideal para caracterização taxonômica (JAGIELSKI *et al.*, 2016; SOINI; MUSSER, 2001).

Assim como a molécula de 16S rRNA é muito conservada, e apresenta mudanças na sequência em determinadas posições, estas possuem significado filogenético, podendo ser específicas para os microrganismos a nível da espécie (DVORSKÁ *et al.*, 2001; LEÃO *et al.*, 2005; NEONAKIS *et al.*, 2008). É constituído por mais do que 1500 pb, mas normalmente os primeiros 500 pb são adequados para a identificação de espécies mais comuns de micobactérias (NEONAKIS, 2008).

3.2.3 O gene *hsp65*

O *hsp65* é uma proteína de choque térmico de 65 kDa, pertencente a família *hsp*. Nas micobactérias, é uma proteína bem conservada que apresenta um número limitado de polimorfismos específicos da espécie, representando um alvo útil para a identificação de espécies geneticamente relacionadas.

As variações na sequência do gene *hsp65* podem ser usadas para a identificação a nível de espécie tanto de micobactérias de crescimento lento como de espécies de crescimento rápido, porque elas exibem mais polimorfismo do que o 16S rDNA (HÄFNER *et al.*, 2004; JAGIELSKI *et al.*, 2016; KWOK *et al.*, 1999; RINGUET *et al.*, 1999; ROTH *et al.*, 1998).

3.2.4 A região ITS

É uma região DNA situada entre o 16S rRNA e o 23S rRNA no cromossomo das bactérias. As sequências espaçadoras podem diferenciar micobactérias de crescimento lento que são idênticas ou estreitamente relacionadas com base nas suas sequências de 16S rDNA, porém a pouca variabilidade destas sequências, fizeram com que elas tivessem pouca utilidade na diferenciação das espécies de micobactérias, embora sejam muito mais variáveis do que o gene *hsp65* para as RGM.

A região que separa estes genes, a região do ITS (*Internal Transcribed Spacer*), por ter uma sequência mais variável, e relativamente conservada dentro da mesma espécie ou um conjunto de espécies indica a sua utilidade potencial na identificação e diferenciação das espécies micobacterianas (HÄFNER *et al.*, 2004; JAGIELSKI *et al.*, 2016; KATOCH *et al.*,

2007; ROTH *et al.*, 1998).

As micobactérias de crescimento lento mostram uma variação elevada na sequência do ITS. Esta variação pode ser um alvo molecular apropriado para o desenvolvimento de sondas para identificação de micobactérias (ROTH *et al.*,1998).

3.3 Sistemas que utilizam Hibridização de ácidos nucleicos

3.3.1 AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA, EUA)

O AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA, EUA), é baseado na tecnologia de sondas de DNA para a identificação de bactérias, onde um número considerável de colónias deve ser utilizada em cada teste e expostas a um processo de lise, utilizando reagentes específicos que estão disponíveis no kit, para a extracção de material genético e um dispositivo emissor de ondas sonoras, chamado sonicador.(JAGIELSKI *et al.*,2016)

Após a extração, realiza-se a hibridação utilizando a sonda que já está marcado com éster de acridina e fixada na superfície interna de um tubo específico no kit. A hibridização é realizada utilizando um termobloco, a uma temperatura que varia entre 59,5 ° C a 61° C.

A leitura e interpretação é realizadas à temperatura ambiente usando um dispositivo conhecido como um luminômetro. A leitura é expressa como unidades relativas de luz (RLU) e interpretado como: 20.000 RLU = negativo; de 20.000 a 29.999 RLU = inconclusivos; acima de 30.000 = positivo (LEBRUN *et al.*,1992; MIDDLETON; CHADWICK; GAYA,1997; SPADA *et al.*,2005).

3.3.2 INNO-Lipa Mycobacteria V2, (Innogenetics, Ghent, Belgium)

É uma metodologia baseada no princípio da hibridização reversa, onde o material de DNA biotínido é hibridizado com sondas específicas imobilizadas como linhas paralelas em uma membrana em forma de tiras. A metodologia inclui uma etapa de PCR, utilizando primers biotínidos, para amplificar a região espaçadora 16S - 23S RNA ribossomal (rRNA) de espécies de Mycobacterium. A identificação é feita com base nas diferenças de nucleótidos da região espaçadora 16S-23S ribossomal(rRNA).

Após a hibridização, é adicionada a estreptavidina marcada com fosfatase alcalina que se liga a qualquer híbrido biotínido formado. A adição de um substrato cromógeno, resulta em um precipitado roxo / marrom nas linhas hibridizadas. O material amplificado usado no INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 INNOGENETICS® detecta o genero Mycobacterium

,seguido das espécies Mycobacterium: Complexo *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum* and *M. ulcerans*, *M. celatum*, Complexo MAIS, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. rofulaceum*, *M. haemophilum*, Complexo *M. chelonae* –*M. abscessus*, Complexo *M. fortuitum* and *M. smegmatis*.

Para a detecção e identificação do gênero Mycobacterium e 16 diferentes espécies de micobactérias podem ser utilizados culturas em meios líquidos e sólidos (JAGIELSKI *et al.*,2016; PADILLA *et al.*,2004; SUFFYS *et al.*,2001; TORTOLI *et al.*,2001).

3.3.3 GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Nehren, Germany)

É um teste comercial, que também utiliza a tecnologia da hibridização reversa em tiras horizontais dos produtos de PCR, para as suas sondas complementares, sendo utilizada para a detecção e identificação simultânea de micobactérias a nível de espécie, obtidas a partir de culturas líquidas ou sólidas.

É composto por dois kits: GenoType Mycobacterium CM (para micobactérias mais comuns) e GenoType Mycobacterium AS (para outras espécies) , com sondas para 14 e 16 espécies, respectivamente.

O método consiste na extração do DNA por ultrassom ,seguida por amplificação por PCR de parte do gene 23S rRNA. A hibridização reversa e detecção ocorrem em uma incubadora com agitação (TwinCubator; Hain). A identificação final é obtida por comparação de padrões da sonda de linha com a folha de avaliação .

A hibridização pode ser realizada com o mesmo produto de PCR nos dois sistemas separadamente, permitindo a detecção e diferenciação do complexo *M. tuberculosis* e 40 espécies de MNT clinicamente relevantes (GITTI *et al.*2006; JAGIELSKI *et al.*,2016; RUSSO; TORTOLI; MENICHELLA;2006).

3.3.4 SpeedOligo (Vircell, Granada, Spain)

O SpeedOligo um teste baseado na PCR, que amplifica a região ITS contida entre os genes da região espaçadora 16S - 23S RNA ribossomal (rRNA) de diferentes espécies micobacterianas, permitindo a identificação posterior por hibridização do produto amplificado com sondas específicas ligadas a ouro coloidal e a um suporte sólido de nitrocelulose em forma de tira. A técnica é realizada em três passos principais:

- 1) Extração de DNA a partir de material cultivado

- 2) Amplificação por PCR do gene alvo e um controle interno
- 3) Hibridização dos produtos de PCR com sondas específicas por meio de uma tira de nitrocelulose com sondas específicas ligadas a ouro coloidal.

Os fragmentos amplificados na PCR reagem com os oligonucleótidos específicos ligados a uma suspensão coloidal de partículas de ouro presentes na parte inferior da tira. O complexo formado pelos produtos de PCR e o ouro coloidal flui através da membrana para encontrar sondas específicas. Nas posições em que elas reagem com o ouro, aparecem como linhas vermelhas.

Ele detecta até 14 diferentes espécies: Complexo *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. interjectum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum* e *M. Xenopi*, representadas por 13 sondas específicas sobre uma faixa que abrange um espectro menor do que outros ensaios com sondas em linha (DE TORO-PEINADO, *et al.*, 2013; JAGIELSKI *et al.*, 2016; RAMIS, *et al.*, 2015).

3.4 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento do gene 16S rDNA é considerado o padrão ouro para a identificação de espécies de Micobacterias (JOÃO *et al.* 2014).

Esta metodologia consiste inicialmente em uma amplificação do DNA por PCR, seguida de sequenciamento destes amplicons, em seqüenciador automático.

A identificação é realizada por comparação da sequência dos nucleotídeos com uma biblioteca de sequências conhecidas disponíveis na internet, sendo o mais utilizado para esse fim, o GenBank (JAGIELSKI *et al.*, 2016; ROTH *et al.*, 1998).

São utilizados para identificação de micobactérias vários genes alvo, porém os alvos mais comuns são o *hsp65*, ITS, o *rpoB* e o 16S rRNA (ADEKAMBI *et al.*, 2003; KATOCH *et al.*, 2007; ROTH *et al.*, 1998; TORTOLI, 2003).

Um sistema de sequenciamento de DNA, disponível comercialmente para uso na rotina de laboratórios de micobacteriologia, tendo como alvo genético o 16S ribossomal, denominado Sistema MicroSeq (Applied Biosystems, CA) oferece a possibilidade de identificar a maioria das micobactérias, mais recentemente descritas. Este sistema foi avaliado por Cloud *et al.* (2002) e Hall *et al.* (2003), apresentando bons resultados.

3.5 PRA- *hsp65* (Restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene)

O PRA é um método diagnóstico capaz de diferenciar as microbactérias, e se baseia na amplificação do fragmento de 440 pb do gene *hsp65* por PCR e análise de restrição do produto amplificado com as enzimas *Bst*II e *HAE* III. Os produtos da digestão (amplicons) pelas duas enzimas, são subsequentemente analisados por electroforese em gel e comparados com padrões conhecidos disponíveis, com a ajuda de um algoritmos ou através de sites próprios na internet: PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>) (BROWN-ELLIOTT *et al.*,2012; TELENTI *et al.*,1993; VERMA *et al.*,2015). (Anexo)

A identificação das micobactérias pode ser realizada de forma rápida e simples pelo PRA, mas identificação errada pode ocorrer devido a semelhanças nos tamanhos das bandas que são essenciais para discriminação entre as espécies (HADIFAR *et al.*,2015). Entretanto a metodologia do PRA-*hsp65* fornece identificação de espécies de micobactérias suficientemente confiáveis,e é largamente utilizada como a metodologia de rotina em laboratórios de referência (CHIMARA *et al.*,2008).

Chimara *et al.*(2008),realizaram um estudo utilizando 434 MNT,identificando as espécies por métodos fenotípicos convencionais e PRA-*hsp65*. O PRA-*hsp65*, identificou 392 espécies (90,3%), sendo significativamente mais preciso do que os métodos fenotípicos.

Em um estudo realizado por Häfner, e colaboradores, (2004), que seqüenciaram o gene 16S rDNA de 126 amostras selecionadas aleatoriamente de uma coleção,o método do PRA-*hsp65* identificou corretamente 120 (95,2%) destas amostras (CHIMARA *et al.*,2008; HÄFNER, *et al.*,2004).

Para validação do método de PRA-*hsp65*, um estudo multicêntrico foi realizado em oito laboratórios da Argentina, Brasil, Colômbia, Chile, Guadalupe e França, onde cada laboratório recebeu 18 isolados provenientes da coleção do Instituto de Medicina Tropical da Bélgica, que corresponderam a duplicatas de cepas: *M. terrae*, *M.scrofulaceum*, *M. flavescens*, *M. triviale*, *M. nonchromogenicum*, *M. chitae*, *M.abscessus*, *M. kansasii*, *M. peregrinum*. A identificação pelo PRA-*hsp65* mostrou que o método é bastante útil na identificação molecular destes patógenos (LEÃO *et al.* 2005).

Estudos recentes outros métodos de PCR-PRA,utilizando outros genes como 16S-23S rRNA, *rpoB* ou outras enzimas de restrição, *Nru*I , *Bam*HI, *Sau*96I , *Cfo*I, demonstraram um alto poder discriminatório para a identificação e tipagem de espécies de micobactérias sendo capaz de identificar 96,6% de todos os isolados (HADIFAR *et al.*,2015; VARMA-BASIL *et al.*,2013). O PRA *hsp65* é uma ferramenta útil para diferenciação das espécies de *Mycobacterium* bem como, para complementar o diagnóstico e também a vigilância

epidemiológica das NTM (ESCOBAR-ESCAMILLA *et al.*,2014).

3.6 PCR multiplex

Atualmente outras metodologias baseadas em métodos moleculares como a PCR multiplex, PCR-hibridização foram avaliadas com sucesso para a identificação de MNT e CMTB (CHIA, *et al.*,2012; TORTOLI, *et al.*,2003).

Esta técnica permite a distinção entre o Complexo *M.tuberculosis* e outras MNT, amplificando dois ou três diferentes alvos sendo útil no diagnóstico de doenças micobacterianas (BHATTACHARY *et al.*, 2003; CHIA *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2006; POROCA *et al.*, 2009).

É uma técnica molecular amplamente empregada na identificação e diferenciação microbiana sendo capaz de fornecer uma identidade simples de determinadas bactérias quando comparadas com os perfis de padrões de cepas de referência, necessitando a utilização de mais de um conjunto de oligonucleotídeos alvo específico para a amostra analisada (CORSETTI, 2007).

É uma ferramenta rápida e precisa, onde a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA alvo reduz o número de reações necessárias para testar uma amostra para diferentes alvos, ajudando na economia de tempo e custos com reagentes, tornando os sistemas de multiplex especialmente útil quando um grande número de amostras tem que ser analisadas,para identificação molecular de espécies bacterianas (CORSETTI,2007;HERNANDEZ *et al.*,2003; SINT; RASO TRAUGOTT,2012; TANAKA II *et al.*, 2003;).

Em comparação com a PCR tradicional, em que apenas um par de iniciadores está presente em uma reação, na PCR multiplex são utilizados mais de um par de primers. Portanto alguns fatores adicionais devem ser considerados, como os amplicons que são gerados devem mostrar diferenças de tamanho capazes de permitirem diferenciar inequivocamente os fragmentos através da corrida de eletroforese em gel de agarose, o número de pares de primers que podem ser incluídos no sistema multiplex deve ser limitado para evitar o risco de reação cruzada entre eles e a amplificação dos fragmentos de DNA indesejáveis. As concentrações dos primers têm de ser ajustadas para assegurar a amplificação de todos os fragmentos do DNA alvo. Portanto é um processo que precisa ser otimizado cuidadosamente para se alcançar resultados significativos (SINT, RASO ; TRAUGOTT,2012).

4 JUSTIFICATIVA

O isolamento de diferentes espécies de MNT em laboratórios, em aumentado progressivamente a sua importância devido a sua capacidade em produzir doença, como tem sido amplamente descrita na literatura. No Brasil as espécies de MNT mais isoladas são as que frequentemente causam doença pulmonar e ganglionar, infecções hospitalares, surtos e pseudo-surtos importantes.

Diversos estudos descrevem isolamentos de cepas de MNT em amostras clínicas pulmonares e extrapulmonares de pacientes com suspeita de tuberculose. A dificuldade no diagnóstico é devida as características clínicas das doenças pulmonares causadas por MNT serem frequentemente similares às da tuberculose.

A identificação das micobactérias é rotineiramente realizada através de métodos baseados na avaliação das características das culturas e na realização de testes bioquímicos, que são considerados trabalhosos e muito demorados.

Sendo a rápida identificação um fator importante para se fornecer ao doente o tratamento adequado, uma vez que as diferentes espécies de micobactérias envolvem diferentes riscos e regimes terapêuticos específicos.

O desenvolvimento de métodos de identificação rápidos, fáceis de executar, com uma boa relação custo-eficácia para serem aplicados na rotina da identificação de micobactérias, em laboratórios, como alternativa aos métodos convencionais e comerciais são necessários.

A PCR multiplex proposta neste estudo é uma ferramenta rápida, que possibilita a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA alvo em uma única reação, resultando em economia de tempo e de reagentes, além do que permite distinção entre o Complexo *M.tuberculosis* e MNT no diagnóstico de doenças micobacterianas.

5 OBJETIVO GERAL

Avaliar uma metodologia baseada no sistema de PCR multiplex para a identificação das micobactérias de interesse médico mais frequentemente isoladas, previamente identificadas pela metodologia do PRA-*hsp65*.

5.1 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de um sistema PCR multiplex utilizando conjuntos de primers alvo específicos para a diferenciação de MNT mais frequentemente isoladas de importância médica das micobactérias do Complexo *M. tuberculosis*.
- Determinar o padrão molecular de identificação de micobactérias através do sistema da PCR multiplex utilizando culturas de cepas de micobactérias armazenadas no Laboratório do Centro de Referência Professor Hélio Fraga, comparado com as cepas de referência de micobactérias (*ATCC*).
- Comparar o resultado do método da PCR multiplex com os obtidos previamente com a metodologia do PRA-*hsp65* no diagnóstico molecular diferencial do Complexo *M. tuberculosis* e as MNT de interesse médico mais frequentemente isoladas.

6 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo de validação de método diagnóstico fase III, caracterizada por SACKETT e HAYNES (2002) e HAYNES e JOHN (2009), que consiste na análise estatística da concordância dos resultados dos novos testes com resultados de testes consagrados pela literatura em amostras de campo.

O estudo permitiu comparar a concordância dos resultados do teste proposto “PCR multiplex” com os resultados do teste do PRA-*hsp65*, na identificação de espécies de micobactérias, utilizando a medida Kappa que é baseada no número de resultados concordantes entre os testes.

No presente estudo, foi avaliado um sistema da PCR multiplex para a detecção de espécies de micobactérias não causadoras de tuberculose de importância médica mais frequentemente isoladas e diferencia-las das do Complexo *M. tuberculosis*. O procedimento utilizado foi o descrito por Chia *et al.* (2012) utilizando DNA de culturas armazenadas no Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Outras Micobacterioses do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSP/Fiocruz no período de 2014 a 2015, previamente identificadas através do PRA-*hsp65* (PCR com Análise de Enzima de Restrição).

6.1 Amostras do Estudo

Foram utilizadas cepas de micobactérias isoladas de culturas armazenadas no Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Outras Micobacterioses do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSP/Fiocruz no período de 2014 a 2015, previamente identificadas através do PRA-*hsp65* (PCR com Análise de Enzima de Restrição), além de cepas de referência que correspondem às espécies mais frequentemente isoladas de interesse clínico: Complexo *M. avium-intracellulare*, *M.kansasii*, Grupo *M. chelonae-M.abscessus*, e Grupo *M. fortuitum*, além de uma cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis*, obtidas na instituição internacional *American Type Culture Collection* (ATCC).

6.2 Cálculo Amostral

Foram considerados os seguintes dados para a análise do cálculo amostral, realizado no programa EPITABLE do software Epi-Info 6.04:

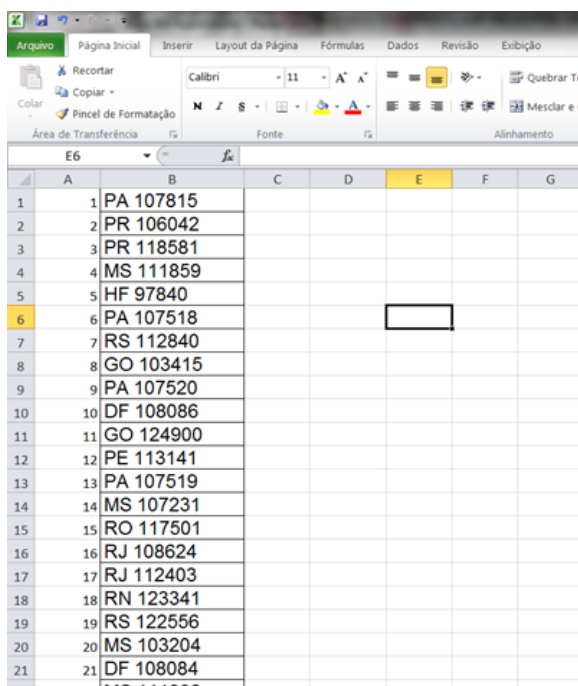
- Erro: $\alpha = 5\%$;

- Intervalo de confiança de 95%;
- Sensibilidade estimada de 90%.

Dessa forma, foi calculada uma amostragem de 100 cepas de cada espécie de Micobactérias a serem analisadas. As amostras foram escolhidas aleatoriamente, através de um Plano Amostral Aleatório Simples, utilizando o software Excell®.

6.3 Seleção das Amostras

Foi criada uma Planilha do Excel® com todas as amostras de MNT a serem testadas, que estão estocadas no Laboratório de Tuberculose e Micobacteriose do CRPHF. Na coluna A, foi colocada uma numeração sequencial do primeiro até o último registro (referente a última amostra) na coluna B, foram colocados os registros (número de cada amostra), pareados com a numeração sequencial da coluna A, para servir de referência. (Figura 1). As amostras foram escolhidas aleatoriamente, utilizando um aplicativo encontrado no Link: <http://www.winepi.net/winepi2/f204.php> . Após o sorteio dos números as amostras foram identificadas utilizando a planilha inicial, correlacionando a coluna A com a B.



	A	B	C	D	E	F	G
1	1	PA 107815					
2	2	PR 106042					
3	3	PR 118581					
4	4	MS 111859					
5	5	HF 97840					
6	6	PA 107518					
7	7	RS 112840					
8	8	GO 103415					
9	9	PA 107520					
10	10	DF 108086					
11	11	GO 124900					
12	12	PE 113141					
13	13	PA 107519					
14	14	MS 107231					
15	15	RO 117501					
16	16	RJ 108624					
17	17	RJ 112403					
18	18	RN 123341					
19	19	RS 122556					
20	20	MS 103204					
21	21	DF 108084					

Figura 1. Planilha do Excel® para servir de referência na geração de números Aleatórios

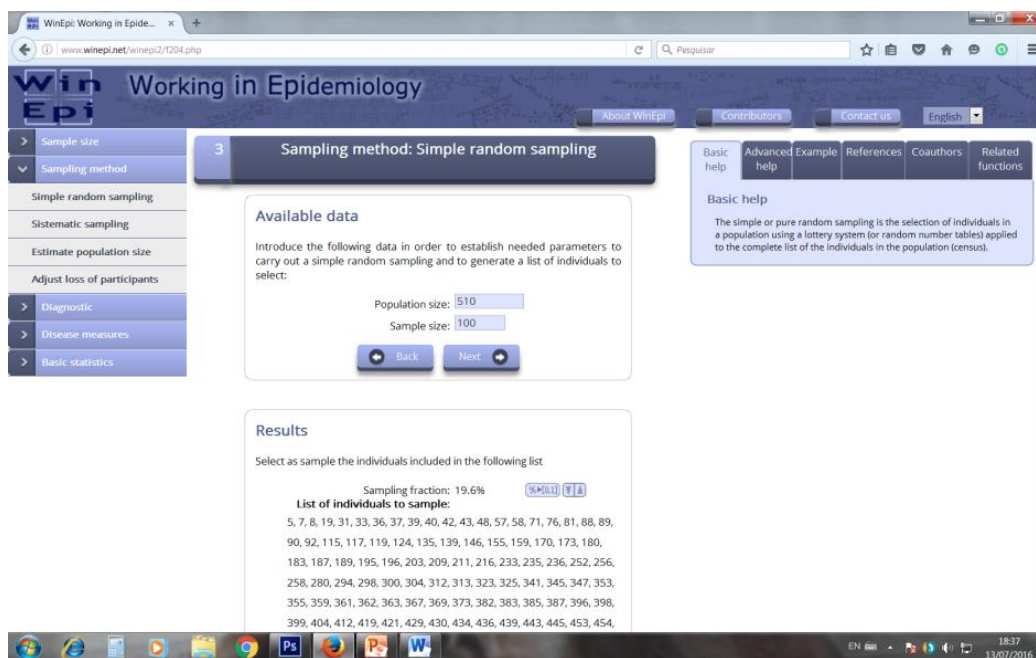


Figura 2- Seleção das amostras usando um sistema de sorteio de números aleatórios aplicado à lista completa amostras estocadas .Fonte: <http://www.winepi.net/winepi2/f204.php>

6.4 Critérios de Inclusão

Foram incluídas todas as amostras com crescimento após o repique (inoculação) em meio de cultura de Löwenstein-Jensen (L-J) de cepas do Complexo *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, Grupo *M. chelonae-M. abscessus*, Grupo *M. fortuitum* e de *Mycobacterium tuberculosis*,

6.5 Critérios de Exclusão

Foram excluídas deste estudo todas as amostras (Culturas) que após o repique (inoculação) no meio de cultura de Löwenstein-Jensen (L-J) não apresentarem crescimento bacteriano.

6.6 Procedimentos de Coleta de Dados

Os dados relativos aos resultados obtidos através da metodologia do PRA-*hsp65* (PCR com Análise de Enzima de Restrição) foram coletados de uma planilha de controle de armazenamento das amostras identificadas no Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Outras Micobacterioses do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSP/Fiocruz, onde constam campos tais como Identificação da Amostra, a Caixa onde

ela se encontra, sua posição dentro desta caixa, data da identificação, a espécie identificada e a metodologia empregada na identificação, e foram comparados na análise dos resultados obtidos com a PCR multiplex, registrados em uma Planilha do Excell® .(Figura 3)

AMOSTRAS	CAIXA	POSIÇÃO	ESPÉCIE IDENTIFICADA	TIPO	MÉTODO	DATA	OBS:
PE42806	68	21	M. abscessus subsp. bolletii		PRA	10/07/2014	
CE41631	68	22	M. bovis BCG		PRA	10/07/2014	
MT45925	68	27	M. abscessus subsp. bolletii		PRA	10/07/2014	
PE42806	68	30	M. abscessus subsp. bolletii		PRA	10/07/2014	
CE41631	68	31	M. bovis BCG		PRA	10/07/2014	
MT45925	68	36	M. abscessus subsp. bolletii		PRA	10/07/2014	
RS46010	68	39	M. abscessus subsp. abscessus		PRA	10/07/2014	
RS46011	68	40	M. abscessus subsp. abscessus		PRA	10/07/2014	
CE47023	68	43	M. abscessus subsp. bolletii		PRA	10/07/2014	
MG46860	68	44	M. sherrisii		PRA	10/07/2014	
CE47024	68	45	M. abscessus subsp. bolletii		PRA	10/07/2014	

Figura 3. Planilha de controle de armazenamento das amostras identificadas no Laboratório de Referência Nacional em Tuberculose e Outras Micobacterioses do Centro de Referência Professor Hélio Fraga/ENSP/Fiocruz

7 PLANO DE ANÁLISE

7.1 Análise Estatística

Foi realizada uma análise estatística utilizando o aplicativo WinEpiscope 2.0. (TRUSFIELD *et al.*,2001) para avaliar grau de concordância entre os diferentes testes utilizando a medida Kappa que é baseada no número de resultados concordantes entre os testes. O Kappa mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. Esta medida de concordância tem como valor máximo o 1, onde este valor 1 representa total concordância e os valores próximos e até abaixo de 0, indicam nenhuma concordância, ou a concordância foi exatamente a esperada pelo acaso.

A interpretação do Kappa foi realizada da seguinte forma: se menor que 0, não há concordância, entre 0 e 0,2 concordância insignificante, entre 0,21 e 0,4, razoável, entre 0,41 e 0,6, moderado, entre 0,61 e 0,8, substancial e entre 0,81 e 1 quase perfeito. Um eventual valor de Kappa menor que zero, negativo, sugere que a concordância encontrada foi menor do que aquela esperada por acaso. Sugere, portanto, discordância, mas seu valor não tem intensidade de discordância.

8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho não necessitou de apreciação em comitês de ética uma vez que objetivo é o desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico rápido de micobactérias em amostras de *Mycobacterium tuberculosis* e Micobactérias não causadoras de Tuberculose, utilizando para isto cepas de bactérias armazenadas no Laboratório de Referência Nacional de Tuberculose e Micobacterioses (CRPHF/ENSP/FIOCRUZ). Desta forma, por não utilizar seres humanos em nenhuma dimensão, este trabalho não apresenta os requisitos para apreciação em Comitê de Ética em Pesquisa (Conselho Nacional de Saúde; Resolução N° 466, de 12 de Dezembro de 2012 e Carta Circular n° 004/2016-CEP/ENSP de 18 de Abril de 2016). Além disso, por não envolver a utilização de vertebrados (apenas bactérias), este trabalho não é aplicável para apreciação junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal; Orientação Técnica N° 3, de 22 de Outubro de 2013).

9 MATERIAS E MÉTODOS

9.1 Cultivo Micobacteriano

Foram repicadas (semeadas) 510 amostras de micobactérias previamente selecionadas em meio sólido de Löwenstein-Jensen (LJ-Difco, São Paulo, Brasil) e incubadas a 35-37°C, das quais 474 apresentaram crescimento, sendo 100 do Complexo *M. avium*, 100 do Complexo *M. tuberculosis*, 100 do Grupo *M. chelonae-abscessus*, 100 de *M. kansasii* e apenas 74 do Grupo *M. fortuitum* (só foram recuperadas apenas 74 amostras desta espécie no período estudado).

9.2 Extração do DNA Genômico

A extração de DNA das cepas de referência e das amostras selecionadas foi realizada a partir dos diferentes isolados de micobactérias após o seu crescimento em meio de cultura sólido (Lowenstein-Jensen).

O protocolo *in house* de extração de DNA utilizado neste trabalho foi desenvolvido em nosso laboratório, descrito por Campos *et al.* (2012). Brevemente, uma alça cheia de bactérias cultivadas em meio de Lowenstein-Jensen foi misturada em 100 µL de pérolas de vidro lavadas com ácido com um diâmetro de 106µm em 300 µL de Triton X-100 1%. A mistura foi agitada vigorosamente num agitador Vortex durante 1 minuto e incubada à temperatura ambiente durante 8 min. Após esta incubação, 50 µL da mistura foram colocadas em um micro tubo com 100 µL de tampão de lise (quantidades iguais de Chelex 100 a 15%, Tween 20 a 5% e Tris-EDTA). A mistura foi aquecida a 100 °C durante 20 min e agitada vigorosamente num misturador (vórtex) durante 1 minuto, seguido por centrifugação a 13.000 x g durante 8 min. O sobrenadante foi então transferido para um micro tubo e armazenado em freezer a 4 °C.

Todo o processo de cultivo bacteriano e parte da extração do DNA genômico foi realizado em cabine de segurança biológica classe II B2, em ambiente de Nível de Biossegurança 3, no Laboratório de Referência Nacional do CRPHF.

10 PCR MULTIPLEX

As moléculas de DNA foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase ou PCR (SINT; RASO; TRAUGOTT,2012).

A PCR multiplex foi realizada a partir de 2 conjuntos de “primers” (iniciadores) independentes, desenhados especificamente para identificar micobactérias de crescimento lento e micobactérias de crescimento rápido, clinicamente importantes e mais frequentemente isoladas (CHIA *et. al.* , 2012).

Foram utilizados 6 pares de iniciadores para identificar 5 espécies mais frequentemente isoladas. Para a detecção de micobactérias de crescimento lento foram 4 pares de iniciadores, para as de crescimento rápido 2 pares (CHIA *et. al.* , 2012; KLEMEN *et al.*, 1998; PARK *et al.*,2000).

O primeiro par de oligonucleotídeos é específico para a identificação do Complexo *M.tuberculosis*, cujo alvo é o ITS 1, que produz um produto de PCR com 119 pb (CHIA *et al* 2012; PARK *et al.*,2000). (Tabela 2)

Tabela2- Características do primeiro par de primers utilizados na PCR multiplex

Espécie Alvo	Primers	Sequencia (5' a 3')	Alvo	Produtos da PCR (pb)
Complexo <i>M.tuberculosis</i>	TBF	GTGGGGCGTAGGCCGTGA	ITS	119
	TBR	ACCTGGAACAAGTCCGAGTG		

O segundo par de primers é derivado da Clonagem de uma sonda de DNA específica, isolada de um fragmento do plasmídeo p6123, para a identificação do *Mycobacterium kansasii*, incluindo as subespécies genéticas e o produto de PCR produzido tem 286 pb (CHIA *et al* 2012; KLEMEN *et al.*, 1998; PARK *et al.*,2000). (Tabela3).

Tabela 3- Características do segundo par de primers utilizados na PCR multiplex

Espécie Alvo	Primers	Sequencia (5' a 3')	Alvo	Produtos da PCR (pb)
<i>M.kansasii</i>	MKF	TCGGGCGCCCACCAGGAAT	DNA	286
	MKR	CGGCCCCGGACTTCTTTCGT		

Na identificação das espécies do Complexo *M. avium* (MAC), os primers utilizados tem como alvo o ITS1, cujo produto produz uma banda de 145 pb, (CHIA *et al* 2012; PARK *et al.*,2000) (Tabela 4).

Tabela 4- Características do terceiro par de primers utilizados na PCR multiplex

Espécie Alvo	Primers	Sequencia (5' a 3')	Alvo	Produtos da PCR (pb)
Complexo <i>M. avium</i>	MACF	GAAATTACACATTTTCGATGAAC	ITS	145
	MACR	CGACAACAAGCTAAGCCAGA		

Também foi utilizado um par de iniciadores (primers) para a detecção de um fragmento do gene que codifica o antígeno ESAT-6 (early secretory antigen), específico para o Complexo *M. tuberculosis* e também presente no *M. Kansasii*, produzindo um produto de 217 pb (ARENDA *et al.*,2005; CHIA *et al.* 2012; PARK *et al.*,2000). (Tabela 5)

Tabela 5- Características do quarto par de primers utilizados na PCR multiplex

Espécie Alvo	Primers	Sequencia (5' a 3')	Alvo	Produtos da PCR (pb)
CMTB/ <i>M. kansasii</i>	ESAT-F	GATCCCATGACAGAGCAGCAGT	ESAT-6	217
	ESAT-R	TCTGCAGCGCGTTGTTTCAGCT		

CMTB:Complexo *M. tuberculosis*

Para a identificação das micobactérias de crescimento rápido foram utilizados 2 pares de primers. O primeiro par de oligonucleotídeos tem como alvo o gene *hsp65*, para identificação das espécies do Grupo *M. fortuitum*, que produz um produto de PCR com 204 pb (CHIA *et al.* 2012; PARK *et al.*,2000). (Tabela6)

Tabela 6- Características dos primers para identificação do Grupo *M. fortuitum*

Espécie Alvo	Primers	Sequencia (5' a 3')	Alvo	Produtos da PCR (pb)
Grupo <i>M. fortuitum</i>	MFOR-F	GCTGAGCTCGTCAAAGAGGTC	<i>hsp65</i>	204
	MFOR-R	CACCTCCTTGGCGGACTTCAGG		

A identificação do Grupo *M. chelonae-abscessus* é realizada pelo segundo par de primers, que produz um produto de PCR com 97pb, cujo alvo é o ITS1 (CHIA *et al.* 2012;PARK *et al.*,2000). (Tabela7).

Tabela 7- Características dos primers para identificação do Grupo *M. chelonae- abscessus*

Espécie Alvo	Primers	Sequencia (5' a 3')	Alvo	Produtos da PCR (pb)
Grupo <i>M. chelonae-abscessus</i>	CHEF	TGGTTACTCGCTTGGTGAATAT	ITS	97
	CHER	CCAGCGTTTCAATTCTATTGA		

10.1 Amplificação dos Fragmentos Específicos Pela PCR Multiplex

Foram realizadas duas reações PCR multiplex: para identificar as SGM, os quatro pares de oligonucleotídeos descritos anteriormente foram utilizados em uma única reação com uma mistura contendo água ultrapura, PCR Master Mix 2X (solução de Taq ADN polimerase 2X concentrada, dNTP e todos os componentes necessários para a PCR) , 5 pmol/ μ L de cada iniciador e 2 μ L de DNA, em um volume final de 25 μ L. Para as RGM, utilizou-se os outros dois pares de oligonucleotídeos, em uma mistura reacional semelhante. As misturas de reação foram então preparadas num local separado, onde não ocorreu manipulação de DNA, para evitar possíveis contaminações. Para o controle de qualidade da experiência, cada PCR foi testado com um controle positivo (DNA de micobactérias de Referência da ATCC) e um controle negativo (água ultrapura).

A amplificação do DNA foi realizada no termociclador Biocycler MJ96+e as condições de ciclagem foram: uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos depois 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 min, anelamento dos primers a 60°C (para SGM) e 55°C (para RGM) durante 1 min, e extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C durante 10 min.

O resultado da reação de amplificação foi verificado através da eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich Co., São Paulo, Brasil) a 3%, preparado em 100mL de tampão TBE 1X (tampão tris-borato EDTA) e corados com uma solução de SYBR® Safe, adicionado ao gel.

Cinco microlitros dos produtos da reação foram misturados com 3 μ L do tampão de carregamento (Loading Buffer) para dar cor e aumentar a densidade das amostras. A duração da corrida foi de 50 minutos a 5V/cm. Ao término da corrida eletroforética, as bandas de DNA foram visualizadas sob luz Ultravioleta e digitalizadas no equipamento de fotodocumentação (DNR MiniBis Pro, Kiryat Anavim Jerusalem, Israel).

A análise foi realizada comparando-se os resultados obtidos com os da tabela onde são descritos os tamanhos dos fragmentos dos produtos de amplificação, como descrito por Chia *et.al* (2012). (Tabela 8 e 9)

Tabela 8- Tamanhos esperados dos fragmentos da PCR Multiplex em pb para SGM

Micobactérias de Crescimento Lento	
Micobactérias	Tamanhos dos produtos da PCR Multiplex (pb)
Complexo <i>M.tuberculosis</i>	217, 119
<i>M.kansasii</i>	286, 217

SGM: Micobactérias de Crescimento Lento; pb : pares de bases

Fonte: Chia *et al.*, 2012

Tabela 9- Tamanhos esperados dos fragmentos da PCR Multiplex em pb para RGM

Micobactérias de Crescimento Rápido	
Micobactérias	Tamanhos dos produtos da PCR Multiplex (pb)
Grupo <i>M.chelonae-abscessus</i>	97
Grupo <i>M.fortuitum</i>	204

RGM: Micobactérias de Crescimento Rápido; pb: pares de bases

Fonte: Chia *et al.*, 2012

11 RESULTADOS

11.1 Otimização das Condições da PCR Multiplex

O protocolo de amplificação em que foram executadas as reações de PCR, bem como as condições de ciclagem, foi o definido por chia *et al.* (2012).

A padronização foi realizada com DNA genômico de micobactérias de Referência do Complexo *M. avium-intracellulare*, *M.kansasii*, Grupo *M. chelonae-M.abscessus*, e Grupo *M. Fortuitum*, além de uma cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis*, obtidas na instituição internacional *American Type Culture Colletion (ATCC)*.

Antes de realizar a reação de PCR multiplex, todos os pares de iniciadores foram testados por PCR simples, para verificar se houve a correta amplificação dos fragmentos.

Também foram testadas com os dois conjuntos de iniciadores, tanto com amostras de crescimento lento quanto de crescimento rápido.(figura 4)

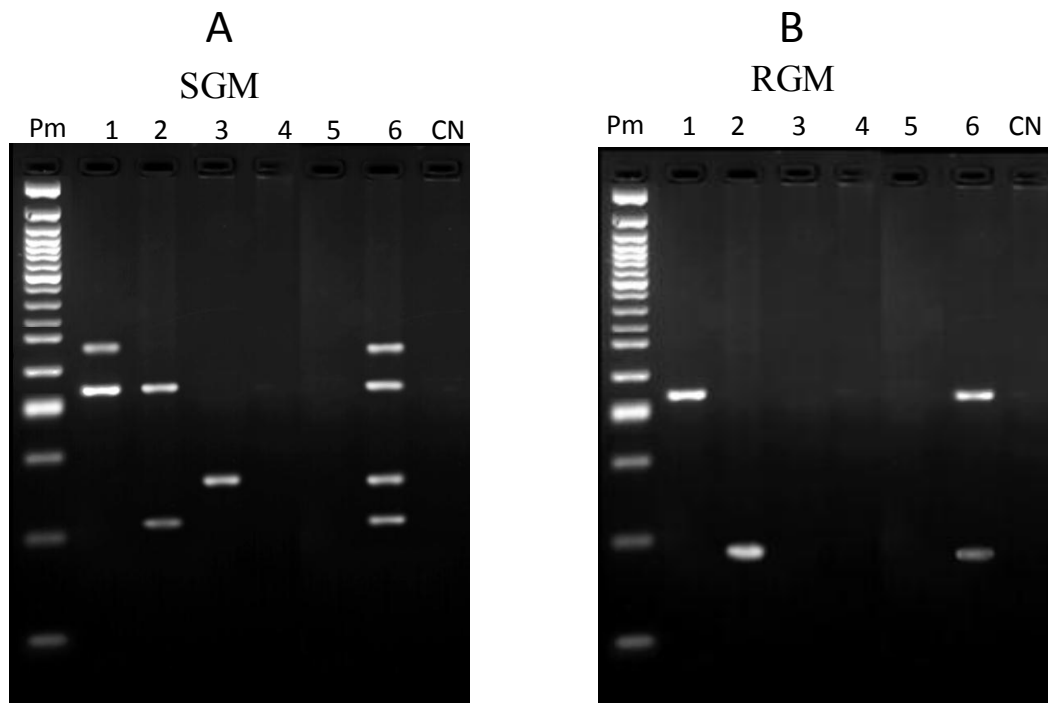


Figura 4. Padrões de bandeamento obtidos na PCR multiplex utilizando amostras de Crescimento Lento (A) e amostras de Crescimento Rápido (B).

Linhas: 1,*M.kansasii*;2,Complexo *M.tuberculosis*;3, Complexo *M.avium*;4,Grupo *M.fortuitum*;5,Grupo *M.chelonae-abscessus*,6,Misturas de todas as amostras;CN,Controle Negativo;Pm,Ladder 50pb (A).

Linhas: 1, Grupo *M.fortuitum*;2, Grupo *M.chelonae-abscessus*;3, *M.kansasii*;4, Complexo *M.tuberculosis*;5, Complexo *M.avium*;6,Misturas de todas as amostras;7,CN;Pm,Ladder 50pb (B).

11.2 Determinação do Padrão Molecular pela PCR Multiplex

Foram analisadas 474 cepas de micobactérias (100 do Complexo *M.avium*, 100 do Complexo *M.tuberculosis*, 100 do Grupo *M.chelonae-abscessus*, 100 de *M.kansasii* e 74 do Grupo *M.fortuitum*) e todas apresentaram padrão de bandas esperado com a amplificação dos seus respectivos alvos, simultaneamente pela PCR multiplex, conforme o obtido no processo de padronização desta técnica, utilizando micobactérias de Referência, não sendo apresentados padrão de bandeamento de amplificação inespecíficos. (Figura 4)

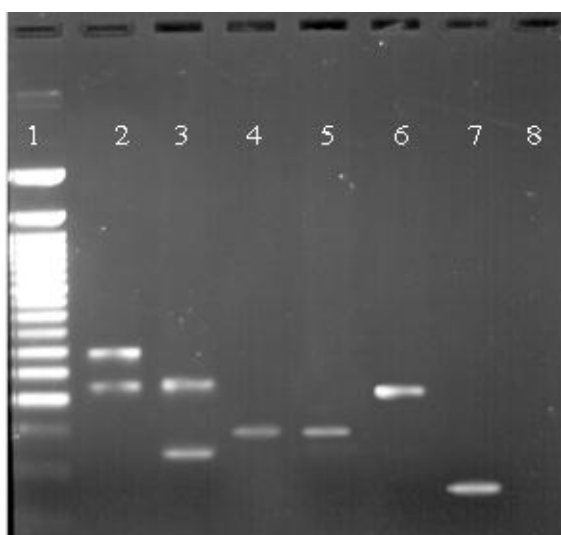


Figura 5. Padrão molecular (padrão de bandas) das Cepas de Referência obtidas pela PCR multiplex. Linha 1; Ladder 50pb; 2, *M.kansasii*; 3, Complexo *M.tuberculosis*; 4, *M.intracellulare*; 5, *M.avium*; 6, Grupo *M.fortuitum*; 7, Grupo *M.chelonae-abscessus*; 8, Controle Negativo

11.3 Comparação dos Resultados da Pcr Multiplex e do Pra-hsp65

O sistema da PCR multiplex utilizado neste estudo, através da combinação dos “primers”, permitiu uma rápida detecção das cepas da espécie *M. kansasii* e do Complexo *M. avium*, (que são espécies de micobactérias que apresentam crescimento lento - SGM) e as do Grupo *M. fortuitum* e Grupo *M. chelonae-abscessus* (micobactérias que apresentam crescimento rápido - RGM), distinguindo-as do Complexo *M.tuberculosis*, apresentando cada uma das espécies, um padrão de amplificação esperado, com os respectivos “primers” espécie-específicos (CHIA *et. al.*, 2012). (Tabela 10)

Tabela 10- Detecção das Espécies estudadas através da PCR multiplex com os primers espécie-específicos

PRA <i>hsp65</i>	Nº de Amostras identificadas pelo PCR multiplex				
	CMTB	MAC	<i>M.kansasii</i>	Grupo <i>M.fortuitum</i>	Grupo <i>M.chelonae-abscessus</i>

	TBR, TRF ESTAF,ESATR	MACF,MACR	MKF,MKR ESATF,ESATR	MFOR-F,MFOR-R	CHEF,CHER
CMTB	100(100%)	0	0	0	0
MAC	0	100(100%)	0	0	0
<i>M.kansasii</i>	0	0	100(100%)	0	0
Grupo <i>M.fortuitum</i>	0	0	0	74(100%)	0
Grupo <i>M.chelonae-abscessus</i>	0	0	0	0	100(100%)
Total	100	100	100	74	100

Nota: **CMTB** – Complexo *M.tuberculosis*; **MAC**- Complexo *M. avium*.

Os resultados deste estudo apresentaram um excelente grau de concordância da PCR multiplex (100% para todas as espécies que foram utilizadas), quando comparado com os resultados previamente obtidos pela técnica do PRA-hsp65, considerado o padrão ouro na identificação de micobactérias. (Tabela 11)

Tabela 11- Concordância da técnica de PCR multiplex utilizando como padrão-ouro o PRA-hsp65 em cepas de micobactérias isoladas de amostras clínicas

PRA-hsp65	PCR Multiplex
<i>M.kansasii</i>	100 (100%)
Complexo <i>M. avium</i>	100 (100%)
Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	100 (100%)
Grupo <i>M. fortuitum</i>	74 (100%)
Grupo <i>M. chelonae-M.abscessus</i>	100 (100%)
Total	474 (100%)

12 DISCUSSÃO

O isolamento de diferentes espécies de MNT em laboratórios tem aumentado de forma progressiva como demonstram vários estudos descritos na literatura (ATS,1997; SHAO Y *et al.*,2015; TORTOLI, 2003; YEW, SOTGIU, MIGLIORI 2010). As espécies mais frequentemente associadas à doença pulmonar por MNT são: *M. kansasii* e *M. avium*. (BARRETO; CAMPOS, 2000). Os casos de infecções pós-cirúrgicas devido à micobactéria de crescimento rápido incluem o *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus subsp. bolleti* (BRASIL, 2011).

Segundo Pedro *et al.* (2008), as características clínicas das doenças pulmonares causadas por MNT são frequentemente similares às da tuberculose o que tem levado a diagnóstico de tuberculose, bem como a um tratamento errôneo. Uma rápida e inequívoca identificação é um fator determinante para se fornecer ao doente o tratamento adequado, com regimes terapêuticos específicos (BARRETO *et al.*, 2000; YAM *et al.*, 2006).

O diagnóstico laboratorial das micobactérias utiliza métodos baseados na avaliação das características das culturas e na realização de testes bioquímicos, que são considerados demorados e dependem do crescimento bacteriano (GARIMA *et al.*,2012; HERNÁNDEZ-TOLOZA *et al.*,2015; KATOCH *et al.*, 2007; LEÃO *et al.*, 2005).

O sequenciamento de DNA é considerado o método padrão ouro para a identificação da espécie de micobactéria (TORTOLI, 2003; NEONAKIS *et al.*,2008). O 16S rRNA é universalmente utilizado para a identificação de bactérias. No entanto, tem várias limitações e o seu custo ainda é muito alto. A análise das sequências não permite distinguir entre as seguintes espécies de MNT: *M. abscessus* / *M. chelonae*; *M. avium* / *M. intracellulare*; *M. peregrinum* / *M. septicum*; *M. kansasii* / *M. gastri* e *M. marinum* / *M. ulcerans*. Esta diferenciação se torna difícil de conseguir na análise, devido à pequena variação nas seqüências (JOAO *et al.*,2014).

Os métodos que incluem a PCR em tempo real, sequenciamento de DNA, são de custo elevado não sendo acessível aos Laboratórios Clínicos na maioria dos países em desenvolvimento. Algumas metodologias baseadas em hibridização reversa disponíveis comercialmente, como INNO-LiPA Micobactérias (Innogenetics, Gent, Bélgica), e Genotyping Micobacterias CM e AS (Hain Diagnostika, Nehren, Alemanha) também são métodos rápidos e confiáveis para a identificação de espécies de micobactérias. No entanto, os preços destes 2 kits são ainda muito caros para uso na rotina laboratorial (IOANNIS *et al.*,2008; RAMIS *et al.*2015).

O PRA-hsp65, tem sido largamente utilizado como metodologia de rotina em laboratórios de referência e é suficientemente confiável para fornecer identificação de espécies de micobactérias. (CHIMARA *et al.*,2008).

Para determinar se um método proposto é capaz de produzir resultados corretos, ele deve ser comparado com os produzidos por um teste de referência, que deve ser o mais confiável método de diagnóstico disponível.(MATTOCKS *et al.*, 2010). Testes em avaliação devem ser comparados com uma referência (padrão ouro), sempre que for possível (BANOO, *et al.*2010), entretanto métodos reconhecidos internacionalmente podem ser utilizados como referência (FREITAS *et al.*, 2006), dessa forma, utilizamos, neste trabalho, a metodologia do PRA-hsp65, como referência, para comparação com os resultados da PCR Multiplex.

A PCR multiplex promove a amplificação de diferentes alvos espécie-específicos simultaneamente na mesma reação tendo a capacidade de não apenas dizer que a cepa identificada pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mas diferenciar as espécies de MNT, além de apresentar como vantagens a redução do tempo de liberação do resultado. (BHATTACHARY *et al.*,2003; ;CHIA *et al.*,2012;KIM *et al.*, 2004; POROCA *et al.*, 2009)

Neste estudo foram comparados dois métodos moleculares para a identificação de MNT. Um deles baseado na análise de restrição enzimática pós-amplificação do gene *hsp65*(PRA), e o outro uma PCR multiplex. Foram testadas 474 amostras de micobacterias, sendo 100 do Complexo *M.avium*,100 *M.kansasii*, 100 *M.tuberculosis*,100 do Grupo *M.chelonae-abscessus* e 74 do Grupo *M. fortuitum*. O resultado foi uma concordância de 100% entre os métodos.

Bensi *et al.* (2013) avaliaram 476 isolados por PCR multiplex e os resultados da identificação das espécies, mostrou uma concordância de 100% com os do PRA, utilizado como padrão-ouro. Em outro estudo, Lima (2010), comparando resultados obtidos pela PCR multiplex com a técnica do PRA- hsp65 ,também verificou que houve concordância em 100% dos resultados. Em um estudo realizado na Colômbia, um total de 100 amostras foram analisadas de forma independente, através de cada metodologia. O PRA foi capaz de identificar 83 amostras como Complexo *M. tuberculosis*, das quais 82 foram concordantes com os resultados da PCR multiplex. Das 17 outras restantes 13 eram MNT e 4 os resultados foram inconclusivos. O total dos resultados obtidos pelas duas metodologias mostrou uma concordância de 100% (HERNÁNDEZ-TOLOZA *et al.*,2016).

Em Taiwan, Chia *et al.* (2012), desenvolveram e validaram a metodologia que serviu de base para este estudo. Como a maioria dos estudos avaliam sistemas baseados na PCR multiplex para identificação e diferenciação de micobactérias utilizam cepas isoladas em meio

de cultura, eles procuraram identificar as espécies diretamente de espécimes biológicos. No entanto na otimização do sistema utilizando amostras de referência da ATCC, os padrões de bandeamento foram idênticos aos encontrados nas espécies analisadas neste estudo.

Tanto o estudo conduzido na Colômbia como o de Taiwan mostraram que os resultados deste estudo, apresentaram uma grande similaridade com os resultados obtidos por eles.

A PCR multiplex tem algumas vantagens: em primeiro lugar, o tempo para a identificação das espécies é muito mais curto, aproximadamente 4 h, em relação a 1 dia de trabalho, requeridos para os resultados do PRA *hsp65*. Enquanto que para o PRA *hsp65*, são necessárias uma PCR seguida de digestão com enzimas de restrição, a PCR multiplex, requer apenas uma única reação de PCR com vários primers em uma única mistura reacional. Portanto o custo necessário para cada uma das reações é mais baixo para a PCR multiplex, uma vez que não há gasto com a aquisição de enzimas. A interpretação da posição das bandas geradas pelas diferentes enzimas de restrição no PRA *hsp65* é uma tarefa delicada, que sofre influência de diversos fatores tais como a qualidade das imagens do gel, as condições de execução da eletroforese, onde o tempo de execução mais curto do que o recomendado pode apresentar bandas não tão bem separadas, além de uma interpretação subjetiva que pode acarretar em uma interpretação errada. Outra desvantagem é que o PRA *hsp65*, necessita da utilização de um banco de dados disponível na internet para a análise e interpretação de seus resultados. O PCR multiplex tem a análise das bandas amplificadas, bem mais simples de interpretar.

A metodologia da PCR multiplex utilizada neste estudo, apresentou um grau de concordância excelente de 100% (Kappa = 1) para todas as espécies que foram utilizadas, quando comparado com os resultados previamente obtidos pela técnica do PRA-*hsp65*, sendo capaz de identificar as micobactérias de importância médica mais frequentemente isoladas, além de diferencia-las do Complexo *M. tuberculosis*.

Com base neste estudo esta metodologia poderia ser incorporada no diagnóstico de rotina, conforme o fluxograma abaixo. (figura 6)

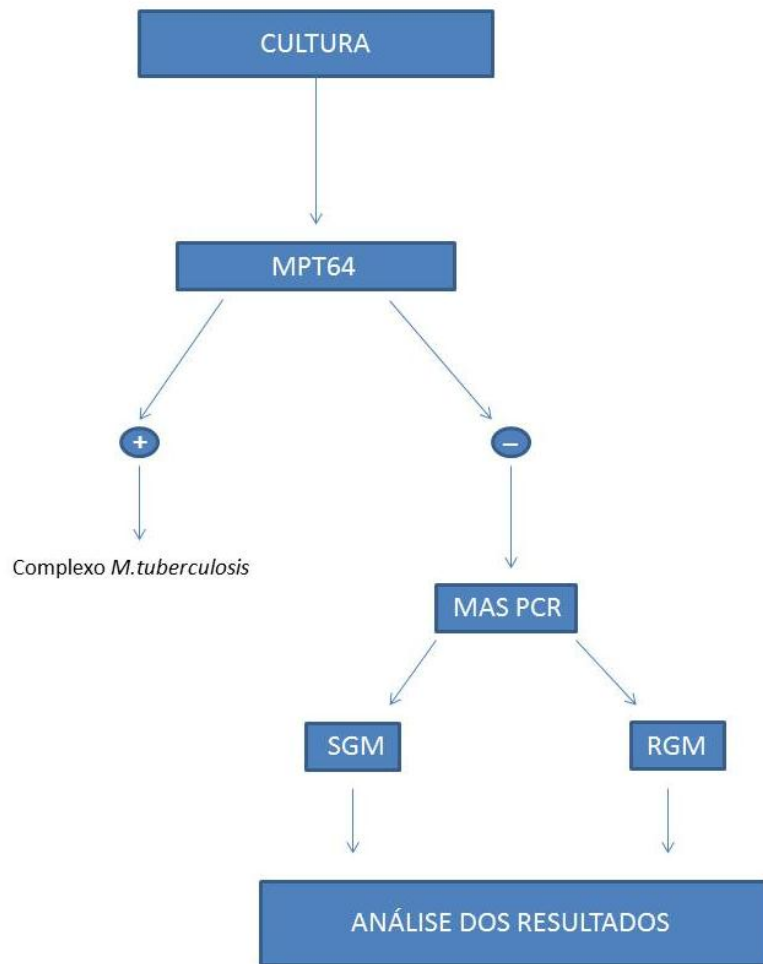


Figura 6. Fluxograma sugerido para ser incorporada no diagnóstico de rotina

13 CONCLUSÃO

A concordância obtida foi de 100% ($Kappa = 1$), entre os métodos comparados entre todas as amostras de diferentes espécies testadas, uma vez que todas as cepas testadas apresentaram o mesmo padrão de bandas previamente relatado em estudos anteriores.

A metodologia da PCR multiplex mostrou ser de realização rápida, fácil e de simples interpretação.

O custo necessário para a realização da PCR multiplex é mais baixo do que o do PRA-hsp65, uma metodologia amplamente utilizada na identificação de micobactérias, e menor ainda quando comparada com outras metodologias, como a PCR em tempo real e o sequenciamento de DNA. Estas últimas, são de custo muito elevado, não sendo acessível à maioria dos Laboratórios Clínicos dos países em desenvolvimento.

A PCR multiplex mostrou ser uma ferramenta importante no diagnóstico diferencial da tuberculose das infecções causadas por MNT, além de identificar algumas espécies de interesse médico.

REFERÊNCIAS

ADÉKAMBI, T., COLSON, P. & DRANCOURT, M. RpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, 41, p. 5699–5708, 2003.

ADÉKAMBI, T. & DRANCOURT, M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p. 2095–2105, 2004.

AL HOUQANI M, *et al.*, Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario in 2007. **Canadian Respiratory Journal**, v.18, p. 19–24, 2011.

AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS). Diagnosis and treatment of disease Caused by nontuberculous mycobacteria. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v.156, p.1-25, 1997.

ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 47, p. 219–225, 1975.

AREND, S. M. *et al.* ESAT - 6 and CFP - 10 in Clinical versus Environmental Isolates of *Mycobacterium kansasii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 8, p. 1301–1310, 2005.

BAINOMUGISA A. *et al.* Use of real time polymerase chain reaction for detection of *M. tuberculosis*, *M. avium* and *M. kansasii* from clinical specimens. **BioMed Central Infectious Diseases**, v.15, p. 181, 2015.

BALADA-LLASAT JM, KAMBOJ K, PANCHOLI P. Identification of *Mycobacterium* from Solid and Liquid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v.51, p. 2875–2879, 2013.

BANOO S, *et al.* Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, s17–29, 2010.

BARRETO, A. M. W. CAMPOS, C.E.D. Micobactérias “não tuberculosas” no Brasil. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 8, n. 1, p. 23–32, 2000.

BARRETO, A., CALDAS, P., CAMPOS, C., MARTINS, F. Diagnóstico laboratorial. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, 5, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/9211>>. Acesso em: 15 Set. 2016

BASTOS RAMIS, I., *et al.* Evaluation of the Speed-oligo Mycobacteria assay for the identification of nontuberculous mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 283-287, 2015.

BENSI, E.P., PANUNTO, P.C., RAMOS M de, C. Incidence of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, differentiated by multiplex PCR, in clinical specimens of a large general hospital. **Clinics**, v. 68, p. 179–184, 2013.

BHATTACHARYA A. *et al.* Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, p. 150-157, 2003.

BONAITI G., *et al.*, Nontuberculous Mycobacteria in Noncystic Fibrosis Bronchiectasis. **BioMed Research International**, p. 197950, 2015

BRASIL/MS/ AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Relatório descrito de investigação de casos de infecção por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009**; Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL/ MS/ CENTRO DE REFERENCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3ª ed., Rio de Janeiro, 2005.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota Técnica Conjunta nº01/2009 SVS/MS e ANVISA. Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de notificações diagnósticos clínico, microbiológico e tratamento**, 2009

BRAUN, E. *et al.* Epidemiology and clinical significance of non-tuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v.17, n.1, p.96-99, 2013.

BRYANT, J. M. *et al.*, “Whole-Genome Sequencing to Identify Transmission of *Mycobacterium abscessus* between Patients with Cystic Fibrosis: A Retrospective Cohort Study.” **Lancet** 381.9877, p. 1551–1560, 2013.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic

nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 716–746, 2002.

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WASER, R. A.; WALLACE, R. J. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. v.25, n.3, p.545-582, 2012.

BRUNELLO, F. *et al.*. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39 n.8, p. 2799-2806, 2001.

BUHLER, V.B.; POLLACK, A. Human infections with acid-fast organisms: report of two cases with pathologic findings. **American Journal of Clinical Pathology**. v.23, n.4, p. 363-374, 1953.

BUTLER WR, GUTHERTZ LS. Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of *Mycobacterium* Species. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, n.4, p. 704-726, 2001.

CADMUS, S. I., *et al.* “Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Tuberculosis Suspects in Ibadan, Nigeria.” **Journal of Pathogens**. V.2016, 6547363.

CAMPOS, C.E.D. *et al.* Prevalência de micobactérias "não tuberculosas" em pacientes de ambulatório, com baciloscopia positiva, no período de 1995 a 1996, no Brasil. **XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Rio de Janeiro, 1997

CAMPOS, C. E. D. *et al.* First Isolation of *Mycobacterium kyorinense* from Clinical Specimens in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2477–2478, 2012.

CAYROU, C. *et al.*, Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. **Microbiology**, v.156, p. 687–694, 2010.

CHIA J. *et al.* Direct identification of mycobacteria from smear-positive sputum samples using an improved multiplex polymerase chain reaction assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.72, p. 340–349, 2012.

CHEN, C.Y. *et al.* Mycobacterial infections in adult patients with hematological malignancy. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease**. v.31, n.6, p.1059-1066, 2012.

CHIMARA E. *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. **BioMed Central Microbiology**, v.8,n.1, p. 1-12, 2008.

CLOUD, J. L., *et al.* Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40: p. 400-406, 2002.

CORSETTI A, SETTANNI L, VALMORRI S, MASTRANGELO M, SUZZI G. Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. **Food Microbiology**,v. 24, p. 592-600, 2007.

COSTA, A. R. F. *et al.* Molecular identification of rapidly growing mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the State of Pará , Amazon region, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** , New York, v. 65, p.358–364, 2009.

COUTO, I., PEREIRA, S., MIRAGAIA, M., SANCHES, I. S., & DE LENCASTRE, H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**,v 39 ,n.9, p. 3099-3103, 2001.

CRUZ, J.C., 1938 *apud* BARRETO, A. M. W. CAMPOS, C.E.D. Micobactérias “não tuberculosas” no Brasil. **Boletim de pneumologia sanitária**. Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, jan/jun, 2000.

DA SILVA ROCHA, A. *et al.* Novel allelic variants of mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-Restriction Enzyme Analysis of *hsp65*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n.11, p.4191-4196, 2002.

DAVIES, B. S. *et al.* Non-tuberculous slow-growing mycobacterial pulmonary infections in non-HIV-infected patients in south London. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v. 44, n. 11 , p. 815-819, 2012.

DE GROOTE MA, HUITT G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. **Clinical Infectious Disease**, v.42,n.12, p. 1756-1763, 2006.

DE TORO-PEINADO I, *et al.* Evaluación del test Speed-oligo® Mycobacteria para la identificación de micobacterias no tuberculosas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.3,n.1, p. 63-64, 2013.

DEL GIUDICE, G. *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung disease in patients without HIV

infection: a retrospective analysis over 3 years. **Clinical Respiratory Journal**. v. 5, n. 4, p. 203-210, 2011.

DEVALLOIS A, GOH KS, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2969-2973, 1997.

DEVULDER, G., PEROUSE DE MONTCLOS, M. & FLANDROIS, J. P. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 293–302, 2005.

DUARTE, R.S, *et al.* Epidemic postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 7, p. 2149-2155, 2009.

DVORSKA L., *et al.*: Strategies for Differentiation, Identification and Typing of Medically Important Species of Mycobacteria by Molecular Methods. **Veterinarni Medicina**, v. 46, p. 309–328, 2001.

EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine, Boston**, v. 322, n. 3, p. 178-183, 1990.

ESCOBAR-ESCAMILLA, *et al.* Hsp65 Phylogenetic Assay for Molecular Diagnosis of Nontuberculous Mycobacteria Isolated in Mexico. **Archives of Medical Research**, v. 45, n.1, p. 90-97, 2014.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr>>. Acesso em: out./2016.

FALKINHAM, J.O. III., Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria, **Journal of Applied Microbiology in the human environment**, V. 107, n. 2, p. 356–367, 2008.

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

FREEMAN J, *et al.*, Incidence of Nontuberculous Mycobacterial Disease in New Zealand, 2004. **New Zealand Medical Journal**, v.120, n. 1256, ID U2580, 2007.

FREITAS, E I, *et al.* Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.11,n.4, p.1073-1083, 2006.

GARIMA, K., *et al.*, Are we overlooking infections owing to non-tuberculous mycobacteria during routine conventional laboratory investigations? **International Journal of Mycobacteriology**, v. 1, n. 4, p. 207 – 211, 2012.

GITTI Z, *et al.* Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS Assays To Analyze 76 Nontuberculous Mycobacterial Isolates from Greece. **Journal of Clinical Microbiology**. V.44,n.6, p.2244-2246, 2006.

GÓMEZ NA. Micobacterias no tuberculosas: ¿una infección emergente? **Anales de Pediatría** v.71, p.185-188, 2009.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M., *et al.* Virulence and immune response induced by Mycobacterium avium complex strains in a model of progressive pulmonary tuberculosis and subcutaneous infection in BALB/c Mice. **Journal Infection and Immunity**, v.81, n.11, p.4001-4012, 2013.

GOPINATH K AND SINGH S. Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: are we neglecting the danger? **PLoS Neglected Tropical Diseases**.v.4,n.4, e615, 2010.

GRIFFITH, D. E, *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of non-tuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.175, n.4, p. 367-416, 2007.

HADIFAR, S., *et al.* “Molecular Typing of Iranian Mycobacteria Isolates by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 360-bp *rpoB* Gene.” **Advanced Biomedical Research**, v.4, n.1, 152, 2015.

HÄFNER, B., HAAG, H., GEISS, H., & NOLTE, O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. **Molecular and Cellular Probes**, v.18,n.1,p. 59-65, 2004.

HALL, L., *et al.* “Evaluation of the MicroSeq System for Identification of Mycobacteria by 16S Ribosomal DNA Sequencing and Its Integration into a Routine Clinical Mycobacteriology Laboratory.” **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p. 1447–1453, 2003.

HANNA SOINI, JAMES M. MUSSER. Molecular Diagnosis of Mycobacteria.

Clinical Chemistry, v.47, n.5, p. 809-814, 2001.

HANCE, A. J, *et al.* Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. **Molecular Microbiology**. v.3, p.843-849, 1989.

HAYNES, R. B. and YOU, J. J. **The Architecture of Diagnostic Research, in The Evidence Base of Clinical Diagnosis: Theory and methods of diagnostic research**, Second Edition (eds J. A. Knottnerus and F. Buntinx), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.2009, p. 20–41.

HERNANDEZ, M. *et al.* development of melting temperaturebased SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. **Analytical Biochemistry** ,New York, v.323, p.164-170, 2003.

HERNÁNDEZ-TOLOZA, J. E. et al. Identificación de Mycobacterium spp a través de métodos moleculares en el Laboratorio de Salud Pública de Bogotá, Colombia. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.34,n.1,p.17-22, 2015.

HILLENKAMP F., KARAS M., BEAVIS R.C, CHAIT B.T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Analytical Chemistry**, v.63 p. 1193A–1203A, 1991.

HO YS, *et al.* Complete Genome Sequence of Mycobacterium fortuitum subsp. fortuitum Type Strain DSM46621. **Journal of Bacteriology**. v.194, n.22, p.6337-8, 2012.

HOEFSLOOT, W., *et al.* The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: A NTM-NET collaborative study. **European Respiratory Journal**. v. 42, n. 6, p. 1604-1613, 2013.

HULLEY S.B; CUMMINGS S.R; BROWNER; GRADY D.G. Delineando a Pesquisa Clínica 4ª Edição **Editora: Artmed**, 2015.

IAKHIAEVA, E. *et al.* Variable-number tandem-repeat analysis of respiratory and household water biofilm isolates of *Mycobacterium avium subsp. hominissuis* with establishment of a PCR database. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, n.4, p. 891-901, 2016.

IOANNIS, K. *et al.* Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. **Journal of Microbiological Methods, Amsterdam**, v.75, p.1–11, 2008.

JAGIELSKI T, *et al.* Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.29,

p.239–290, 2016.

JARZEMBOWSKI J.A. and YOUNG M. B. Nontuberculous Mycobacterial Infections. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 132, n. 8, p. 1333-1341, 2008.

JESUITS. **Etudes**. 2. ed. Estados Unidos:Universidade da Califórnia, 1973

JOÃO ,ICP,*et al.* Identification of nontuberculosis mycobacteria by partial gene sequencing and public databases. **International Journal of Mycobacteriology**. v.3,p.144–152, 2014.

JOHNSON, M. M.; WALLER, E. A.; LEVENTHAL, J. P. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 14, n. 3, p. 203–210, 2008.

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

KANE G, MANI K A. Pulmonary Mycobacterium avium-intracellulare Complex infection in the immunocompetent Host. **Pulmonary Disease Board Review Manual**. vol.11,part 1, 2003.

KARAS, M., HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v.60, p. 2299–301, 1988.

KATOCH, V.M., PARASHAR, D., CHAUHAN, D.S., SINGH, D., SHARMA, V.D. & GHOSH, S. Rapid identification of mycobacteria by gene amplification restriction analysis technique targeting 16S-23S ribosomal RNA internal transcribed spacer & flanking region. **Indian Journal of Medical Research**, v.125,n.2,p. 155-162, 2007.

KEHRMANN J, *et al.* GenoType NTM-DR for identifying *Mycobacterium abscessus* subspecies and determining molecular resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, 1653–1655, 2016.

KELLOGG J A, *et al.* Application of the Sherlock Mycobacteria identification system using high-performance liquid chromatography in a clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39,p.964–970, 2001.

KIM, B. J., *et al.* Differential identification of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (rpoB). **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, p.1308–1312, 2004.

KIM H J. *et al.*, Differentiation of Mycobacterial species by hsp65 duplex PCR followed by duplex-PCR-based restriction analysis and direct sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.11, 3855-3862, 2006.

KHOSRAVI, A. D., *et al.*, Molecular Identification Of Clinical Isolates Of Mycobacterium fortuitum By Random Amplified Polymorphic Dna (Rapid) Polymerase Chain Reaction and Eric PCR. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.9, .12, DC01-DC05, 2015.

KLEMEN H M D, *et al.*, Multiplex polymerase chain reaction detection of atypical mycobacteria and Mycobacterium tuberculosis complex. **Diagnostic Molecular Pathology** v.7, p.310-316, 1998.

KWOK, A. Y., *et al.* Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus Staphylococcus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.49, p. 1181–1192, 1999.

LAI CC, *et al.*, Increasing Incidence of Nontuberculous Mycobacteria, Taiwan, 2000–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.294–296, 2010.

LEÃO, S. C. *et al.* Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 43, n. 1, 2005.

LEBRUN L, *et al.* Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2476-8, 1992.

LOTZ A, *et al.* Rapid Identification of Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.4481–4486, 2010.

MARRAS TK, *et al.*, Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Ontario, Canada, 1998–2010. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, p.1889–91, 2013.

MARY A. DE GROOTE, GWEN HUITT. Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.12, p. 1756-1763, 2006.

MATOS, E D, *et al.* Nontuberculosis Mycobacteria at a Multiresistant Tuberculosis Reference Center in Bahia: Clinical Epidemiological Aspects. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, p. 296-304, 2004.

MATTOCKS C J, *et al.* “A Standardized Framework for the Validation and Verification of

Clinical Molecular Genetic Tests.” **European Journal of Human Genetics**, v.18, n.12, p. 1276–1288, 2010.

MAZZEO MF, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72 ,p.1180–1189, 2006.

MELLO, K.G.C., *et al.* Clinical and Therapeutic Features of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Brazil, 1993–2011. **Emerging Infectious Diseases**. v. 19, n. 3, p. 393-399, 2013

MEYERS H, *et al.* An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection following liposuction. **Clinical Infectious Diseases**, v.34.p.1500–7, 2002.

MIDDLETON AM, CHADWICK MV, GAYA H. Detection of mycobacterium tuberculosis in mixed broth cultures using DNA probes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 3,p.668-71, 1997.

MIJS W., *et al.* Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *Avium* for bird-type isolates and "*M. avium* subsp. *hominissuis*" for the human/porcine type of *M. avium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p.1505-1518, 2002.

MOORE JE, KRUIJSHAAR ME, ORMEROD LP, DROBNIEWSKI F, ABUBAKAR I. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. **BioMed Central Public Health**, v.10, n.612.p.975-979, 2010.

MORRIS, A. *et al.* An Official ATS Workshop Report: Emerging Issues and Current Controversies in HIV-Associated Pulmonary Diseases. **Proceedings of the American Thoracic Society**. v. 8, p. 17–26, 2011.

NEONAKIS IK, *et al.* Molecular Diagnostic Tools in Mycobacteriology. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, p.1–11, 2008.

NUNES-COSTA D, *et al.* The looming tide of nontuberculous mycobacterial infections in Portugal and Brazil. **Tuberculosis Edinburgh, Scotland**, v. 96,p.107-19, 2016.

PADILLA E, *et al.* Comparative Evaluation of the New Version of the INNO-LiPA Mycobacteria and GenoType Mycobacterium Assays for Identification of *Mycobacterium* Species from MB/BacT Liquid Cultures Artificially Inoculated with Mycobacterial Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.7, p.3083-3088, 2004.

PARK,H.,*et al.* Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus- and species-specific PCR primers. **Journal of Clinical Microbiology**,v. 38,p.4080–4085, 2000.

PARSONS, L. M., *et al.* “Rapid and Simple Approach for Identification of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Isolates by PCR-Based Genomic Deletion Analysis.” **Journal of Clinical Microbiology**,v.40,n.7,p. 2339–2345, 2002.

PEDRO H.S.P, *et al.*, Cenário atual da tuberculose. **Hansenologia Internationalis**, v.39, n.1, p. 40-55, 2014.

PIERSIMONI C, SCARPARO .Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients.**The Lancet Infectious Diseases** , v. 8 , n. 5 ,p. 323 – 334, 2008.

PIGNONE, M. *et al.* “Identification of Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry.” **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44,n.6,p. 1963–1970, 2006.

POROCA, D R *et al.* Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol.42, n.6, p. 716-722, 2009.

PREVOTS, D. R. *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems.**American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 7, p. 970-976, 2010.

PREVOTS DR, MARRAS TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. **Clinics In Chest Medicine**.v.36, p.13–34, 2015.

PRIMM, T.P., LUCERO, T.P. & FALKINHAM, J. O. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.1, p. 98-106, 2004.

RAJU, RAVIKIRAN M. *et al.* “Leveraging Advances in Tuberculosis Diagnosis and Treatment to Address Nontuberculous Mycobacterial Disease.” **Emerging Infectious Diseases**,v. 22,n.3,p. 365–369, 2016.

RAMIS, I. B, *et al.* Evaluation of the speed-oligo mycobacteria assay for the identification of nontuberculous mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v.64, n.3, p.283-287, 2015.

RAMOS JP, *et al.* *Mycobacterium fragae* sp. nov., a non-chromogenic species isolated from human respiratory specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.2583–2587, 2013.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Revue Scientifique Et Technique de L'office International Des Epizooties**. v.20, n.1, p.21-54, 2001.

RICKETTS, W. M., *et al.*, Human-to-human transmission of *Mycobacterium kansasii* or victims of a shared source? **European Respiratory Journal**, vol.44, n.4, p.1085-1087, 2014.

RINGUET, *et al.* *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, vol37, n.3, 852-857, 1999.

ROTH, A, *et al.* Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 36, p. 139–147, 1998.

RUNYON E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **The Medical Clinics of North America**, v.43, n.1, p.273–290, 1959.

RUSSO C, TORTOLI E, MENICHELLA D. Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.2, p.334-339, 2006.

SACKETT, D. L., HAYNES ,R. B. Evidence base of clinical diagnosis: The architecture of diagnostic research. **British Medical Journal**, v.324, p.539-541, 2002.

SAJDUDA A, *et al.* *hsp65* PCR-restriction analysis (PRA) with capillary electrophoresis in comparison to three other methods for identification of *Mycobacterium* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n.2, p.190–197, 2010.

SAVIOLA B, BISHAI W. **The genus mycobacterium-medical. In The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes** Vol.3, 3rd edn, Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E (eds). Springer Publication, New York, 2006, p.919-933.

SCHINSKY MF, *et al.*, Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov. *Mycobacterium houstonense* sp. nov. *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. **Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p.1653–67, 2004.

SEISCENTO, M. *et al.* Derrame pleural por micobactéria não tuberculosa. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 31, n. 5, p. 459-463, 2005.

SHAO Y, *et al.* The Epidemiology and Geographic distribution of Nontuberculous Mycobacteria Clinical Isolates From Sputum Samples In The Eastern Region Of China. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.3, e0003623, 2015.

SOINI H, MUSSER J M. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. **Clinical Chemistry**, v.47,n.5, 809-814, 2001.

SILVA F. C., *et al.*, Hsp65 pcr-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 43. n. 1, Jan. /Feb 2001.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. 1.ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. cap. 6, p. 99-110.

SILVA, R. A. *et al* , Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of hsp65. **Journal of clinical microbiology**, Washington,DC, v. 40, n.11, p. 4191-4196, 2002.

SINT, D.; RASO, L.; TRAUGOTT, M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success: Advances in multiplex PCR. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 5, p. 898–905, 2012.

SOLAR, M. *et. al.* Rapidly growing mycobacteria-related skin infection after cosmetic mesotherapy. **Folia Dermatológica**, v.16, n.3, p.127-135, 2005.

SPADA D.T.A, *et al.* Avaliação de uma sonda genética (Sistema Accuprobe, Gen Probe®) para identificação de organismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em comparação com métodos tradicionais de caracterização. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, p. 219-24, 2005.

SPRINGER, B., *et al.* Two-laboratory Collaborative Study on Identification of Mycobacteria: Molecular versus Phenotypic Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.296–303, 1996.

STOUT J.E., KOH W.-J., YEW W.W. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 45 , p. 123-134, 2016

STRAPAGIEL, D. *et al.* Draft Genome Sequences of *Mycobacterium Kansasii* Strains 1010001454, 1010001458, 1010001468, 1010001493, 1010001495, and 1010001469, Isolated from Environmental Sources. **Genome Announcements**, v. 4, n.3 e00456–16, 2016.

SUFFYS, P. N., *et al.* Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.4477-4482, 2001.

TANAKA II, *et al.* Comparison of a Multiplex-PCR Assay With Mycolic Acids Analysis and Conventional Methods for The Identification of Mycobacteria. **Microbiology and immunology**, v.47, n.5, p.307-12, 2003.

TELENTI, A., *et al.* Rapid identification of Mycobacteria to the species level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n. 2, p.175-178, 1993.

TELLES, M.A.S. *et al.* *Mycobacterium kansasii*: antibiotic susceptibility and PCR restriction analysis of clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.975-979, 2005.

THOMSON, R.M. Changing Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacteria Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 1576-1659, 2010.

THOREL M. F., KRICHEVSKY M., LÉVY-FRÉBAULT, V. V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, n.3, p. 254–60, 1990.

TORTOLI, E., *et al.* Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.1079-1084, 2001.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria

of de 1900s. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p. 319-354, 2003.

TORTOLI E. The new mycobacteria: an update. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 48,n.2,p.159–178, 2006.

TORTOLI E. Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium* . **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, n.4, p.727-52, 2014.

TRUSFIELD M.*et al.*, Win Episcope 2.0:Improved epidemiological software for veterinary medicine **Veterinary Record**,v.148, n.18, p.567-72, 2001.

UEKI S Y M,*et al.*, Nontuberculous mycobacteria: species diversity in Sao Paulo state, Brazil.**Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**,v. 41,n.1, p.1-8, 2005.

VAN INGEN J,*et al.* Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, the Netherlands. **Thorax**, v. 64, p.502–6, 2009.

VAN INGEN J,*et al.*. Microbiological Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. **Clinics In Chest Medicine**, v.36, p.43–54, 2015.

VARMA-BASIL, M., *et al.* Development of a Novel PCR Restriction Analysis of the *hsp65* Gene as a Rapid Method To Screen for the Mycobacterium Tuberculosis Complex and Nontuberculous Mycobacteria in High-Burden Countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n.4, p. 1165–1170, 2013.

VERMA AK *et al.*,Identification of mycobacterial species by PCR restriction enzyme analysis of the *hsp65* gene an Indian experience.**Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 4 ,p. 293-296, 2015.

WALLACE, R. J., Jr, *et al.* Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5,p. 657–679, 1983.

WALLACE, R.J.Jr.,*et al.*,Diversity and sources of rapidly growing mycobacteria associated with infections following cardiac surgery. **Journal of Infectious Disease**,v. 159, p. 709-716, 1989.

WINTHROP KL, *et al.* Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Clinical Features: an Emerging Public Health Disease,**American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**,v. 182,p.977–82, 2010.

WONG, D.A., *et al.* Routine use of a simple low-cost genotypic assay for the identification of mycobacteria in a high throughput laboratory. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** , v.47, p. 421–426, 2003.

WU,T., LU, C. & LAI, H. Current Situations on Identification of Nontuberculous Mycobacteria. **Journal of Biomedical Laboratory Sciences**, v.21, n.1, p. 1-6, 2009.

YAM, W. C.,*et al.* Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v.55,p. 529-536, 2006.

YANG M, ROSS B C, DWYER B. Isolation of a DNA probe for identification of *Mycobacterium kansasii*, including the genetic subgroup. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.2769–2772, 1993.

YEW WW, SOTGIU G, MIGLIORI GB. Update in tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease 2010. **American journal of respiratory and critical care medicine**,v. 184,p.180-185, 2011.

ZHANG, YANSHENG *et al.* “Molecular Analysis of *Mycobacterium Kansasii* Isolates from the United States.” **Journal of Clinical Microbiology**.v. 42,n.1,p. 119–125, 2004.

APÊNDICE - Metodologia utilizada no PRA-*hsp65* para identificação das espécies

As amostras foram identificadas pelo método de PRA-*hsp65*, onde o fragmento de 440 pb da sequência do gene *hsp65*, foi submetido à amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como alvo o gene *hsp65*.

A reação é realizada adicionado 3µL do DNA extraído das amostras a uma mistura contendo: 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA), 5 µL de glicerol e 25pmoles/ µL de cada oligonucleotídeo Tb11 e Tb12 (Tabela 12) totalizando um volume final de 50 µL e colocados no termociclador (Biocycler, MJ96+).

Para o controle de qualidade foi testado um controle positivo (DNA de micobactéria H37Rv) e um controle negativo (água ultrapura).

As reações ocorrem nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguido de 45 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Tabela 12. Características dos oligonucleotídeos utilizados na PCR PRA-*hsp65*

Primers	Sequencia(5' a 3')	Alvo	Referência
TB11	ACAAACGATGGTGTGTCAT	<i>hsp65</i>	Telenti, 1993
TB12	CTTGTCGAACCGCATAACCCT		

Cinco microlitros dos produtos da reação são submetidos à eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich Co., São Paulo, Brasil) a 1%, preparado em 100mL de tampão TBE 1X (tampão tris-borato EDTA) e corados com uma solução de *SYBR® Safe*, adicionado ao gel. Os produtos são misturados com 3µL do tampão de carregamento (Loading Buffer) para dar cor e aumentar a densidade das amostras. A duração da corrida é de 50 minutos a 5V/cm. Ao término da corrida eletroforética, as bandas de DNA de 440 pb são visualizadas sob luz Ultravioleta e digitalizadas no equipamento de foto documentação (DNR MiniBis Pro, Kiryat Anavim Jerusalem, Israel).

Os produtos da PCR são posteriormente digeridos, separadamente com as enzimas *BstEII* (New England Biolabs, Ipswich, EUA) e *HaeIII* (New England Biolabs, Ipswich, EUA). Para a reação com as enzimas são alíquotados dois volumes de 20µL do produto de PCR de cada amostra, para cada uma das duas enzimas a serem utilizadas. A eles são adicionados 3µL do tampão específico (buffer 10x para *HaeIII* e buffer 10x para *BstE II*) para

cada enzima, 1µL da enzima de digestão e 7µL de água ultrapura esterilizada, para um volume final de 11µL. As amostras a serem digeridas pela HaeIII são incubadas a 37°C e as serem digeridas pela BstEII incubadas a 60°C, ambas por 3h.

A digestão é avaliada em gel de agarose a 3,5%, preparado em 100mL de tampão TBE 1X (tampão tris-borato EDTA) e corado com *SYBR® Safe* adicionado ao gel. Uma mistura de 3µL do tampão de carregamento Loading Buffer e 7 µL de cada produto digerido é aplicada em cada canaleta, separando os produtos produzidos por cada enzima com um marcador de peso molecular de 50 e 25pb (New England Biolabs, Ipswich, EUA) . A corrida eletroforética é realizada a 5v/cm por 3 horas. O gel é observado sob luz UV e a imagem capturada por dispositivo de fotodocumetação (DNR MiniBis Pro, Kiryat Anavim Jerusalem, Israel).

A determinação do tamanho dos fragmentos é feita por comparação com a altura das bandas em relação as do Ladder 50 e 25 pb e a identificação da espécie micobacteriana utilizando-se o site na internet, PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>) (BRASIL,2005; TORTOLI, 2003; TELENTI *et al.*,1993).

Análises

As análises dos perfis de PRA são realizadas por simples comparação visual com o marcador de peso molecular, sendo sua interpretação realizada utilizando o banco de dados disponível na internet. A figura abaixo ilustra os perfis de PRA resultantes da digestão dos produtos amplificados, pelas enzimas utilizadas. (Figura 5)

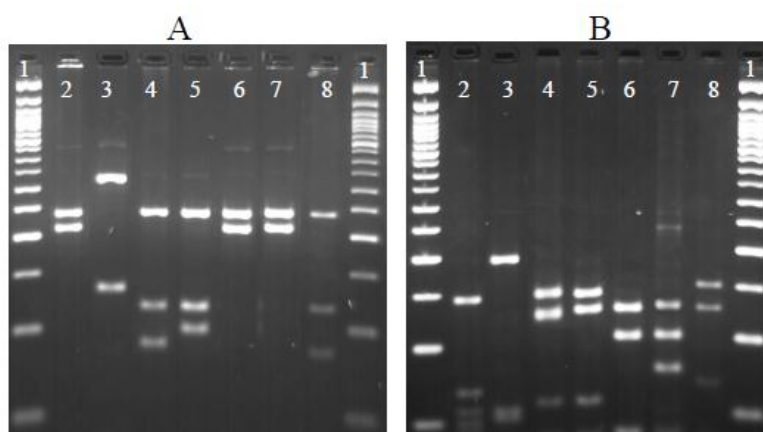


Figura 7- Fragmentos resultantes da Digestão om as Enzimas BstEII (A) e HAEIII (B).
 Linha1, Ladder 50pb; 2, *M.abscessus*; 3, *M.chelonae*; 4, Grupo *M.fortuitum*;
 5. *M.intracellulare/M.chimaerae*; 6, *M.avium*; 7, *M.kansasii*; 8, Complexo *M.tuberculosis*