

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Andrea Santos Lima

**DETECÇÃO RÁPIDA E DIFERENCIAÇÃO DE  
ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS ATRAVÉS DE  
UM SISTEMA DE PCR MULTIPLEX.**

Recife

2010

**ANDREA SANTOS LIMA**

**DETECÇÃO RÁPIDA E DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
MICOBACTÉRIAS ATRAVÉS DE UM SISTEMA DE PCR MULTIPLEX.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em ciências.

Recife

2010

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

L732d Lima, Andrea Santos.

Detecção rápida e diferenciação de espécies de micobactérias através de um sistema de pcr multiplex./ Andrea Santos Lima. — Recife: A. S. Lima, 2010.

80 f.: il..

Dissertação (Mestrado acadêmico em saúde pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Orientadora: Haiana Charifker Schindler.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Micobactérias Atípicas. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Diagnóstico. I. Schindler, Haiana Charifker. II. Título.

---

CDU 616-002.5

**ANDREA SANTOS LIMA**

**DETECÇÃO RÁPIDA E DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE  
MICOBACTÉRIAS ATRAVÉS DE UM SISTEMA DE PCR MULTIPLEX.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fiocruz, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em ciências, avaliada pela seguinte banca examinadora:

Data de aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Profa. Dra. Haiana Charifker Schindler (Orientadora)  
CPqAM/Fiocruz

---

Prof. Dra. Eulalia Camelo Pessoa Azevedo Ximenes  
(Examinador Titular) UFPE

---

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti (Examinadora Titular)  
CPqAM/Fiocruz

---

Dra Clarice Neuenschwander Lins de Morais  
(Examinadora Suplente) CPqAM/Fiocruz

---

Dr. Carlos Gustavo Régis da Silva ( Examinador Suplente)  
CPqAM/Fiocruz

Dedico com carinho este trabalho, fruto de muito esforço, dedicação e superação a minha família, que me mostrou que somente o amor é agente construtor. Aos meus amigos pelo apoio, em todas as horas, que foi essencial para concretização de mais esta etapa em minha vida. Aos pacientes que nos deram a oportunidade também de crescer como ser humano.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, fé e esperança em seguir sempre buscando meus objetivos.

Aos meus pais, Nadja e Raymundo, por me incentivarem, por me apoiarem e por se dedicarem tanto na minha construção como ser humano e profissional e pelo amor que me doaram todos os anos de minha vida.

As minhas irmãs, Roberta e Bruna, por me ajudarem em muitos momentos de limitações, pela grande amizade e amor que nos une, pela paciência e força de todas as horas.

A Haiana, orientadora e amiga, que foi responsável por me proporcionar grandes oportunidades e investiu em mim acreditando no meu potencial desde o início da minha vida acadêmica sempre me incentivando a crescer nesta área.

À amiga, co-orientadora, Lílian. Pelos enriquecedores ensinamentos do dia-a-dia científico, pelo apoio que nos é dado com tanta determinação e paixão pelo que faz, tendo papel fundamental na minha formação científica.

A todas as pessoas que fazem parte da maravilhosa “Equipe das Tuberculetes”, que compõem o Laboratório de Imunoepidemiologia: Rosana, Fabiana, Juliana Figueiredo, Juliana Falcão, Heidi, Laís, Márcia, Gabriela. Pela união, amizade, paciência, compreensão, trabalho em equipe, esforço mutuo, pois sem isto não seria possível a conclusão deste trabalho.

Ainda à equipe das “Tuberculetes”, agradeço às nossas sessões de “terapias” semanais que extrapolam os assuntos profissionais e nos ajudam a enxergar os problemas com mais leveza e sorri que é um grande remédio para o corpo e para alma!

Aos outros membros da Equipe do Laboratório de Imunoepidemiologia que já passaram ou que estão chegando agora: André, Eduardo, José Luis, e aos alunos de medicina que contribuíram com este trabalho.

Às amigas e “agregados” das Tuberculetes, Neide, Kali, Romero e Simone que direta e indiretamente contribuíram com este trabalho. Em especial a Neide que me socorreu na formatação deste documento e Romero pelo apoio e trocas científicas como colega de mestrado e agora de doutorado.

Simone que tanto me ajudou com os procedimentos burocráticos do CPqAM.

Ao professor Rafael Duarte por acreditar em nosso trabalho, pela grande disponibilidade em nos ajudar sempre.

Aos meus amigos e familiares que contribuíram me dando força e torcendo por mim e pelos meus projetos e por proporcionarem-me muitos momentos de alegria, desabafos, de

crescimento e aprendizado: Milu, Ricardo, Gege, Lu, Malu, Iara, Gil, Olívio, Daniel, Filipe e Macito.

A todos que fazem parte da Secretaria Acadêmica do CPqAm/FIOCRUZ pelo suporte e paciência.

Ao Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ por ter cedido suas instalações para o desenvolvimento deste estudo.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram com a conclusão deste trabalho dando suporte técnico, profissional ou pessoal. Meu sincero MUITO OBRIGADA!

Parece paradoxal que a pesquisa científica, em vários sentidos uma das mais questionadoras e cétricas atividades humanas, dependa da confiança pessoal. Mas o fato é que, sem confiança, a empreitada da pesquisa não funcionaria. "

Arnold Relman

Editor do New England Journal of Medicine



LIMA, A. S. **Detecção rápida e diferenciação de espécies de micobactérias através de um sistema de PCR multiplex.** 2010 Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010

## RESUMO

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e outras denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT). Nas infecções causadas por micobactérias, o diagnóstico precoce é essencial para a implementação do tratamento e cura do paciente. Métodos moleculares têm proporcionado à melhoria considerável da velocidade e precisão de identificação das micobactérias. Este estudo teve como objetivo avaliar um sistema PCR Multiplex em diferentes amostras clínicas de pacientes com tuberculose e micobacterioses, além de cepas de micobactérias isoladas em meio de cultura para ser proposta como ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial da tuberculose e doenças causadas por MNT. Foram analisados 40 pacientes com diagnóstico de tuberculose realizado pelo médico assistente do serviço de saúde, 63,15% do sexo masculino e 36,85% do feminino. Foram processadas 58 espécimes biológicos de origem pulmonar e extrapulmonar e as amostras clínicas pulmonares bacíferas extraídas com Kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook foram as que amplificaram pelo menos um alvo específico quando utilizamos a PCR multiplex. Em relação às características fenotípicas e bioquímicas das 40 cepas de micobactérias, 55% foram caracterizadas como *M. tuberculosis*, 22,5% como micobactérias não tuberculosas. Quando comparamos os resultados dos testes fenotípicos e bioquímicos com a PCR multiplex, observamos 93,3% de concordância nos resultados. Na comparação dos resultados da PCR multiplex com a técnica de PRA- hsp65 e com o diagnóstico final dos pacientes, verificamos que houve concordância em 100% e 74,28% dos resultados, respectivamente. Concluímos que a PCR multiplex poderá ser utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial da tuberculose e das infecções causadas pelas MNT. Entretanto é de fundamental importância que o diagnóstico diferencial seja baseado na análise conjunta de vários parâmetros que identifiquem as espécies de MNT.

Palavras chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Micobactérias Atípicas, Reação em Cadeia da Polimerase, Diagnóstico

LIMA, AS **Rapid detection and differentiation of species of mycobacteria by means of a multiplex PCR system. Dissertation.** 2010. Dissertation (Academic Master's Degree in Public Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2010.

### **ABSTRACT**

The genus *Mycobacterium* comprises *Mycobacterium tuberculosis* complex species and others called nontuberculous mycobacteria (NTM). In infections caused by mycobacteria, early diagnosis is essential for the implementation of the treatment and cure. Molecular methods have provided considerable improvement to the speed and accuracy of identification of mycobacteria. This study aimed to evaluate a multiplex PCR system in different clinical samples from patients with tuberculosis and mycobacteria, and mycobacteria strains isolated in culture medium to be proposed as an auxiliary tool in the differential diagnosis of tuberculosis and diseases caused by NTM. We analyzed 40 patients diagnosed with tuberculosis conducted by the attending physician of the health service, 63.15% male and 36.85% female. 58 specimens were processed biological origin of pulmonary and extrapulmonary clinical samples and extracted with smearpositive Kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook were used to amplify a specific target at least when using the multiplex PCR. In relation to phenotypic and biochemical characteristics of 40 strains of mycobacteria, 55% were characterized as *M. tuberculosis*, 22.5% as nontuberculous mycobacteria. When comparing the results of phenotypic and biochemical tests with the multiplex PCR, we observed 93.3% agreement in results. Comparing the results of multiplex PCR with the technique of PRA-hsp65 and the final diagnosis of patients, we found that there was agreement in 100% and 74.28% of the results, respectively. We conclude that the multiplex PCR could be used as an auxiliary tool in the differential diagnosis of tuberculosis and NTM infections. However it is of fundamental importance that the differential diagnosis is based on joint analysis of various parameters to identify the species of NTM.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, atypical mycobacteria, Polymerase Chain Reaction, Diagnosis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b>	Incidência global de TB. Número de casos de TB por 100.000 habitantes em 2008.....	16
<b>FIGURA 2:</b>	Incidência de TB no Brasil. Número de casos por 100.000 habitantes em 2006.....	17
<b>QUADRO 1:</b>	Interpretação do resultado do teste tuberculínico em indivíduos vacinados e não-vacinados.....	22
<b>QUADRO 2:</b>	Classificação das micobactérias de acordo com tempo de crescimento e pigmentação das colônias.....	24
<b>FIGURA 3:</b>	Fluxograma da coleta das amostras clínicas, isolamento e identificação de cepas de micobactérias, pelos métodos convencionais e moleculares.....	32
<b>FIGURA 4:</b>	PCR multiplex com escarro bacilíferos.....	41
<b>FIGURA 5:</b>	PCR multiplex de cepas isoladas de amostras de pacientes.....	42
<b>FIGURA 6:</b>	PCR multiplex de cepas isoladas de amostras de pacientes.....	42
<b>FIGURA 7:</b>	PRA-hp65 de cepas isoladas de amostras clínicas de pacientes.....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b>	Características do 1ª par de oligonucleotídeos utilizados na PCR multiplex.....	36
<b>TABELA 2:</b>	Características do 2ª par de oligonucleotídeos utilizados na PCR multiplex.....	37
<b>TABELA 3:</b>	Características do 3ª par de oligonucleotídeos utilizados na PCR multiplex.....	37
<b>TABELA 4:</b>	Características clínicas e demográficas dos 40 pacientes com o diagnóstico final de tuberculose realizado pelo médico assistente do serviço de saúde.....	39
<b>TABELA 5:</b>	Protocolos de extração e tipos de amostras clínicas.....	40
<b>TABELA 6:</b>	Concordância da PCR multiplex com o padrão-ouro em cepas de micobactérias isoladas de amostras clínicas.....	43
<b>TABELA 7:</b>	Concordância da técnica de PCR multiplex utilizando como padrão-ouro o PRA-hsp65 em cepas de micobactérias isoladas de amostras clínicas.....	44
<b>TABELA 8:</b>	Concordância dos resultados da PCR multiplex, PRA-hsp65 e diagnóstico final feito pelo médico do serviço de saúde com a cultura , testes fenotípicos e bioquímicos em cepas de micobactérias isoladas de amostras clínicas.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA- *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*  
AIDS- *Acquired Immune Deficiency Syndrome*  
ATS- *American Thoracic Society*  
BAAR- *Bacilo Álcool Ácido resistente*  
BAL- *Líquido Bronco alveolar*  
BCG- *Bacilo Calmette-Guérin*  
BK- *Bacilo Koch*  
C- - *Controle negativo*  
C+ - *Controle positivo*  
CMT- *Complexo Mycobacterium tuberculosis*  
CPqAM - *Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães*  
DNA - *Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)*  
EDTA- *Ácido Etileno diamina tetraacetico*  
Fiocruz- *Fundação Oswaldo Cruz*  
FUNASA- *Fundação Nacional de Saúde*  
HIV- *Human Immunodeficiency Virus*  
HC-UFPE- *Hospital das clínicas- Universidade Federal de Pernambuco*  
HGOF- *Hospital Geral Otávio de Freitas*  
LCR- *Líquido céfalo raquidiano*  
Lj- *Löwestein Jensen*  
MNT- *Micobactérias não tuberculosas*  
MOTT- *Micobactérias outras que não M. tuberculosis*  
MCR- *Micobactéria de crescimento rápido*  
MAC -*Complexo Mycobacterium avium*  
mm- *Milímetros*  
ml- *Mililitros*  
 $\mu$ L- *Microlitros*  
mM- *Milimolar*  
MS- *Ministério da Saúde*  
M – *Marcador de peso molecular*

*M. – Mycobacterium*

*ng- Nanograma*

*OMS- Organização Mundial de Saúde*

*PCR- Reação em cadeia da polimerase*

*pb- Pares de bases*

*PPD- Purified protein derivate (Derivado Purificado da Proteína)*

*pH- Potencial hidrogeniônico*

*PNB- Ácido para-nitrobenzóico*

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

*Reniss- Rede Nacional de Investigação de Surtos em Serviços de Saúde*

*SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação*

*TB- tuberculose*

*TCH- Hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico*

*TE- Tris-EDTA; Tris (hidroximetil) ácido aminometano etileno diamina tetraacetico*

*UNIFESP/IMPPG-UFRJ- Universidade Federal de São Paulo/ Instituto de Microbiologia*

*Professor Paulo de Góes- Universidade Federal do Rio de Janeiro*

*WHO- World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Etiologia e epidemiologia das infecções por micobactérias.....	15
1.2 Micobactérias não tuberculosas (MNT).....	18
1.3 Mecanismo de transmissão, clínica e tratamento das doenças causadas por micobactérias.....	20
1.4 O diagnóstico das doenças causadas por micobactérias.....	21
1.5 A reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
1.6 A PCR multiplex.....	26
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3 PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	28
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	28
4.1 Geral.....	28
4.2 Específico.....	28
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
5.1 Local e desenho do estudo.....	29
5.2 Casuística.....	29
5.3 Considerações éticas.....	30
5.4 Critérios de inclusão.....	30
5.5 Critérios de perda.....	30
5.6 Análises estatística.....	31
5.7 Coleta e processamento dos espécimes biológicos.....	31
5.8 Cultura e identificação de micobactérias em meio Löwestein-Jensen a partir das amostras biológicas e testes fenotípicos.....	33
5.9 Cepas de referência de micobactérias.....	33
6.0 Extração de DNA genômico de micobactérias.....	34
6.1 Extração de DNA das amostras biológicas.....	34
6.2 Caracterização genotípica das cepas de micobactérias não tuberculosas.....	35
6.3 Descrição dos oligonucleotídeos que compõe a PCR multiplex..	36
6.4 Condições da PCR multiplex.....	37
6.5 Análise dos produtos da PCR.....	38

<b>7 RESULTADOS</b> .....	38
7.1 Casuística.....	38
7.2 Espécimes biológicos coletados.....	39
7.3 Avaliação de método de extração e purificação de DNA de micobactérias em espécimes biológicos através PCR multiplex.....	40
7.4 Avaliação do padrão molecular de identificação estabelecido pelo sistema de PCR multiplex em cepas de micobactérias isoladas em meio de cultura.....	41
7.5 Comparação do método de PCR multiplex com os métodos laboratoriais convencionais de diagnóstico da tuberculose.....	43
7.6 Comparação do método de PCR multiplex com a metodologia do PRA–hsp65 na identificação de micobactérias.....	43
7.7. Comparação da PCR multiplex com o diagnóstico final do paciente.....	45
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>9. CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
<b>APÊNDICE A - Artigo publicado</b> .....	65
<b>ANEXO A – Ficha clínica-epidemiológica</b> .....	73
<b>ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido do grupo suspeito</b> .....	76
<b>ANEXO C– Termo de consentimento livre e esclarecido do grupo controle</b> .....	78
<b>ANEXO D – Parecer do comitê de ética em pesquisa – CPqAM/Fiocruz</b> .....	80



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Etiologia e epidemiologia das infecções por micobactérias

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*, subordem *Corynebacterium*, ordem *Actinomyces*. O gênero *Mycobacterium* compreende cerca de 100 espécies, a maioria saprófitas de vida livre (Fundação Nacional de Saúde, 2002). *Mycobacterium tuberculosis* é a principal espécie causadora de tuberculose do gênero *Mycobacterium* a qual compõe um grupo formado pelas espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis-BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipetti* denominado complexo *M. tuberculosis* (BRASIL, 2008). Essas bactérias formam junto com o *M. tuberculosis* o complexo primário da tuberculose (TB).

A TB, apesar de ser uma das doenças infecciosas mais antigas, bem conhecida há mais de meio século, vulnerável ao tratamento medicamentoso, permanece como um dos principais agravos à saúde a ser enfrentado em âmbito global (BRASIL, 2007).

A importância da TB é crescente, particularmente em países em desenvolvimento. A incidência elevada da doença se deve a vários fatores, tendo como principais: a co-infecção com HIV; o aparecimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes aos múltiplos quimioterápicos; a ineficiência dos programas de controle da doença e a deteriorização das condições sócio-econômicas da população (Fundação Nacional de Saúde, 2002).

Em 1993 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o estado de urgência da tuberculose, conclamando governos, comunidade científica e sociedade civil a redobrem seus esforços para o controle da doença e então em 2006 o programa “STOP TB” foi promovido pela OMS e apoiado por uma rede de organizações internacionais, países, doadores dos setores públicos e privados, organizações governamentais e não governamentais. A iniciativa estabeleceu como objetivo para 2015 a redução pela metade das taxas de prevalência e de mortalidade de tuberculose, tendo como parâmetro o ano de 1990 (BARREIRA; GRANGEIRO, 2007; RUFFINO-NETO, 2002;).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorreram 9 a 10 milhões de casos novos e 1,7 milhões de mortes por tuberculose ocorreram em 2008 e deste 16% eram HIV positivo. A maioria do número de casos estimado, em 2008 ocorreu na Ásia (55%) seguido da África (30%) e em menores proporções de casos na região do mediterrâneo Oriental (7%),

Europa (5%) e Américas (3%). Índia e China juntas representam 35% dos casos de TB no mundo (Organização Mundial de Saúde, 2009).

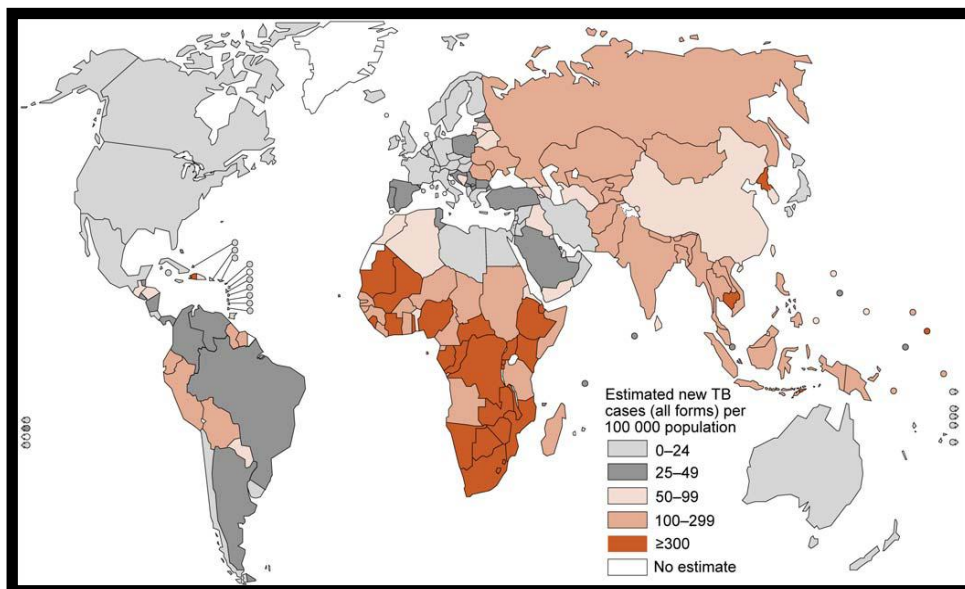


Figura 1. Incidência global de TB. Número de novos casos de TB por 100.000 habitantes em 2008.  
Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2009.

No contexto nacional, o Brasil é o único país da América Latina, incluído entre os 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo. Nos últimos três anos, o Brasil passou da 14ª para a 18ª posição em casos da doença (BRASIL, 2009; Organização Mundial de Saúde, 2007).

O Ministério da saúde estima que o número de casos notificados em 2008 foi de 70.379 mil estando 70% dos casos concentrados em 315 dos 5.565 municípios. As maiores incidências estão nos estados do Amazonas (68,93 por 100 mil), Rio de Janeiro (66,56 por 100 mil), Pernambuco (47,69 por 100 mil), Pará (43,05 por 100 mil) e Ceará (42,60 por 100 mil) (BRASIL, 2009).

A TB acomete principalmente homens em idade produtiva e, apesar do tratamento predominantemente ambulatorial, é a 4ª causa de mortalidade por doenças infecciosas e a 1ª em pacientes com AIDS. As populações mais vulneráveis são as indígenas (incidência quatro vezes maior do que a média nacional); portadores de HIV (30 vezes maior); presidiários (40 vezes maior); e moradores de rua (60 vezes maior). No entanto, há ocorrências em todos os segmentos da sociedade, independente da renda ou da escolaridade (BRASIL, 2009).

A mortalidade por tuberculose tem apresentado tendência de redução. Entretanto, a cada ano é observada a ocorrência de 5.500 mortes. Essas tendências epidemiológicas estão fortemente associadas às desigualdades sociais (BRASIL, 2006).

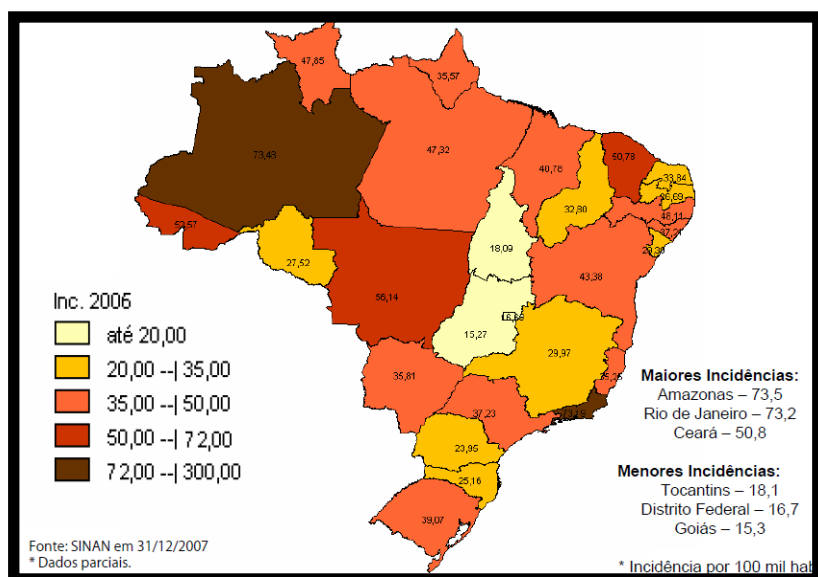


Figura 2. Incidência de TB no Brasil. Número de casos por 100.000 habitantes em 2006.  
Fonte: BRASIL, 2009.

No Estado de Pernambuco, a tuberculose constitui-se igualmente um grave problema de saúde pública. Em Recife, capital do estado, além da elevada taxa de incidência (113,95 casos/100 mil habitantes), também apresenta uma das maiores taxas de mortalidade por tuberculose no Brasil (9,91/100 mil habitantes). Em 2004, foram registrados 4.583 casos novos, representando 94,8% dos casos esperados no Brasil. A incidência foi de 55,6 casos para todas as formas de TB e 28,7 para os casos bacilíferos por 100 mil habitantes. A coorte de tratamento, considerando os municípios prioritários, mostrou uma cura de 69,4%, abaixo da meta nacional de 85%. O abandono foi de 10,6%, óbitos de 5,8% e co-infecção TB/HIV de 5,4% (BRASIL, 2007).

Em 2007, a taxa de incidência em Pernambuco foi de 47,69 casos para cada 100 mil habitantes sendo o terceiro estado com maior taxa de incidência no país, número este acima da média nacional de 41,7/100 mil habitantes, ficando atrás apenas do Rio de Janeiro e Amazonas (BRASIL, 2009). Atualmente, o governo brasileiro considera Recife uma das capitais de prioridade para a execução de medidas de controle para a TB.

## 1.2 Micobactérias não tuberculosas (MNT)

Micobactérias não tuberculosas (MNT), micobactérias atípicas ou ainda micobactérias outras que não *M. tuberculosis* (MOTT) são reconhecidas desde o tempo de Robert Koch. O isolamento de MNT de amostras de pacientes ou do ambiente é de interesse de microbiologistas, epidemiologistas e médicos (FERREIRA et al., 2002).

As MNT encontram-se dispersas na natureza e, ao contrário das espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, apresentam patogenicidade variável. A capacidade das MNT em produzir doença está claramente documentada na literatura e, sua importância vem aumentando progressivamente, com isolamentos de diferentes espécies em laboratórios (ATS, 1997; TORTOLI, 2003). Os primeiros quadros clínicos produzidos pelas MNT foram descritos na década de 50 e por muitos anos foram considerados ocasionais e quase sempre ligados a situações de imunodeficiência. Nos últimos 20 anos tem se tornado uma infecção relativamente mais freqüente, relacionada ou não com quadros de imunodepressão (GÓMEZ, 2009).

A partir da década de 90, um número crescente de novas espécies tem sido descritas e, mais de 125 espécies e 11 subespécies são reconhecidas oficialmente (EUZÉBY, 2007).

Atualmente são conhecidas condições que aumentam o risco em adquirir doenças associadas à micobactérias não causadoras de tuberculose que incluem: complicações por tuberculose, bronquiectasia, fibrose cística, doenças obstrutivas pulmonares crônicas e portadores de imunodeficiência. No entanto, este grupo de microrganismo é reconhecido também como importante em indivíduos imunocompetentes (JARZEMBOWSKI; YOUNG, 2008).

As doenças causadas pelas MNT aumentaram em todo mundo no período pós-AIDS. Os estudos realizados nos Estados Unidos e na Europa relataram 25% a 60% de infecções por MNT entre pacientes portadores de HIV (ADLE-BASSETTE et al., 2003; ATS, 1997; MARTÍNEZ-MORAGÓN et al., 2001 ).

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 isolados ocasionalmente (BARRETO; CAMPOS, 2000; CHIMARA, 2005).

Estudos revelaram que doenças atribuídas às MNT estão aumentando no Brasil, iniciado pela pandemia HIV/AIDS e associado ao crescente número de surtos decorrentes de cirurgias e procedimentos estéticos com equipamentos esterilizados incorretamente. Em razão da gravidade desse fato, o Ministério da Saúde classificou essas infecções, decorrentes de procedimentos cirúrgicos, como doença de notificação compulsória (BRASIL, 2008).

Casos divulgados pela Rede Nacional de Investigação de Surtos em Serviços de Saúde (Reniss), obtidos nos últimos nove anos confirmam a ocorrência de infecções por micobactéria de crescimento rápido (MCR) em pessoas submetidas a procedimentos invasivos, em sua maioria, cirurgias do tipo videolaparoscópicas”, cujos instrumentais sofreram desinfecção de alto nível em solução de glutaraldeído (ANVISA, 2007). De 2000 a 2008, foram notificados 2128 casos de infecções pós-cirúrgicas por micobactéria de crescimento rápido incluindo *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. massiliense*, distribuídos predominantemente em hospitais privados do país (ANVISA, 2008). Há confirmação de casos de infecção por MCR nos estados do RJ (1.105), PA (321), ES (293), RS (101), GO (70), PR (64), MT (47), MG (37), SP (23), DF (23), PI (09), MS (09), BA (09), PE (02) (Rede Nacional de Investigação de Surtos em Serviços de Saúde, 2009).

As doenças causadas pelas MNT não são de notificação compulsória, apenas em casos de infecções através de procedimentos cirúrgicos nos serviços de saúde, portanto não há registros oficiais para que se possa estimar sua incidência. Porém, diversos estudos, no Brasil, têm descrito isolamentos de cepas de micobactérias não tuberculosas em amostras pulmonares e extrapulmonares. O Centro de Referência Nacional de micobactérias Professor Hélio Fraga, no estado do Rio de Janeiro, nos anos de 1994 a 1999 observou o isolamento preponderante do complexo *M. avium intracellulare* (MAC) sobre as demais espécies (44,4%), seguidos de *M. kansasii* e *M. fortuitum*. As regiões sul e sudeste contribuíram com 57,6% dos casos de pacientes com suspeita de micobacteriose. Dentre os 431 pacientes estudados, 106 foram considerados casos de micobacterioses, e a forma mais frequente foi à pulmonar (BARRETO; CAMPOS, 2000). Em estudo realizado na Bahia por Matos et al, 2004 com pacientes em tratamento para tuberculose multirresistente no período de 1998 a 2003, foram isolados micobactérias não tuberculosas em materiais biológicos de 19(8,2%) dos 231 pacientes estudados. Sendo identificados os complexos *M. chelonae/ M. abscessus* (58%), *M. avium/intracelulare* (16%) e *M. fortuitum* (11%). Em estudo feito no Instituto Evandro Chagas no Pará de 2004 a 2007 foram isoladas 44 cepas de micobactérias não tuberculosas de 19 pacientes com infecção pulmonar e, após análise genotípica foi identificada a presença de quatro diferentes espécies que pertencem aos complexos *M. chelonae* e *M. fortuitum*. Todos

os pacientes infectados por micobactérias não tuberculosas, deste estudo, foram detectados entre os casos diagnosticados como tuberculose pulmonar os quais foram tratados com o esquema antituberculose tradicional, tendo fracasso no tratamento (COSTA et al., 2009).

### **1.3 Mecanismos de transmissão, clínica e tratamento das doenças causadas por micobactérias**

A TB é uma doença infecto-contagiosa causada por um grupo de bacilos resistentes a coloração álcool-ácido (BAAR), chamados de micobactérias, que possuem crescimento lento. Identificado por Robert Koch, em 1882, *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria que afeta principalmente os pulmões, mas, também podem ocorrer em outros órgãos do corpo, como ossos, rins e meninges.

A transmissão é direta de pessoa a pessoa. O doente expele pequenas gotas de saliva que contêm o agente infeccioso, ao falar, espirrar ou tossir, os quais podem ser aspiradas por outro indivíduo, contaminando-o. Somente 5% a 10% dos infectados pelo bacilo de Koch (BK) adquirem a doença. Pacientes com AIDS, diabetes, insuficiência renal crônica, desnutridos, idosos doentes, alcoólatras, viciados em drogas e fumantes são os mais propensos a contrair a TB (BRASIL, 2007).

Na maioria dos doentes com a forma pulmonar da doença, os sinais e sintomas mais freqüentemente descritos, no adulto, são tosse seca contínua no início, depois com presença de secreção por mais de quatro semanas, podendo se transformar em uma tosse com pus ou sangue, cansaço excessivo, febre baixa geralmente à tarde, sudorese noturna, falta de apetite, palidez, emagrecimento acentuado, rouquidão, fraqueza e prostração. Os casos graves apresentam dificuldade na respiração, eliminação de grande quantidade de sangue, colapso do pulmão e acúmulo de pus na pleura (BRASIL, 2007).

O tratamento deve ser feito por um período mínimo de seis meses, sem interrupção, com a utilização de antimicrobianos específicos (BRASIL, 2007).

Em relação, as micobactérias não tuberculosas, estas ocorrem naturalmente em diversos reservatórios: água natural e de sistemas de abastecimento, solo, aerossóis, protozoários, animais e humanos (MARTÍN-CASABONA, 2004; PRIMM et al., 2004). Existem poucas evidências da possibilidade de transmissão pessoa a pessoa, mas recentes relatos demonstraram a contaminação de pacientes devido à limpeza e desinfecção inadequada de equipamentos médicos (GRIFFITH et al., 2007; PADOVEZE et al., 2007).

As MNT apresentam uma grande heterogeneidade em sua forma de apresentação clínica e podem causar doença pulmonar progressiva, infecções de pele e mucosas, linfadenites e doença disseminada, especialmente em indivíduos imunodeficientes (GÓMEZ, 2009).

A doença pulmonar por MNT geralmente ocorre em pacientes com doença pulmonar crônica como pneumoconiose, doença pulmonar obstrutiva crônica, tuberculose pré-existente, bronquite crônica, bronquiectasia e doença esofágica associada à aspiração crônica de material alimentar pelas vias aéreas. A avaliação clínica é frequentemente complicada devido à similaridade da sintomatologia com as doenças pulmonares pré-existentes. Os sinais e sintomas das doenças causadas pelas MNT são variáveis e inespecíficos. Na maioria das vezes, a sintomatologia clínica se assemelha à evolução crônica da tuberculose. Os pacientes podem apresentar: tosse crônica com expectoração e menos frequentemente fadiga, febre, hemoptise e perda de peso (ATS, 1997; KOH et al., 2002).

Não existe consenso sobre o tratamento mais adequado para as MNT. O mesmo difere em função da espécie envolvida, visto que a sensibilidade *in vitro* a drogas e a eficácia clínica são diferentes entre as mesmas (ESTABAN et al., 2006). O tratamento das infecções por MNT é difícil e necessita de longos períodos de multidrogaterapia, com ou sem intervenção cirúrgica (BRASIL, 2008).

Uma vez que o tratamento e a epidemiologia das micobacterioses diferem significativamente da tuberculose, a identificação correta e rápida destes microrganismos é obrigatória para o diagnóstico e esquema terapêutico correto (SES, 2005).

#### **1.4 O Diagnóstico das doenças causadas por micobactérias**

O diagnóstico da TB, além da avaliação clínica, deverá estar fundamentado em métodos laboratoriais. A pesquisa bacteriológica é o método de importância fundamental tanto para o diagnóstico quanto para o controle de cura. A baciloscopia direta de escarro e a cultura para micobactérias são os métodos bacteriológicos tradicionalmente usados. O exame radiológico é auxiliar no diagnóstico da TB, justificando-se sua utilização nos casos suspeitos. A prova tuberculínica, avaliada a partir da técnica de Mantoux, é indicada como método auxiliar no diagnóstico da TB (Tabela 1). O resultado positivo para a prova tuberculínica indica infecção prévia pelo *Mycobacterium*, não distinguindo o indivíduo doente, do infectado. Nos infectados pelo HIV cujo resultado é a formação de uma pápula de diâmetro  $\geq 5$  mm é considerado reator (BRASIL, 2004).

INTERPRETAÇÃO DO PPD EM INDIVÍDUOS NÃO-VACINADOS		
<b>Diâmetro da pápula da reação intradérmica</b> <b>0 A 4 mm</b>	<b>NÃO REATOR</b>	<b>Indivíduo não infectado ou anérgico.</b>
<b>5 a 9 mm</b>	<b>REATOR FRACO</b>	<b>Vacinado com BCG; infectado pelo <i>M. tuberculosis</i> ou por micobactérias atípicas.</b>
<b>≥ 10 mm</b>	<b>REATOR FORTE</b>	<b>Indivíduo infectado pelo <i>M. tuberculosis</i> doente ou não ou vacinado com BCG nos últimos 2anos.</b>
INTERPRETAÇÃO EM INDIVÍDUOS VACINADOS		
<b>Considera-se POSITIVO:</b>	<b>Vacinado há mais de 2 anos</b>	<b>≥ 10 mm</b>
	<b>Vacinado há menos de 2 anos</b>	<b>≥ 15 mm</b>

QUADRO 1. Interpretação do resultado do teste tuberculínico em indivíduos vacinados e não-vacinados

Fonte: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

Em crianças, o diagnóstico laboratorial apresenta inúmeras dificuldades: as imagens radiológicas pulmonares nem sempre são conclusivas, a cultura de sangue, de lavado gástrico como de outros materiais orgânicos têm sensibilidade limitada e requer muito tempo para obtenção do resultado, por serem amostras paucibacilares. (SNIDER et al., 1988). No adulto com suspeita de TB, a baciloscopia é largamente utilizada no diagnóstico preliminar e acompanhamento do tratamento mesmo possuindo sensibilidade limitada, visto que, são necessários cerca de 10.000 bacilos/mL na amostra para obtenção de resultado positivo. Por outro lado, a cultura em meio Löwenstein-Jensen (Lj) apresenta uma sensibilidade maior, requerendo cerca de 10-100 bacilos, porém necessita de 6 a 8 semanas para a sua visualização, prolongando o diagnóstico definitivo (SMITH et al., 1996). A sensibilidade da cultura está comprometida em pacientes paucibacilares, sendo frequente o resultado negativo, porém quando positiva necessita no mínimo de 8 semanas para visualização do crescimento do bacilo (PIERRE; OLIVIER, 1993). Embora o quadro clínico permaneça a chave para o diagnóstico da TB, a detecção do *M. tuberculosis* na cultura permanece o exame padrão para a confirmação diagnóstica (Fundação Nacional de Saúde, 2002).

Ao longo das últimas décadas, novos métodos moleculares têm sido introduzidos e proporcionado à melhoria considerável da velocidade e precisão de identificação das micobactérias, além da detecção de novas espécies de MNT, que não tendo sido



fenotipicamente caracterizadas, não puderam, portanto, ser elucidadas pelos métodos convencionais (UEKI et al., 2005; IOANNIS et al., 2008).

O diagnóstico de doença por MNT exige muita cautela, pois o seu isolamento a partir de espécimes clínicos não estéreis pode significar colonização transitória ou contaminação. A *American Thoracic Society* recomenda que o diagnóstico das micobacterioses seja feito com base em uma série de critérios bacteriológicos, clínicos e radiológicos (GRIFFITH et al., 2007). Por esta razão, a correlação clínico-laboratorial é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico de doença por MNT e para determinação da estratégia terapêutica (ATS, 2007).

O fato de a baciloscopia detectar apenas a presença de bacilos álcool ácido resistentes leva, na maioria das vezes, a um diagnóstico equivocado das doenças causadas pelas MNT, sendo muitas vezes esse paciente notificado ao Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) e tratado como TB. Portanto, a identificação das espécies de micobactérias isoladas em cultura é fundamental para o tratamento dos pacientes (BRASIL, 2008).

Os laboratórios que realizam cultura para micobactérias devem ser capazes de separar espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* das MNT, do contrário, terão que reportar o resultado das culturas positivas, como *Mycobacterium sp* (BRASIL, 2008).

Os meios utilizados para cultura de *M. tuberculosis* e para a maioria das MNT são o de Löwenstein-Jensen e Middlebrook 7H11 (ATS, 1997). A identificação da espécie pode ser feita por métodos fenotípicos, moleculares ou pela combinação de ambos.

O método fenotípico de identificação inclui um conjunto de testes baseados em características macroscópicas das colônias presentes na cultura e bioquímicas, tais como: tempo e temperatura de crescimento, que varia de acordo com a espécie de 25° a 45°C, pigmentação, capacidade de crescimento em meios seletivos e testes enzimáticos.

Em 1958, Runyon propôs uma classificação das MNT em quatro grupos baseados na pigmentação e tempo de crescimento das colônias. As espécies que apresentam crescimento em meio sólido após sete dias são classificadas como crescimento lento e aquelas que apresentam crescimento em menos de sete dias, de crescimento rápido. Essa classificação é, ainda, utilizada para identificação das MNT juntamente com outros testes (BRASIL, 2008).

Grupo	Característica da cultura
I	Fotocromógenas-caracteriza-se pelo crescimento lento das colônias. As culturas desenvolvem pigmento amarelo somente quando exposta à luz. Exemplo: <i>M. Kansassi</i> , <i>M. marinum</i> .
II	Escotocromógenas-caracteriza-se pelo crescimento lento das colônias. As culturas desenvolvem pigmento tanto na luz como no escuro. Exemplo: <i>M. gorgonae</i> , <i>M. szulgai</i>
III	Acromógenas-caracteriza-se pelo crescimento lento das colônias. As culturas não produzem pigmento. Exemplo: <i>M. avium</i> , <i>M. terrae</i>
IV	Crescimento rápido-caracteriza-se pelo crescimento rápido das colônias. As colônias podem ser pigmentadas ou não. Exemplo: <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i>

QUADRO 2- Classificação das micobactérias de acordo com tempo de crescimento e pigmentação das colônias.

Fonte: BRASIL (2008).

Os métodos clássicos de identificação bioquímica para as MNT são: tempo de crescimento, produção de pigmento, redução do nitrato, termoinativação da catalase a 68°C, produção da niacina, prova da urease, arilsulfatase, hidrólise do tween 80, redução do telurito de potássio, crescimento em presença de açúcares (manitol, inositol, citrato de sódio), 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., 2000). Contudo, para identificação de micobactérias ao nível de espécie, baseando-se em testes bioquímicos, é necessário de três a seis semanas, sendo realizados a partir de culturas puras e, além disso, espécies geneticamente distintas podem apresentar resultados fenotípicos similares ou idênticos (BRASIL, 2008).

Nas últimas décadas, com base em estudos genotípicos, novas metodologias foram desenvolvidas para possibilitar a identificação rápida e acurada das espécies de micobactérias, potencialmente patogênicas descritas na literatura. No Brasil, a técnica de PRA-*hsp65* proposta por TELENTI et al (1993) e DEVALLOIS et al (1997), têm possibilitado a identificação rápida de diversas espécies de MNT, boa correlação com os resultados de identificação fenotípica e o reconhecimento de espécies que não eram identificadas anteriormente devido as limitações dos métodos fenotípicos. (SILVA et al., 2001; SILVIA & ROCHA et al., 2002; CHIMARA et al., 2008). O PRA-*hsp65* tem se mostrado importante como método de apoio na identificação de micobactérias e caracterização de novas espécies, sendo utilizado nos centros de referências. É importante salientar que nenhuma destas técnicas isoladamente, é capaz de identificar todas as espécies de micobactérias descritas na literatura. Existem ocasiões em que a conjugação de duas ou mais técnicas se faz necessária para

identificação definitiva de uma determinada espécie (BRASIL, 2005). Dentre as técnicas moleculares a PCR por sequenciamento de genes específicos tornou-se o método “padrão ouro” para identificação de MNT (CHEMLAL; PORTAELS, 2003; HERRERA-LÉON et al., 2009). Devido ao seu elevado poder discriminatório, esta ferramenta vem sendo utilizada por vários grupos, em estudos epidemiológicos, para identificação de espécies envolvidas em doenças humanas ou reclassificação taxonômica (COSTA et al., 2009; DUARTE et al., 2009).

### 1.5 A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica de amplificação extremamente sensível, podendo detectar uma única molécula de DNA numa amostra, desde que o alvo esteja presente na mesma. Na reação regiões específicas do ácido desoxirribonucléico (DNA) são amplificadas enzimaticamente. Durante a PCR, um segmento específico de DNA de fita dupla ou de fita simples pode ser amplificado por uma enzima termoestável através de sucessivos ciclos (SCHEINERT et al., 2005).

Vários testes para o diagnóstico de tuberculose utilizando PCR têm sido descritos, tanto métodos “in house”, como os comerciais (BOLLELA et al., 1999). Esta tecnologia tem diminuído o período do diagnóstico de algumas semanas para um a dois dias. Porém, nenhum desses métodos é universal, devido a variações de regiões específicas no genoma das micobactérias (YUEN et al., 1993; WEIL et al., 1996). A aplicação de rotina desses métodos requer que as sequências alvo sejam altamente específicas e estejam presentes em todas as cepas de espécies e subespécies de micobactérias (KURABACHEW et al., 2004).

O elemento de inserção IS6110 e o 16S rDNA são os alvos mais comumente utilizados (THIERRY et al., 1990; KOX et al., 1994; SPRINGER et al., 1996; KIRSCHNER et al., 1996, GARCIA - QUINTANILLA et al., 2002; TORTOLÌ, 2003). O IS6110 está presente apenas nas espécies do complexo *M. tuberculosis* sendo usado para diferenciar este complexo das MNT. A principal vantagem do IS6110 é que ele está frequentemente presente em múltiplas cópias no genoma de *M. tuberculosis* (KURABACHEW et al., 2004).

O gene *dnaJ* codifica uma proteína de estresse e é altamente conservado entre as bactérias. Os membros da família *Mycobacteriaceae* possuem o *dnaJ* e esta sequência nesses microrganismos provou ser útil na identificação de espécies (TAKEWAKI et al., 1993; MORITA et al., 2004). Outro gene de interesse na identificação de micobactérias, que vem sendo estudado por diferentes grupos de pesquisa é o gene *hsp65*, comum a todas as bactérias

do gênero *Mycobacterium* que codifica o antígeno de 65kDa é bastante utilizado para diferenciação de espécies de MNT (TELENTI et al., 1993; STEINGRUBE et al., 1995; RINGUET et al., 1999; MUN et al., 2007; IOANNIS et al., 2008) .

### 1.6 A PCR multiplex

Nos últimos vinte anos tem havido uma evolução importante em abordagens moleculares para estudos de comunidades microbianas e muitos destes avanços devem-se as de novas aplicações da técnica de PCR. A PCR multiplex é uma ferramenta rápida, confiável 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 (HERNANDEZ et al., 2003; TANAKA et al., 2003, CORSETTI, 2007). Este sistema que amplifica dois ou três diferentes alvos é capaz de diferenciar *M. tuberculosis* das MNT (KIM et al., 2006, POROCA et al., 2009).

Esta abordagem molecular é amplamente empregada na identificação e diferenciação microbiana por que é capaz de fornecer uma impressão digital simples de determinadas comunidades bacterianas quando comparadas com os perfis de padrões de cepas de referência. No entanto, para a identificação, se faz necessário a utilização de mais de um conjunto de oligonucleotídeos alvo específico, tendo como resultado da amplificação um produto que é uma mistura de amplicons específico para amostra analisada (CORSETTI, 2007).

A escolha correta da(s) sequência(s) alvo no genoma é um dos critérios importantes na detecção e identificação de micobactérias por PCR, as quais devem estar presentes em todas as espécies de micobactérias e ausentes em outros organismos ou presentes em única espécie de micobactéria no caso de diferenciação entre espécies (BATTACHARYA et al., 2003).

Esta técnica pode ser aplicada a uma variedade de amostras clínicas, tornando este sistema uma ferramenta útil no diagnóstico de doenças micobacterianas. É o método de escolha para o diagnóstico de infecções por micobactérias quando a suspeita é alta, mas a baciloscopia e/ ou cultura são negativas e quando a amostra é positiva por qualquer um dos testes convencionais, a PCR multiplex permite distinção entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* e outras MNT (BHATTACHARYA et al., 2003, POROCA et al., 2009).

## 2 JUSTIFICATIVA

A falta de um diagnóstico rápido e confiável das micobacterioses constitui um sério problema que reflete muitas vezes no insucesso dos programas de controle desta doença. Apesar da detecção das micobacterioses na fase inicial ser de vital importância para o início efetivo do tratamento, o diagnóstico é complicado, principalmente, nos casos onde a doença está associada com outras enfermidades (infecção pelo HIV, neoplasias malignas, doença pulmonar subjacente entre outras), ou na tuberculose de natureza paucibacilar (forma extrapulmonar e TB infantil) onde existe a impossibilidade na maioria dos casos, de se comprovar bacteriologicamente a doença.

Assim os recursos convencionais têm deixado lacunas importantes no que se refere à determinação de infecções por *Mycobacterium sp* em pacientes/ sítios que têm se mostrado epidemiologicamente cada vez mais relevantes nos casos de tuberculose e demais micobacterioses.

No Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) foi otimizada com DNA genômico de micobactérias, uma PCR multiplex, demonstrando ser sensível e específica na detecção rápida de *M. tuberculosis* e na diferenciação de micobactérias não tuberculosas (POROCA et al, 2009).

Diante da necessidade do desenvolvimento e avaliação de um diagnóstico laboratorial diferencial para as infecções causadas por micobactérias, nosso objetivo foi avaliar o sistema de PCR multiplex, otimizado por Poroca et al (2009), em diferentes amostras clínicas de pacientes com suspeita de doença por micobactérias, podendo ser proposta como ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial da tuberculose e de infecções causadas por micobactérias não tuberculosas. Além disso, poderá contribuir para um diagnóstico de qualidade que possa auxiliar no manejo clínico e terapêutico do paciente, sobretudo aqueles com dificuldade de diagnóstico.

### 3 PERGUNTA CONDUTORA

O sistema da PCR multiplex proposto será útil para o diagnóstico diferencial entre a tuberculose e as doenças causadas por MNT?

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o sistema de PCR multiplex, otimizado por Poroca, et al (2009), na identificação e diferenciação de espécies de micobactérias em diferentes amostras clínicas de pacientes com suspeita de doença por micobactérias e em cepas de micobactérias isoladas de espécimes biológicos crescidos em meio de cultura.

#### 4.2 Objetivos Específicos

Descrever as características clínicas e demográficas dos pacientes participantes do estudo;

- a) Avaliar a técnica mais eficiente de extração e purificação de DNA em espécimes biológicos coletados de pacientes com diagnóstico de micobacterioses para ser utilizado na PCR multiplex;
- b) Avaliar o padrão molecular de identificação do sistema de PCR multiplex utilizando diferentes espécimes biológicos coletados de pacientes com suspeita de infecção por micobactérias e em cepas de micobactérias isoladas de espécimes biológicos crescidos em meio de cultura;
- c) Comparar o resultado do método de PCR multiplex com o teste padrão ouro (cultura com testes fenotípicos e bioquímicos) no diagnóstico da tuberculose.
- d) Comparar o método de PCR multiplex com a metodologia do PRA–hsp65 no diagnóstico molecular diferencial de infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis* e nas infecções por micobactérias não tuberculosas (MNT).

## 5 MATERIAS E MÉTODOS

### 5.1 Local e Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo observacional analítico e prospectivo, desenvolvido no Laboratório de Imunoepidemiologia (Departamento de Imunologia) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz (CPqAM). Os pacientes do estudo foram provenientes dos ambulatórios e enfermarias do Hospital das Clínicas- Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Hospital Otávio de Freitas (HOF/SUS) que atendem portadores de afecções pulmonares e extrapulmonares.

### 5.2 Casuística

Foram selecionados quarenta indivíduos de ambos os sexos, sem restrição de idade, provenientes de ambulatório e enfermaria das unidades de saúde supracitadas do estado de Pernambuco. O diagnóstico confirmatório para TB e doenças causadas por MNT foi realizado pelo médico assistente do serviço de saúde, os indivíduos selecionados com sinais e sintomas de infecção por micobactérias foram classificados nos seguintes grupos:

**Indivíduos com tuberculose confirmada:** pacientes com evidência clínica e/ou radiológica de TB, história de contato com adulto portador de tuberculose confirmada laboratorialmente e isolamento do *Mycobacterium tuberculosis* em amostra clínica, através de exame direto ou cultura, ou melhora clínica evidente após tratamento específico.

**Indivíduos com micobacterioses não tuberculosa confirmada:** pacientes com sintomatologia sugestiva de doença por micobactérias não tuberculosas com baciloscopia positiva, ou histopatológico sugestivo com isolamento em cultura e identificação fenotípica através de testes bioquímicos e caracterização genotípica utilizando técnica de PRA-hsp65.

**Indivíduos sem micobacterioses:** ausência de sinais e sintomas sugestivos de infecção por micobactérias, teste tuberculínico não reator.

### 5.3 Considerações éticas

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre a pesquisa e receberam um termo de consentimento livre e esclarecido para assinarem, em duas vias, referente à sua participação na pesquisa e responderam a um questionário. As informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais relevantes de cada paciente foram registradas em uma ficha e depositadas em um banco de dados para as análises estatísticas. No caso dos pacientes incapacitados de emitirem sua opinião e nos menores de idade, os responsáveis deram o consentimento por escrito através do termo de consentimento para a coleta do(s) material (ais) biológico(s) necessário(s) e para sua participação na pesquisa. Os resultados de todos os exames foram repassados ao médico responsável pelo atendimento. O acompanhamento e tratamento destes pacientes foram feitos pelo profissional médico das unidades de saúde, os quais estavam sendo avaliados quanto à existência ou não de tuberculose. O projeto teve a aprovação do comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) e as respectivas comissões de ética dos hospitais participantes, N°39/2009.

### 5.4 Critérios de Inclusão

Foram incluídos além dos pacientes com TB e micobacterioses atípicas aqueles com sorologia positiva para o HIV/AIDS ou que apresentaram condições que possam deprimir o sistema imunológico como: pacientes com doenças reumáticas sob terapia imunossupressora, portadores de doenças hepáticas, renais e transplantados. Sem ter iniciado tratamento específico para micobactérias.

### 5.5 Critérios de Perda

Pacientes que por vontade própria, desistiram de participar do estudo ou aqueles que não retornaram ao hospital para acompanhamento clínico. Ainda foram excluídos pacientes que tiveram sua ficha clínica epidemiológica da pesquisa preenchida de maneira incompleta ou



cujas amostras coletadas foram contaminadas ou insuficientes para o processamento no laboratório.

## 5.6 Análises Estatística

Foi realizada uma análise estatística descritiva da distribuição de frequência das cepas de micobactérias isoladas em meio de cultura a partir de amostras clínicas de origem pulmonar e extrapulmonar obtidas de pacientes com suspeita de infecção por micobactérias, comparando os resultados dos diferentes testes com o padrão ouro (cultura com testes fenotípicos e bioquímicos) e entre si.

## 5.7 Coleta e processamento dos espécimes biológicos

O tipo de amostra clínica foi coletado de acordo com a forma da TB que estava sendo investigada.

- a) Sangue: 5,0 mL de sangue por punção venosa usando tubos (Vacutainer®, Becton and Dickson, England) contendo EDTA, mantendo-os à temperatura ambiente (de 25 a 30°C) até serem processadas no CPqAM (isolamento das células mononucleares e extração).
- b) Urina: 30 mL de urina dividida em 3 coletas consecutivas e diárias em tubos secos estéreis (10 mL) de cada paciente. As amostras de urina foram coletadas após higienização pessoal prévia e descarte do primeiro jato. As amostras poderiam ser armazenadas em geladeira até serem entregues as três juntas ao Laboratório de Imunoepidemiologia. No laboratório do CPqAM foram centrifugadas cada amostra de urina, individualmente, em tubo para centrífuga de 50 mL por 20min a 3000rpm e, em seguida, foram descontaminadas segundo o protocolo de Petroff (BRASIL,1994).
- c) Escarro: Foram coletados 1-5 mL de escarro obtido através eliminação espontânea em tubo seco rosqueado e estéril, em uma única amostra com o paciente em jejum, ao acordar.
- d) Líquido Pleural: Foram coletados de 2-10 mL do líquido pleural em tubo contendo anticoagulante EDTA, dos pacientes internados que houvesse necessidade dessa coleta.

e) Lavado bronco-alveolar: Foram coletados de 2-10 mL de líquido bronco-alveolar seguindo o procedimento padrão de coleta do hospital onde o paciente estivesse sendo acompanhado.

Todos os espécimes biológicos foram coletados antes do início de qualquer tratamento específico para tuberculose. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao CPqAM num prazo máximo de 4 horas e estocadas entre 4 a 8° C, por não mais que 24 horas e descontaminadas pelo Método de Petroff (BRASIL, 1994), exceto sangue. Após o processamento de descontaminação as alíquotas restantes de cada amostra foram congeladas e armazenadas no laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM para repetição das técnicas, caso necessário durante o estudo.

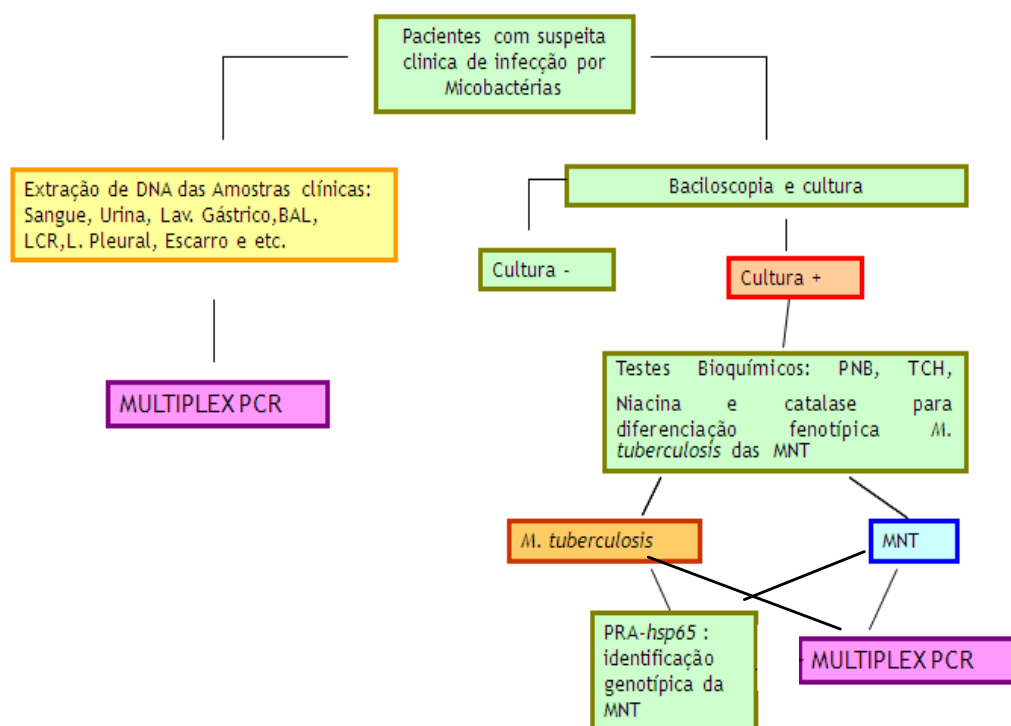


Figura 3: Fluxograma da coleta das amostras clínicas, isolamento e identificação de cepas de micobactérias, pelos métodos convencionais e moleculares.

**Baciloscopia:** O protocolo de coloração pelo método de Ziehl-Neelsen para a identificação e a quantificação do BAAR foi realizado de acordo com as normas técnicas do Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 2005).

### **5.8 Cultura e identificação de micobactérias em meio Löwestein-Jensen a partir das amostras biológicas**

Após descontaminação das amostras, exceto do sangue, o sedimento foi ressuspenso em 2 mL de água esterelizada. Em seguida, com pipeta de Pasteur, foram semeadas de 3 a 4 gotas (0,2 mL) do sedimento em 2 tubos de meio Löwenstein-Jensen, em mais um tubo de meio Löwenstein-Jensen com ácido para-nitrobenzóico (PNB) e num terceiro tubo com meio Löwenstein-Jensen e hidrazida do ácido tiofeno (TCH). Os tubos foram incubados em estufa a 37°C onde foram observados semanalmente até a 8ª semana, ou até quando ocorresse crescimento de colônias em algum tubo. Todos os meios foram preparados no Lab. de Imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ e passaram por testes de esterilidade (estufa a 37°C sem inoculação de amostra) e controle de qualidade do meio (inoculação de cepa de referência H37Rv de *M. tuberculosis*). Foram realizados os testes bioquímicos e de suscetibilidade ao ácido para-nitrobenzóico (PNB) e a Hidrazida do ácido tiofeno 2 carboxílico(TCH), acumulação de Niacina e catalase termoestável a 68 °C para identificação das micobactérias (BRASIL, 2005). Considerou-se como padrão ouro a cultura com testes fenotípicos e bioquímicos para identificação e diferenciação das micobactérias, sendo estas provas realizadas no estudo, capazes de diferencia *M. tuberculosis* das MNT.

### **5.9 Cepas de referência de micobactérias**

As cepas de referência: *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv), *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium massiliense* foram cedidas pelo laboratório de micobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UNIFESP/IMPPG-UFRJ). Estes microrganismos foram utilizados como controle dos sistemas baseados em PCR.

## 6.0 Extração de DNA genômico de micobactérias

O DNA das cepas de referência e cepas isoladas de amostras clínicas de pacientes em meio Löwestein-Jensen foi extraído e purificado através do método convencional utilizando uma mistura de solventes, fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Sendo retiradas duas alças com colônias de micobactérias do meio de cultura e colocadas em 100µL de água destilada e esterelizada. Na primeira etapa da extração a suspensão foi aquecida em bloco seco à 100°C por 10min, em seguida congelada a -75°C por 20min. Após o descongelamento da amostra foi adicionado 400µL de uma solução de lise composta por (NaCl 100mM; TrisCl 10mM, pH 8; dodecilsulfato de sódio (SDS) 0,5%) e 6µL de proteinase K e incubada novamente a 65°C por 30min. Na segunda etapa da extração foi adicionado uma solução de fenol/fenol-cloroformio(1:1)/Cloroformio, utilizando um volume 500µL dos solventes e a cada etapa a amostra foi centrifugada a 5000rpm por 3min. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido com isopropanol absoluto gelado e mantido no congelador por no mínimo 4 horas. Na última etapa o álcool foi desprezado e o precipitado seco em temperatura ambiente por alguns minutos, sendo em seguida ressuspendido com 50µL de água milli-Q e estocado a -20°C para posterior quantificação em espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech) para ser utilizado nas reações de PCR.

### 6.1 Extração de DNA das amostras biológicas:

Para a extração do DNA das amostras biológicas foram testados quatro diferentes protocolos de extração:

1- O protocolo “in house” de Rossetti et al (1997) com modificações: Uma alíquota de 500µl da amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 10 min e acrescida de 3 lavagens com tampão Tris-EDTA (TE). O sedimento foi ressuspendido em 100µl de TE 1x e aquecido em termobloco à 100°C por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado 5µl de resina (Sephaglas BandPrep Kit, Amersham Pharmacia Biotech) mais 2 vezes o volume final de uma solução de Iodeto de Sódio (0,9g/mL) e manualmente agitado por 5 min. Em seguida foi incubado à temperatura ambiente por mais 5

min. Os tubos foram centrifugados por 1 minuto, descartando o sobrenadante e adicionando 200µl de etanol a 70%, novamente agitando e centrifugando por 1 minuto. O sedimento foi deixado à temperatura ambiente durante 60 minutos, para a secagem completa e ressuspenso com 40µl de TE sendo incubado em banho-maria a 50°C por 10 min. Após centrifugação por 1 min, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, previamente numerado e estocado a -20°C, até a ocasião de uso na PCR.

Também foram testados os seguintes kits: 2- O Kit Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit ( GE Healthcare) , 3- O Kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook ( QIAGEN) e 4- AccuPrep Genomic DNA Extration Kit ( BIONEER), seguindo o protocolos propostos pelos fabricantes.

Esta etapa foi realizada para comparação e identificação do método de extração mais eficiente que pudesse ser utilizado na Multiplex PCR. Controles negativos contendo apenas Tris-EDTA (TE) foram incluídos a cada série de extração para controle de contaminação deste processo.

## **6.2 Caracterização genotípica das cepas de micobactérias não tuberculosas:**

Para caracterização das cepas micobactérias não tuberculosas foi realizado no Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM/Fiocruz a técnica de PRA (polymerase chain reaction and restriction enzyme analyze) específica do gene hsp65 que codifica a região de choque térmico de 65KD e análise de enzimas de restrição do produto gerado pelo PCR, através da eletroforese. Foi utilizado o protocolo do laboratório do Depto. Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes-UFRJ: 2µL do DNA extraído das cepas pelo método fenol/clorofórmio foi adicionado a uma mistura contendo: 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 0,5 µL de formamida e 25pmoles/ µL de cada oligonucleotídeo Tb11(5' ACCAACGATGGTGTGTCAT) e Tb12 (5' CTTGTCTGAACCGCATAACCCT), perfazendo um volume final de 50µL. A mistura de reação passou por uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos. A amplificação foi realizada no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf AG), sendo composta por 45 ciclos, com desnaturação a 94°C por 1 minuto,

anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 7 min. Tendo como produto final um fragmento de 439 pb.

Os produtos amplificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*, separadamente. As reações de digestão foram feitas em volume final de 10µL, contendo 10U das enzimas de restrição, tampão específico 10 vezes mais concentrado e 10µL do produto de PCR. As temperaturas e tempo de digestão foram de 60°C e 37°C por três horas para as enzimas *BstEII* e *HaeIII*, respectivamente. Os produtos digeridos foram separados em gel de agarose 3% em tampão TE 1x e o padrão de digestão foi visualizado em transiluminador, após ser corado com brometo de etídio. Para o cálculo do número e do tamanho dos fragmentos, foi utilizado como referência marcadores de peso molecular de 50pb aplicado nas laterais e de 25pb no centro de cada gel e as imagens foram capturadas em fotodocumentador. A identificação foi finalizada comparando-se os tamanhos dos fragmentos com o algoritmo descrito no site PRASITE ([HTTP://app.chuv.ch/prasite/index.html](http://app.chuv.ch/prasite/index.html)) (CHIMARA et al., 2008).

### 6.3 Descrição dos oligonucleotídeos que compõe a PCR multiplex

O primeiro par de oligonucleotídeos é específico para o gene que codifica o antígeno 65KDa do *M.tuberculosis*, e produz um amplicon de 165pb (SHINNICK, 1987).

**Tabela 1.** Características do 1ª par de oligonucleotídeos utilizados na PCR Multiplex

NOME	SEQÜÊNCIA	ALVO	ESPECIFICIDADE	REFERÊNCIA
<b>Oligonucleotídeo 1</b>	5' CTA GGT CGG GAC GGT GAG GCC AGG 3'	Gene <i>hsp65</i>	Gênero <i>Mycobacterium</i>	Shinnick, 1987
<b>Oligonucleotídeo 2</b>	5' CAT TGC GAA GTG ATT CCT CCG GAT 3'	Gene <i>hsp65</i>	Gênero <i>Mycobacterium</i>	Shinnick, 1987

O segundo par de oligonucleotídeo é específico para o gene *dnaJ* que produz um amplicon de 365pb, observado em *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*, mas não em outras espécies de micobactérias (TAKEWAKI et al., 1993).

**Tabela 2.** Características dos 2º par de oligonucleotídeos utilizados na PCR Multiplex.

NOME	SEQUÊNCIA	ALVO	ESPECIFICIDADE	REFERÊNCIA
<b>Oligonucleotídeo 3</b>	5' AAG AGG AAG GAG AGA GGG G 3'	Gene <i>dnaJ</i>	<i>M. tuberculosis</i> e <i>M. avium</i>	Takewaki <i>et al.</i> , 1993
<b>Oligonucleotídeo 4</b>	5' GTC GTT GAG GTT GAA CTC 3'	Gene <i>dnaJ</i>	<i>M. tuberculosis</i> e <i>M. avium</i>	Takewaki <i>et al.</i> , 1993

O terceiro par de oligonucleotídeos é específico para o elemento de inserção IS6110 que está presente nas cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, gerando um amplicon de 541pb (KOX *et al.*, 1994).

**Tabela 3.** Características do 3º par de oligonucleotídeos utilizados na PCR Multiplex.

NOME	SEQUÊNCIA	ALVO	ESPECIFICIDADE	REFERÊNCIA
<b>Oligonucleotídeo 5 (Pt-8)</b>	5' GTG CGG ATG GTC GCA GAG AT 3'	Seqüência de inserção IS6110	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	Kox <i>et al.</i> , 1994
<b>Oligonucleotídeo 6 (Pt-9)</b>	5' CTC GAT GCC CTC ACG GTT CA 3'	Seqüência de inserção IS6110	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	Kox <i>et al.</i> , 1994

#### 6.4 Condições da PCR multiplex

Na PCR multiplex, os três pares de oligonucleotídeos acima descritos, foram utilizados em uma única reação com a mistura contendo: 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de dNTP, 2.5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 20pmol, 50pmol e 10pmol de cada par de oligonucleotídeo, respectivamente. A essa mistura foram adicionados 10µL do produto de extração das amostras clínicas e quando realizada com DNA genômico de cepas de micobactérias foi adicionado 2µL de DNA com concentração de 20ng/µL de cada cepa, perfazendo um volume final de 50µL. A mistura de reação passou por uma pré-incubação de 85°C por 5 minutos e uma desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos. A amplificação foi realizada no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf AG), sendo

composta por 40 ciclos, com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos (POROCA et al., 2009).

### **6.5 Análise dos produtos da PCR**

Dez microlitros dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0% e corado com brometo de etídio. Os fragmentos de DNA separados através de eletroforese foram visualizadas em um transluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de documentação Kodak (Gel Logic 100 Imaging System), utilizando o software Kodak molecular imaging software 4.0.0. O marcador de peso molecular utilizado foi o Low DNA Mass Ladder sendo o mesmo composto por uma mistura equimolar contendo seis fragmentos de DNA com 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100pb cada.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Casuística**

No presente estudo foram incluídos 40 pacientes com diagnóstico final de tuberculose realizado pelo médico assistente do serviço de saúde, sendo 63,15% do sexo masculino e 36,85% feminino, a idade variou de 27 a 64 anos (mediana de 44 anos), 27,3% foram de atendimento ambulatorial e 72,7% de enfermaria. A forma clínica predominante da doença foi a forma pulmonar 85% e 15% extrapulmonar. Os principais sintomas clínicos apresentados foram: tosse em 80% dos pacientes, 62,5% apresentou febre e 90% perda de peso. Alguns pacientes estudados informaram apresentar doença pré-existente, tais como: tuberculose anterior (10%), HIV (10%), diabetes (7,5%), hanseníase (2,5%) e hipertensão arterial (2,5%). No que se refere aos dados laboratoriais do paciente, 82% dos pacientes tinham realizado radiografia de torax e 21,7% o teste tuberculínico de Mantoux. Do total de pacientes participantes do estudo não houve caso diagnosticado de micobactéria não tuberculosas



(MNT) pelos critérios utilizados nos serviços públicos de saúde para o diagnóstico de micobacterioses. As informações epidemiológicas, demográficas e clínicas estão descritas na tabela 4.

Tabela 4: Características clínicas e demográficas dos 40 pacientes com o diagnóstico final de tuberculose realizado pelo médico assistente do serviço de saúde.

<b>Características</b>	<b>TB pulmonar</b>	<b>TB extrapulmonar</b>
<b>Procedência</b>		
Ambulatório	11 (27,3%)	–
Enfermaria	24(60,1%)	5 (12,6%)
<b>Sexo</b>		
Masculino	27 (67,5%)	1 (2,5%)
Feminino	8 (20%)	4 (10%)
<b>Doença preexistente</b>		
HIV	2 (50%)	2 (50%)
TB Retratamento	4 (100%)	–
Diabetes	2 (66,66%)	1 (33,34)
Hipertensão arterial	1 (100%)	–
Hanseníase	1 (100%)	–

## 7.2 Espécimes biológicos coletados

Foi processado um total de 58 espécimes biológicos provenientes dos 40 pacientes diagnosticados com tuberculose. Dentre os espécimes analisados, 22 (38%) foram de origem pulmonar e 36 (62%) extrapulmonar, que se dividiram entre: amostras de escarro 20 (34,48%), lavado broncoalveolar 2 (3,44%), amostra sanguínea 23 (39,65%), urina 12 (20,68%) e aspirado de lesão de pele 1 (1,76%). Realizaram-se baciloscopia de 18 amostras sendo destas, 94,4 % positivas para BARR. Foram isoladas em meio de cultura, Löwenstein-Jensen 40 cepas sendo 23 (57,5%) cepas isoladas de escarro, 3 (7,5%) de Lavado broncoalveolar, 3 (7,5%) de líquido pleural, 8 (20% ) de urina, 2 (5%) de biopsia e 1 (2,5%) de lesão de pele.

Em relação as características fenotípicas e bioquímicas das 40 cepas de micobacterias estudadas, 55% foram caracterizadas como *M. tuberculosis*, 22,5% como micobacterias não

tuberculosas, 15% dos resultados foram inconclusivos e 7,5% não puderam ser realizado, pois não obtivemos uma quantidade de cultura suficiente para realização dos testes.

### 7.3 Avaliação de método de extração e purificação de DNA de micobactérias em espécimes biológicos através PCR multiplex

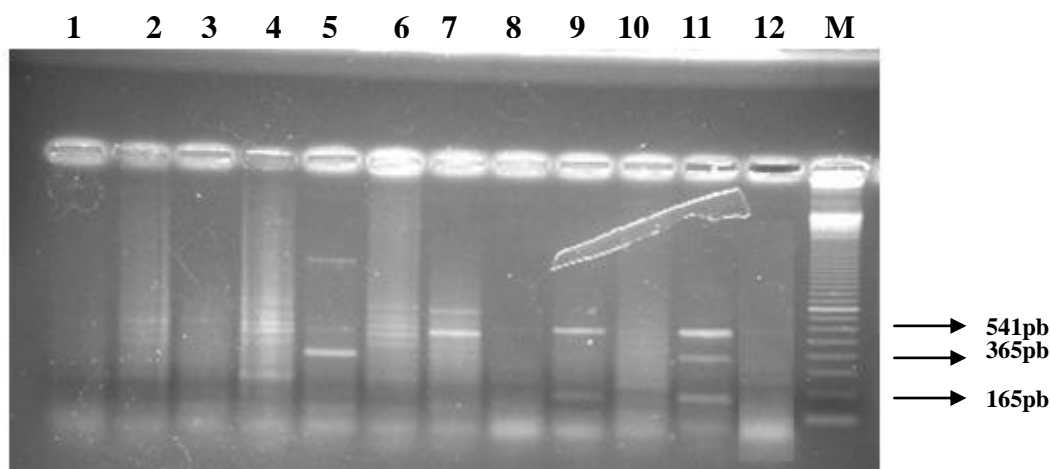
Na pesquisa foram utilizados um total de 65 espécimes biológicos, sendo as 58 amostras descritas no item 7.2 mais 7 amostras que não tiveram cepas isoladas em cultura, porém os pacientes tiveram o diagnóstico de Tb confirmado pelo médico do serviço de saúde, sendo processadas 12,3% (n=8) das amostras pelo protocolo segundo Rossetti et al (1997), 12,3% (n=8) seguindo o protocolo proposto pelo fabricante dos kits Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit ( GE Healthcare), 4,6% (n=3) AccuPrep Genomic DNA Extration Kit ( BIONEER) e 70,7% (n=46) QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook ( QIAGEN). Avaliados por meio da técnica de PCR multiplex, como sumarizado na tabela 5.

Tabela 5: Protocolos de extração e tipos de amostras clínicas

Protocolo de extração	Amostras pulmonares	Amostras extrapulmonares	Total
Rossetti,1997	2 (25%)	6 (75%)	8 (100%)
Illustra	2 (25%)	6 (75%)	8 (100%)
Qiagen	19 (41,4%)	27 (58,6%)	46 (100%)
Bionner	1(33,4%)	2 (66,6%)	3 (100%)
Total	24 (52,31%)	31 (47,69%)	65 (100%)

Após avaliação dos diferentes protocolos de extração, foi visualizada amplificação específica do alvo IS6110, na amostra do poço 7, os alvos *dnaJ* e IS6110 no poço 5 e no poço 9 foi observada a amplificação dos alvos IS6110 e *hsp65* simultaneamente de escarros coletados de paciente bacilífero, com diagnóstico Tb pulmonar, quando utilizado o Kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook (QIAGEN) como demonstrado na figura 5. Nos métodos de extração “in house” Rossetti, 1997, Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit ( GE Healthcare) e AccuPrep Genomic DNA Extration Kit ( BIONEER) não houve amplificação

quando utilizadas amostras de escarro coletadas de paciente bacilífero através da técnica de PCR multiplex.

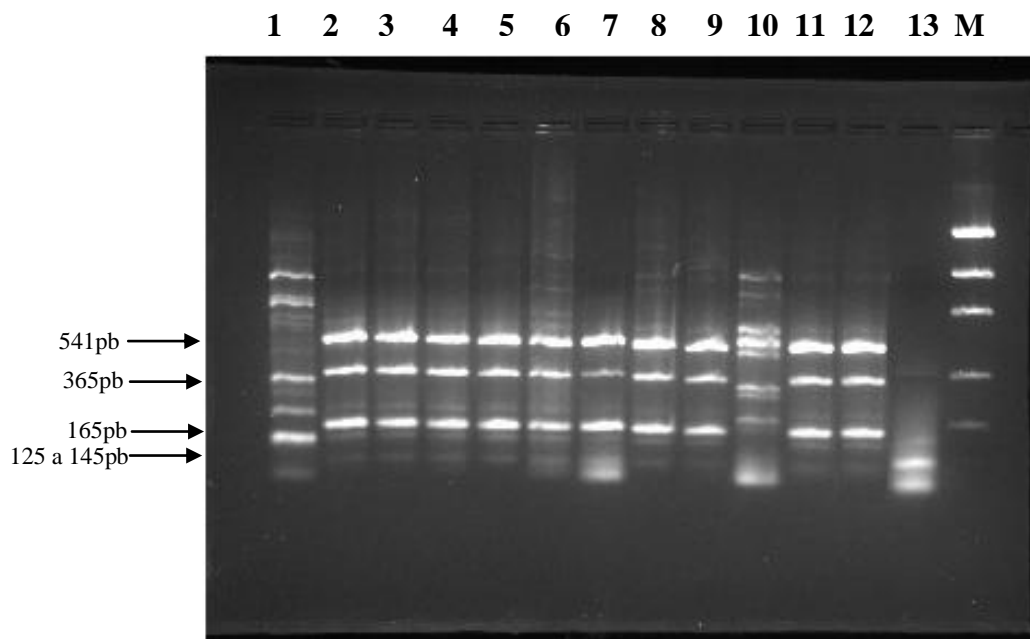


**Figura 4: Gel de agarose com produto da PCR multiplex com escarro bacilíferos**

**Nota:** A faixa M representa o marcador molecular 50pb DNA Ladder ( New England BioLabs), as faixas de 1 a 10 representam DNA de micobactérias extraídos de amostras de escarro utilizando o Kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook (QIAGEN), 11- Controle positivo (DNA genômico de *M. tuberculosis* H37RV), 12- controle negativo da reação

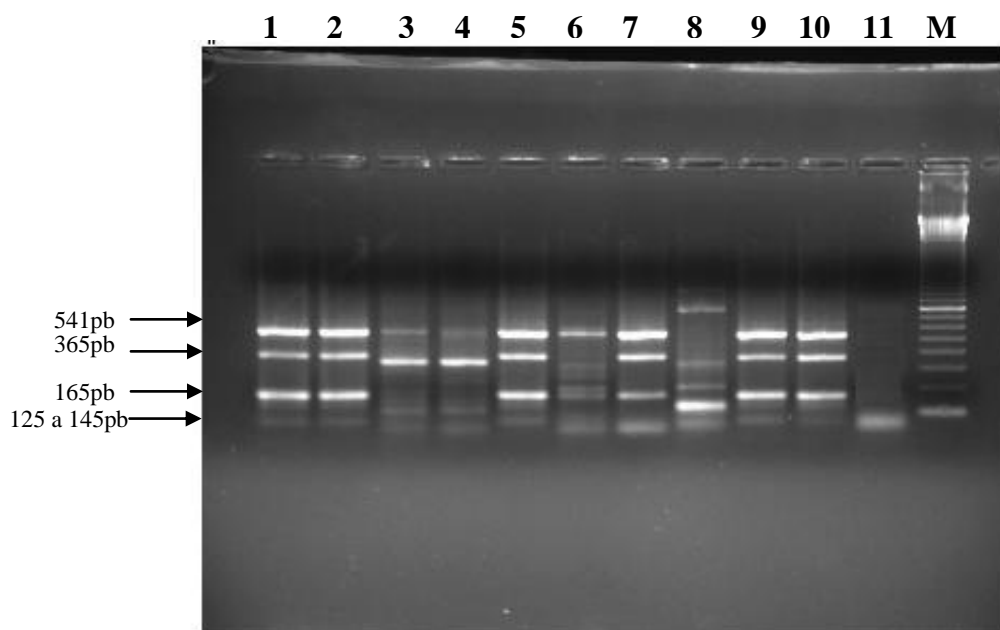
#### **7.4 Avaliação do padrão molecular de identificação estabelecido pelo sistema de PCR multiplex em cepas de micobactérias isoladas em meio de cultura.**

A PCR multiplex foi também testada utilizando DNA genômico extraído pelo método fenol clorofórmio de 40 cepas isoladas de amostras pulmonares e extrapulmonares em meio de cultura Löwenstein-Jensen. Destas 40 cepas de micobactérias estudadas, 27 apresentaram padrão molecular de *M. tuberculosis* pela PCR multiplex, com amplificação dos três alvos IS6110, *dnaJ* e *hsp65* simultaneamente. Nas 13 cepas restantes foi visualizado um padrão de amplificação inespecífico, ou seja, estas não apresentaram padrão de bandejamento esperado conforme o obtido no processo de otimização da técnica de PCR multiplex (POROCA et al., 2009), porém houve a amplificação do fragmento de tamanho 20 a 40 pares de bases menor que 165pb em algumas cepas de micobactérias, o que as caracterizou como MNT na PCR multiplex (Figuras 5 e 6).



**Figura 5: PCR multiplex de cepas isoladas de amostras de pacientes**

**Nota:** A faixa M representa o marcador de peso molecular Low mass Ladder®, nas faixas 1 a 10 cepas isoladas de pacientes extraídos pelo método fenol/ cloroformio, 11 e 12 Controle positivo (DNA genômico de *M. tuberculosis*), 13- controle negativo da reação



**Figura 6: PCR multiplex de cepas isoladas de amostras de pacientes**

**Nota:** A faixa M representa o marcador de peso molecular 50pb DNA Ladder (New England BioLabs), nas faixas 1 a 8 cepas isoladas de pacientes extraídos pelo método fenol cloroformio, 9 e 10 Controle positivo (DNA genômico de *M. tuberculosis*), 11- controle negativo da reação

### 7.5 Comparação do método de PCR multiplex com os métodos laboratoriais convencionais de diagnóstico da tuberculose.

Do total de 40 cepas estudadas 67,5% (n= 27) foram identificadas como *Mycobacterium tuberculosis* quando foi realizado a PCR multiplex e 32,5% (n=13) tiveram um padrão de bandeamento inespecífico.

Quando comparamos os resultados da PCR multiplex realizados nas cepas isoladas de amostras clínicas com a cultura e os testes fenotípicos e bioquímicos realizados em 31 cepas, total de cepas que foram caracterizadas e identificadas utilizando testes fenotípicos e bioquímicos verificamos que houve 93,3 % de concordância dos resultados. Tabela 6

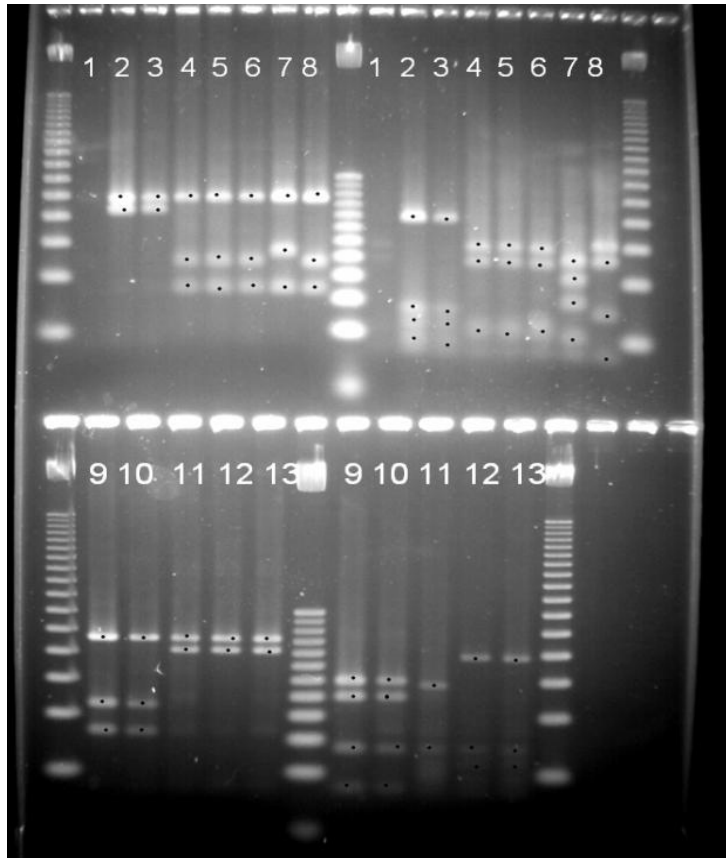
Tabela 6- Concordância da PCR multiplex com o padrão-ouro em cepas de micobactérias isoladas de amostras clínicas.

Cultura e testes fenotípicos e bioquímicos	PCR Multiplex
<i>M. tuberculosis</i>	21 (95,4%)
MNT	7 (87,5%)
<b>Total</b>	<b>28 ( 93,3%)</b>

Nota: MNT Micobactérias não tuberculosas

### 7.6 Comparação do método de PCR multiplex com a metodologia do PRA–hsp65 na identificação de micobactérias

Nesta etapa do estudo, as 40 cepas de micobactérias isoladas de amostras clínicas foram identificadas através da análise do padrão de bandeamento obtido pela técnica do PRA–hsp65. Destas 72,5% ( n= 29) foram identificadas como sendo do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, 10% (n=4) *Mycobacterium fortuitum* 2; 2,5% (n=1) da espécie *Mycobacterium abscessus* 2/*Mycobacterium bolletii*/*Mycobacterium massiliense*, 2,5% (n=1) *Mycobacterium. gastr* 2 / *Mycobacterium kansasii* 6 , 2,5% (n=1) *Mycobacterium parmense tipo 1* e 10% (n=4) não foi possível visualizarmos restrição. A figura 7 representa algumas das cepas identificadas em gel de agarose a 3% a partir do produto de restrição obtido pela técnica do PRA-hsp65.



**Figura 7: PRA-hp65 de cepas isoladas de amostras clínicas de pacientes**

**Nota:** As faixas 1 a 10 representam o padrão de restrição de cepas isoladas de amostras de pacientes utilizando as enzimas *BstEII* e *HaeIII* respectivamente, 11-(cepa de referencia de *M. abscessus* 1), 12 e 13(cepa de referencia de *M. abscessus* 2/*M. bolletii*/*M. massiliense*) como controles. Os marcadores de peso molecular utilizados foram de 50pb DNA Ladder nas laterais e o de Low Molecular Weight DNA ladder no centro do gel de agarose a 3%.

Os resultados da identificação de 36 cepas de micobactérias onde foi possível a visualização do padrão de restrição utilizando a técnica do PRA-hsp65 foram comparados com os resultados da PCR multiplex e verificamos que houve 100% de concordância nos resultados. Tabela 7

Tabela 7: 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>CMTB</i>	29 ( 100%)
<i>MNT</i>	7 (100%)
<b>Total</b>	<b>36 (100%)</b>

Nota: CMTB- Complexo *Mycobacterium tubérculos*, MNT- Micobactérias não tuberculosas

### 7.7 Comparação da PCR multiplex com o diagnóstico final do paciente

Quando comparamos os resultados obtidos da PCR multiplex realizados em 40 cepas isoladas de amostras clínicas com o diagnóstico final realizado pelos profissionais médicos dos serviços de saúde, verificamos que 67,5% (n=27) dos resultados obtido na PCR multiplex concordaram com o diagnóstico final dos pacientes e 32,5% (n=13) apresentaram padrão molecular considerado de MNT, não concordando com o diagnóstico de tuberculose. Dentre estes treze casos, 23% (n=3) estavam iniciando o segundo esquema para o tratamento de tuberculose (retratamento).

Comparamos os resultados da PCR multiplex, PRA-hsp65 e diagnóstico final do paciente com os resultados do padrão ouro (cultura e testes fenotípicos e bioquímicos) de 31 cepas, e os mesmos estão sumarizado na tabela 8.

Tabela 8: Concordância dos resultados da PCR multiplex, PRA-hsp65 e diagnóstico final feito pelo médico do serviço de saúde com a cultura, testes fenotípicos e bioquímicos em cepas de micobactérias isoladas de amostras clínicas.

Testes fenotípicos e bioquímico	PCR multiplex	PRA-hsp65	Diagnóstico do médico
CMTB	95,4%	95,45%	75%
MNT	87,5%	87,5%	-

Nota: CMTB- Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, MNT- Micobactérias não tuberculosas

## 8. DISCUSSÃO

A tuberculose, doença tão antiga que quase se confunde com a própria história do homem, mantém-se como importante problema de saúde pública (HIJJAR, 2001). A tuberculose não é uma doença individual, mas sim social que se espalha através do ar e contamina outros membros da sociedade sem o seu conhecimento ou consentimento. É uma doença passível de prevenção e cura, desde que diagnosticada e tratada adequadamente dependendo, portanto, de um adequado e responsável sistema de saúde (SBARBARO, 1997).

O agente causador da tuberculose, considerada uma emergência global devido ao elevado número de mortes e novos casos, pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). No entanto, outras espécies citadas como micobactérias não tuberculosas (MNT) também estão associadas à doença humana desde a década de 30 e sua frequência tem aumentado nos últimos anos em todo o mundo (BRANCJ, 1931; PRIMM et al., 2004).

Embora o diagnóstico destas doenças ainda seja realizado primeiramente com base em métodos convencionais, como baciloscopia e cultura, muitos métodos moleculares estão sendo introduzidos e incorporados nas rotinas dos laboratórios de micobacteriologia (CHIMARA, 2009).

O paradoxo entre os avanços no diagnóstico e no tratamento da TB e as altas taxas de incidência e mortalidade nos países em desenvolvimento recai sobre a questão da vulnerabilidade. A vulnerabilidade é o conjunto de fatores de natureza biológica, epidemiológica, social, cultural e política, cuja interação amplia ou reduz o risco ou a proteção de um grupo populacional, frente a uma determinada doença, condição ou dano (BOMBARDA, 2009).

Em nosso estudo, os casos de tuberculose foram predominantes na população masculina (63,15%), correspondendo aos dados encontrados na literatura. Segundo Caliri & Figueiredo (2007) tal fato é justificado na literatura em virtude deste grupo ser mais exposto à doença quando comparada à população feminina. Em relação à faixa etária, os nossos dados (29 a 64 anos, com mediana de 44 anos) se apresentaram acima do padrão nacional com a prevalência da doença na faixa entre os 20-49 anos. No entanto, estudos mostram que nos últimos 20 anos houve uma elevação da incidência da tuberculose nas faixas etárias de 39-49 anos e de mais de 60 anos, fazendo com que a mediana de idade esteja em torno de 41 anos (ALVES et al., 2000). A maioria dos pacientes participantes do estudo foi proveniente de



enfermaria, provavelmente pela conduta clínica de internar os pacientes com baciloscopia positiva para iniciar o tratamento específico no serviço de saúde de onde tivemos a maior demanda de pacientes.

No presente trabalho verificamos que 10% dos pacientes estavam coinfetados HIV/TB, índice abaixo do encontrado no Brasil onde a prevalência do HIV nos pacientes com TB é de 20%, provavelmente os dados do nosso estudo não concordam com a prevalência brasileira devido ao número reduzido de pacientes coinfetados analisados na pesquisa. No entanto, a literatura descreve a tuberculose como a primeira causa de morte em pacientes com AIDS (BARREIRA, 2008). Em nosso estudo 75% dos coinfetados TB/HIV foram ao óbito durante o trabalho.

Nesta pesquisa 10% dos pacientes com suspeita de infecção por micobactérias informaram ter tido tuberculose anterior. Além da infecção pelo vírus HIV e diferentes fatores que causem imunossupressão, a literatura descreve outros fatores de risco para as infecções por micobactérias. A doença pulmonar por MNT geralmente ocorre em pacientes com doença pulmonar crônica como pneumoconiose, doença pulmonar obstrutiva crônica, tuberculose pré-existente, bronquite crônica, bronquiectasia e doença esofágica associada à aspiração crônica de material alimentar pelas vias aéreas (ATS, 1997; KOH et al., 2002).

A noção de que a diabetes mellitus e a tuberculose estão associadas é tão antiga e prevalente que há muito tempo é tida como certa. Em nosso estudo, 7,5% dos pacientes com suspeita de infecção por micobactérias tinham diabetes. Contudo, há poucos estudos exaustivos que permitam uma avaliação quantitativa da incidência da tuberculose em diabéticos, quando comparada com a de controles apropriados. Num grande estudo realizado na Filadélfia, nos anos 40, a incidência foi de 8.4% nos diabéticos e de 4.3% em trabalhadores industriais não diabéticos (BOUCOT et al., 1952). Na Suécia, Silver e Oscarsson, 1958 diagnosticaram tuberculose pulmonar em 3.4% dos seus diabéticos, contra 0.88% num grupo controle da população geral. Depois de ajustado para a idade e o sexo, o risco relativo estimado foi de 3.6. Opsahl et al (1961), encontraram uma incidência da doença, entre os diabéticos, três vezes superior à da população geral. Por outro lado, chama-se a atenção de que a diabetes se correlaciona positivamente com o aumento do índice de massa corporal, enquanto que o risco de tuberculose se correlaciona negativamente (PALMER et al., 1957; WAALER, 1984; TVERDAL, 1986), conduzindo a uma potencial subvalorização do risco de tuberculose nos diabéticos, se não for feito o devido ajuste em relação ao peso corporal.

A hipertensão arterial e hanseníase também foram citadas por 2,5% dos pacientes com suspeita de infecção por micobactérias participantes da pesquisa, porém não encontramos na

literatura dados que indique nenhuma dessas patologias como fator de risco para infecção por MNT e *M. tuberculosis*.

Atualmente, com o aumento no número de co-infecção HIV/TB e de cepas multirresistentes, além de apresentações atípicas da doença, nos deparamos com números alarmantes e que evidenciam a necessidade de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas (BOLLELA et al., 1999). Tradicionalmente, em laboratórios de saúde pública são usados métodos fenotípicos para identificação de micobactérias. Porém as condições de realização são críticas para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis, pois os mesmos variam de acordo com concentração de substrato, tempo da reação, composição do tampão, comprimento de onda usado para detectar os produtos, reagentes colorimétricos e qualidade e quantidade da cultura analisada. Além da demora para obtenção dos resultados, levando de quatro a oito semanas para o crescimento das cepas de micobactérias, podem apresentar resultados inconclusivos na presença de culturas mistas (MARTINS 2000, BLANCO et al., 2002, UEKI et al., 2005).

Avanços nas técnicas de biologia molecular e a informação proporcionada pelo sequenciamento do genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis* estimularam o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico rápido da tuberculose, inclusive na diferenciação de *M. tuberculosis* de outras micobactérias, além da detecção rápida de resistência a drogas (COLE, 1998; PALOMINO, 2005). Os testes baseados em PCR tem se mostrado promissores na detecção de micobactérias em amostras clínicas (BRISSON-NOEL, 1991; KHANDERKAR et al., 1994). A PCR multiplex tem como alvo alguns diferentes genes simultaneamente e têm sido utilizada na detecção e identificação de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas no diagnóstico laboratorial de rotina (KLEMEN et al., 1998; KIM et al., 2004; BHATTACHARY et al., 2003; POROCA et al., 2009)

Para o bom desempenho de técnicas baseadas em PCR, vários fatores têm que ser levados em consideração. Um deles é o método de extração de DNA (KRITSKI et al., 1997). Neste estudo para a escolha do método de extração que proporcionasse um melhor desempenho da PCR Multiplex em amostras clínicas de origem pulmonar e extrapulmonar foi considerado a observação da amplificação dos alvos específicos em diferentes espécimes biológicos. As amostras pulmonares de pacientes com bacterioscopia positiva foram as que apresentaram pelo menos a amplificação de um alvo específico, este resultado se deve, provavelmente pelo maior número de bacilos presentes neste tipo de amostra clínica. As amostras extrapulmonares utilizadas são paucibacilares, pois foram coletadas de sítios

distintos do local da infecção, além disso, durante as etapas de descontaminação e extração das amostras clínicas ocorrem perda de DNA do bacilo. Sendo necessária a otimização destas etapas para utilização da PCR em amostras clínicas. A maioria dos estudos avalia sistemas baseados em PCR multiplex para identificação e diferenciação utilizando cepas de micobactérias isoladas em meio de cultura, provavelmente pela dificuldade de se conseguir validar estes sistemas em espécimes biológicas (KURABACHEW et al., 2004; BAKSHI et al., 2005; AHMAD et al., 2007). Conforme o encontrado na literatura, às amostras extrapulmonares são na maioria das vezes paucibacilares e com maior número de inibidores da PCR. Além disso, a hemoglobina presente no sangue pode inibir a PCR porque os íons  $Fe^{++}$  competem com os íons  $Mg^{++}$ , fundamentais na ação da enzima DNA polimerase. E mesmo depois do processo de extração do DNA, esses inibidores podem permanecer na amostra por apresentarem resistentes à fervura, não serem destruídos por proteinases e não serem dissolvidos em solventes orgânicos (AN et al., 1991; BAREA et al., 2004). Além de outros inibidores presentes nas amostras clínicas de origem extrapulmonar, como à quantidade enorme de componentes de sais presentes na urina, enzimas, outras bactérias que por ventura poderiam atrapalhar o processo de purificação de DNA (LIMA, 2006). Diante dos resultados obtidos com PCR multiplex em amostras clínicas pulmonares verificamos a necessidade de este sistema passar por uma etapa de otimização com amostras pulmonares sabidamente bacilíferas para avaliarmos a possibilidade esta ferramenta ser utilizada com este perfil de amostra na detecção de DNA de micobactérias.

Quando a PCR multiplex foi utilizada na diferenciação de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* das MNT isoladas em meio de cultura foi verificado um bom grau de concordância com o padrão ouro (cultura e testes fenotípicos e bioquímico), 93,3%. Quando comparamos o grau de concordância da PCR multiplex e do PRA-hsp65 com o padrão ouro observamos que as duas ferramentas moleculares obtiveram o mesmo grau de concordância tanto para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* como para as MNT, 95,45% e 87,5% respectivamente. Porém vale ressaltar que a PCR multiplex devido à amplificação de três diferentes alvos específicos na mesma reação tem a capacidade de, não apenas dizer que a cepa é do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mas diferenciar as espécies de *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium* (POROCA et al., 2009; BHATTACHARY et al., 2003). Enquanto que o PRA-hsp65 não diferencia as cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mas é capaz de através do padrão de restrição, fazer a identificação da maioria das espécies de MNT (CHIMARA, 2005; BRUNELLO et al., 2001).

O Sistema de PCR multiplex avaliado neste estudo obteve excelente grau de concordância, 100%, quando comparado com a técnica do PRA-hsp65 sendo considerado o padrão ouro na identificação de micobacterias. O PRA-hsp65 é uma técnica molecular indicada para identificação das MNT que vem sendo utilizada nos laboratórios de referências de micobactérias, porém esta ferramenta é indicada nos casos onde o crescimento na cultura e as características fenotípicas e bioquímicas sugerem o crescimento de cepas de MNT, além da necessidade de após a amplificação por PCR ser realizado a digestão com enzimas restrição específica, o que demanda tempo e custo elevado (CHIMARA, 2005).

Para o diagnóstico diferencial da tuberculose com o das doenças causadas por MNT é preciso muita cautela, pois os sintomas clínicos e as imagens radiológicas das MNT podem ser semelhantes ao da tuberculose. A baciloscopia, teste de triagem feito na rotina para o diagnóstico das doenças causadas por micobactérias, tem sensibilidade limitada e não tem a capacidade de diferenciar as espécies de micobactérias. A cultura em meio específico tem boa sensibilidade, mas demanda de quatro a oito semanas para o crescimento bacteriano prolongando o diagnóstico definitivo (SMITH et al., 1996; BRASIL, 2008)

Quando comparamos o padrão ouro (cultura e testes fenotípicos e bioquímicos) com o diagnóstico final dos médicos do serviço verificamos que apenas 75% dos casos de tuberculose foram diagnosticados pelos critérios utilizados nos serviços de saúde, concordando com os dados da literatura que demonstram que no Brasil, cerca de 26,7% dos pacientes são tratados sem confirmação da tuberculose pulmonar, baseado apenas no quadro clínico-radiológico que muitas vezes é inconclusivo (MELLO, 2001). Metade de todos os novos casos de tuberculose pulmonar apresenta baciloscopia negativa no diagnóstico inicial, assim se este fosse o único método empregado, metade dos casos não seria diagnosticado, além de não ser capaz de diferenciar as espécies de bactérias álcool ácido resistentes (MARRONE, 2005).

Para o diagnóstico de doenças causadas por MNT é necessário o isolamento destas micobactérias em uma amostra clínica considerada estéril e para as amostras não estéreis é preciso dois isolamentos e uma baciloscopia positiva para confirmação do diagnóstico bacteriológico, pois o isolamento em uma única amostra de sítios não-estéreis, como escarro, urina ou fezes, geralmente não tem significado clínico, sugerindo contaminação transitória (RAJU; SCHLUGER, 2000; VAN CREVEL, 2001; UEKI et al., 2005). Estudos demonstram que a presença de MNT em uma única amostra de origem não estéril requer investigação cuidadosa, e novas amostras devem ser examinadas para descartar a possibilidade de contaminação ou colonização transitória (UEKI et al., 2005).

Segundo Ueki et al (2005) houve um aumento nas taxas de isolamento das MNT na década de 1990 quando comparadas com as décadas passadas. No entanto, é difícil a correlação entre os isolamentos e o diagnóstico da doença devido à inexistência de uma regulamentação oficial brasileira estabelecendo critérios clínicos e bacteriológicos e, também pela falta de integração entre a clínica e o laboratório, de modo a garantir os diversos isolamentos do mesmo sítio. No nosso estudo, não houve nenhum caso diagnosticado pelos médicos dos serviços de saúde como sendo infecção por MNT, mostrando a necessidade do acompanhamento do paciente com a coleta de novos espécimes biológicos para a definição do diagnóstico de infecção causada por MNT. MARTINEZ et al (2007) salientam que a consideração da possibilidade de doenças causada por MNT é o primeiro passo para o diagnóstico correto e a instituição do tratamento adequado.

Em estudo feito no Instituto Evandro Chagas no Pará de 2004 a 2007 todos os pacientes infectados por micobactérias não tuberculosas foram detectados entre os casos diagnosticados como tuberculose pulmonar os quais foram tratados com o esquema antituberculose tradicional, ocorrendo fracasso no tratamento (COSTA et al., 2009). Em nosso trabalho houve três casos de pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar que estavam iniciando o segundo esquema de tratamento e em dois destes casos foram isolados em única amostra pulmonar cepas caracterizadas como MNT e em um dos casos tivemos a possibilidade de identificar como sendo da espécie de *M. gastri* 2/*M. kansasii* 6, utilizando o PRA-hsp65. Estes dados indicam a necessidade de investigação de infecções causadas por MNT em doenças pulmonares crônicas, pois diferentes estudos demonstram que as espécies de MNT mais frequentemente isoladas nos casos de doença são as pertencentes ao complexo *M. avium* (MAC) e *M. kansasii* (GARCÍA et al, 2005; GÓMEZ, 2009). Ainda em um estudo feito por Ueki et al (2005) foi demonstrado que a espécie mais prevalente em sítios pulmonares foi o *M. Kansasii* e o MAC em doenças disseminadas.

O *M. fortuitum* é uma micobactéria de crescimento rápido de potencial patogênico muito baixo, mas de importância clínica crescente, sendo com frequência adquirido em hospitais e podendo infectar pacientes com imunossupressão (HINRICHSEN, 2007). Extrapolando os nossos resultados e concordando com o encontrado na literatura, neste estudo, conseguimos isolar em meio de cultura LJ a mesma cepa de micobactéria em amostra de urina e líquido pleural, podendo neste caso ser definido o diagnóstico bacteriológico para MNT, segundo os critérios ATS (2007), já que o líquido pleural é considerado amostra estéril. As cepas foram caracterizadas através dos testes fenotípicos, PCR multiplex e PRA-hsp65 e então identificada como sendo *M. fortuitum*. Este paciente era portador do vírus HIV e foi diagnosticado como

sendo um caso de tuberculose pleural pelos médicos do serviço de saúde, indo a óbito no início do tratamento específico para tuberculose. Diferentes trabalhos demonstram a importância da infecção por *M. fortuitum* em pacientes portadores de imunossupressão, descrevendo que as espécies mais prevalentes, nestes casos, incluem *Mycobacterium avium* (MAC, 61%) seguidos do *Mycobacterium fortuitum* (19%) e *Mycobacterium Kasassi* (10%) (PHILLIPS; VON, 2001; GUIDE et al., 2002).

Enfatizamos que os resultados da PCR multiplex não foram utilizados como critérios de definição em nenhum dos casos de doenças causadas por micobactérias, sendo o diagnóstico realizado pelos médicos que acompanhava clinicamente o paciente nos serviços de saúde. Avaliando o custo e os benefícios da PCR multiplex como exame laboratorial para diferenciação cepas do CMT das MNT, devemos levar em consideração principalmente a rapidez no resultado. Além de outras características importantes como o diagnóstico diferencial da tuberculose para as infecções causadas por MNT, instituição do tratamento adequado precocemente, diminuição do tempo de internação de pacientes sem confirmação diagnóstica, além da redução dos índices de mortalidades, principalmente nos casos dos pacientes com imunodepressão. A padronização e desenvolvimento de novos sistemas de PCR tornam seu custo financeiro mais acessível, ressaltando que essa tecnologia deve ser utilizada apenas por centros de referência nos casos de diagnóstico diferencial entre tuberculose e doenças causadas por MNT que demandem diagnósticos mais rápidos e de qualidade. Sendo assim, seu custo é factível com a realidade deste perfil de pacientes.

A PCR multiplex pode ser utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial da tuberculose das infecções causadas pelas MNT. Entretanto ela não deve ser utilizada como único método laboratorial, sendo de fundamental importância que o diagnóstico diferencial seja fundamentado na análise conjunta de vários parâmetros como os testes fenotípicos e o PRA-hsp65, que identifiquem as espécies de MNT. Desta forma haverá a possibilidade de um diagnóstico rápido e preciso nos casos envolvidos em surtos de infecções por micobactérias não tuberculosas e nos casos de doença pulmonar crônica encaminhados ao centro de referência para o tratamento de tuberculose.

## 9. CONCLUSÕES

- A PCR multiplex é uma ferramenta auxiliar útil para somar-se as outras métodos no diagnóstico diferencial da tuberculose e as doenças causadas por MNT;
- É necessário uma otimização do sistema PCR multiplex para sua utilização em amostras clínicas pulmonares bacilíferas na detecção de DNA de micobactérias;
- A PCR multiplex foi capaz de identificar e diferenciar *M. tuberculosis* das MNT em cepas isoladas em meio de cultura.
- Comparação com o padrão ouro
- Comparação com o PRA-hsp65
- A PCR multiplex pode ser indicada principalmente em caso onde existe suspeita de infecção por micobactérias associada a fatores de risco, tempo prolongado para o diagnóstico diferencial e início precoce do tratamento específico.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN THORACIC SOCIETY. 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.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. An Official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment and prevention of nontuberculous Mycobacterial diseases. American journal of respiratory and critical care medicine, New York, v.175, p.367-416, 2007.

ALVES, R.; SANT'ANNA, C. C.; CUNHA, A. J. L. A. Epidemiologia da tuberculose infantil na cidade do Rio de Janeiro. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.34, n.4, p.409-410, 2000.

AN, S.F.; FLEMING, K.A. Removal of inhibitors of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin-wax embedded tissues. Journal of clinical pathology, London, v.44, p.924, 1991.

ADLE-BIASSTT, H. et al. Les mycobactéries non tuberculeuses. Annales de pathologie, Paris, v.23, n.3, p.216-35, 2003.

AHMAD, S.; MOKADDAS, E. Development and Evaluation of a multiplex pcr for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis Complex* members from nontuberculous mycobacteria. Japanese journal of infectious diseases, Tokyo, v. 60, p.140-144, 2007.

ANGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA (Brasil). Alerta sobre infecções por micobactéria não tuberculosa após videocirurgia. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2007/070307.htm>>: Acesso em : 10 dez. 2009.

ANGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA (Brasil). Infecções por Micobactéria: Nota Técnica, Brasília, DF. Disponível em : <[http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/NOTICIAS/2008/080808\\_2.htm](http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/NOTICIAS/2008/080808_2.htm)>. Acesso em : 10 dez 2009.

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR).



Revista brasileira de hematologia e hemoterapia, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

BARRETO, A. M. W. ; CAMPOS, C. E. D. Micobactérias não-tuberculosas no Brasil. Boletim de Pneumologia Sanitária, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 23-32, 2000.

BARRETO, J. A. et al. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from bone marrow aspirates of Aids patients in Brazil. Brazilian journal of infectious diseases, Salvador, v.168, p.777-779, 1993.

BARREIRA, D.; GRANGEIRO A. Avaliação das estratégias de controle da tuberculose no Brasil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.41, Supl. 1, 2007.

BARREIRA , D. Situação da tuberculose no Brasil e no mundo. Programa nacional de controle da tuberculose, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/divep/arquivos/COAGRAVOS/GT%20Tuberculose/Eventos/Oficina%20Monitoramento%20Maio%20de%202008/Programa%20Nacional%20de%20Controle%20da%20Tuberculose.pdf>>. Acesso em 05 mar 2010.

BAKSHI C.S.; SHAH D.H. et al. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7 kb fragment by a single tube multiplex-PCR. Veterinary Microbiology, Amsterdam, v.109, p. 211-216, 2005.

BLANCO, R.M. et al. Estratégias para identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 61, p.91-96, 2002.

BOUCOT K.R. et al. Tuberculosis among diabetics the Philadelphia survey. American review of respiratory disease, Boston,v. 65, p. 1-50, 1952.

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, Oxford, v.8, n.2, p.150-157, 2003.

BOLLELA , V. R.; SATO, D.N.; FONSECA, B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 33, n.3, p. 281-286, 1999.

BOMBARDA S. Aspectos atuais e perspectivas futuras da Tuberculose. Pneumologia Paulista, São Paulo, v. 22, p.5, n.5, 2009.

BRANCI, A. Avian tubercle bacillus infection, with special reference to mammals and to man: its reported association with Hodgkin's disease. Archives of pathology, Chicago, v. 12, p. 253-74, 1931.

BRASIL. Secretária de Ciências, tecnologia e insumos estratégicos. Identificação de micobactérias pelo método de PCR-análise de restrição (PRA-hsp65) em um laboratório de referência e elaboração de um algoritmo de padrões de PRA-hsp65. São Paulo: Editora Ministério da Saúde, 2008.

CENTRO DE REFERÊNCIA PROF. HÉLIO FRAGA. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2002.

BRASIL. Secretaria Estadual da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento. São Paulo, 2005.

BRASIL. Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (RENISS). 27 fev 2009. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite\\_micobacteria/notificados.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/notificados.pdf)>. Acesso em: 27 fev. 2009.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Indicadores de Morbidade e Fatores de Risco. Taxa de Incidência de Tuberculose. Mar. 2009. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2007/d0202.def>>. Acesso em: 20 mar. 2009.

BRASIL. Secretaria Vigilância em saúde. Tópicos de saúde: Tuberculose. Informações Para Profissionais. Fev. 2007, Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23497](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23497)>. Acesso em: 19 fev 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em saúde. Tópicos de saúde: Tuberculose. Situação Atual da Doença. Mar 2007, Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23499](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=23499)>. Acesso em: 19 mar 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em saúde. Tópicos de saúde: Tuberculose. Informações gerais – O que todos devem saber. Abr 2007. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/.cfm?idtxt=23495>>. Acesso em: 27 abr 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tuberculose. Ago 2007. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21445](http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21445)>. Acesso em: 6 ago. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes operacionais dos pactos pela vida, em defesa do SUS e de gestão. Brasília, DF, 2006.

CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA, Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994.

CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA, Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3. ed. Rio de Janeiro 2005.

BRUNELLO, F. et al. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v. 39, p. 2799-806, 2001.

BRISSON-NOE, L, A. et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet, London, v. 338, p.364–366, 1991.

CAMPOS, H. S. Manejo da doença micobacteriana não tuberculosa. Boletim de Pneumologia Sanitária, Rio de Janeiro, v.8, n.2, p.39-50, 2000.

CALIARI, S. J.; FIGUEIREDO, M. R. Perfil dos pacientes com tuberculose internados em hospital especializado no Brasil. Revista panamericana de infectología. São Paulo, v.9, n.4, p.34-35, 2007.

CASTRO, C. M., et al. Molecular identification of non-tuberculous mycobacteria. Biomédica, Bogotá, v. 27, n.3, p.439-446, 2007.

CHEML, A. L. K. C.; PORTAELS, F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. Current opinion in infectious diseases, London, v. 16, p 77-83, 2003.

CHIMARA E.; FERRAZOLI L. Diagnóstico bacteriológico da Tuberculose e outras micobacterioses. Pneumologia Paulista. São Paulo, v. 22, n.5, p. 25-29, 2009.

CHIMARA, E. Realible identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)- hsp65 in a referente laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. BMC biotechnology, London, v.20, p.8-48, 2008.

CHIMARA, E. Avaliação de métodos moleculares para identificação de micobactérias e elaboração de um algoritmo de indentificação. 2005. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2005.

COLE, S.T. et al. Deciphering the Biology of Mycobacterium tuberculosis from the Complete Genome Sequence. Nature, London, v. 393, p. 537-544, 1998.

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.

DEVALLOIS, A.; GOH, K.S.; RASTOGI, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v. 35, n.11, p.2969-2973, 1997.

DORMAN, S. E.; HOLLAND, S. M. Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 pathway defects and human disease. Cytokine and growth factor reviews, Oxford, v.11, p.321-33, 2000.

DUARTE, R. S. et al. Epidemic of Postsurgical Infections Caused by *Mycobacterium massiliense*. Journal of Clinical Microbiology, Washington, DC, v.47, n.7, p. 2149–2155, 2009.

EUZÊBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>>. Acesso em: 09 mar 2007.

ESTEBAN, J.; ORTIZ, G. C. A.; ROBLAS, R. F. Infecciones por micobacterias atípicas. Medicine, Madri, v.9, n.56, p. 3632-3638, 2006.

FERREIRA, R. M. C., et al. Non-tuberculous mycobacteria I: one year clinical isolates identification in Tertiary Hospital Aids Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in pre highly active antiretroviral therapy era. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 725-9, 2002.

GARCIA-QUINTANILLA, A., et al. Simultaneous identification of Mycobacterium genus and Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v.40, p.4646–4651, 2002.

GARCÍA, J. M. G.; GUTIÉRREZ, P.J.J.; SÁNCHEZ, A. A. A. Respiratory infections caused by environmental mycobacteria. Archivos de bronconeumologia, Barcelona, v. 41, n.4, p.206-19, 2005.

GÓMEZ, N. A. Micobacterias no tuberculosas: una infección emergente? Non- tuberculous mycobacteria: an emerging disease? Anales de pediatria, Barcelona, v. 16, p.163-86, 2002.

GRIFFITH, D.E. et al. ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. American journal of respiratory and critical care medicine, New York, v. 175, n.4, p.367-416, 2007.

HENRY, M.T. et al. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. European respiratory journal, Copenhagen, v. 23, p.741-746, 2004.

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.

HERRERA-LEÓN, L.; POZUELO-DÍAZ, R. et al. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies Del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, Barcelona v. 10, p.1-7, 2009.

HIJAR, M. A., OLIVEIRA, M. J. P. R. T.; GILMÁRIO, M. A tuberculose no Brasil e no mundo. Boletim de pneumologia sanitária, Rio de Janeiro, v.9, n.2, p.9-16, 2001.

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

JARZEMBOWSKI, J.A.; YOUNG, M. B. Nontuberculous Mycobacterial infections. Archives of pathology and laboratory medicine, Chicago, v. 132, p.1333-1338, 2008.

LIMA, A. J. A. et al. Diagnóstico laboratorial das micobactérias isoladas na urina: comparação entre métodos convencionais e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Revista brasileira de análises clínicas, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 141-145, 2006.

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

KOH, W.J.; KWON, O.J.; LEE, K.S. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent. Korean journal of radiology, Seoul, v.3, p. 145-57, 2002.

KOX, L.L.F. et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology, Washington, DC, v.32, p. 672-678, 1994.

KRITSKI, A. L.; CASTELO, A.; MELLO, F. C. Q. Reação em cadeia da polimerase(RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. Jornal brasileiro de pneumologia, Brasília, DF, v. 23, n. 1, p.33-42, 1997.

KURABACHEW, M. et al. A multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group-, and species-specific detection of mycobacteria. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v.49, p. 99-104, 2004.

MARQUES, A. M. C.; CUNHA, R. V. A medicação assistida e os índices de cura de tuberculose e de abandono de tratamento na população indígena Guarani-Kaiwá no Município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.19, n.5, p. 1405-11, 2003.

MARTINS, M.C. Estudo crítico da utilização das técnicas de biologia molecular na detecção e identificação de micobactérias, em especial, *Mycobacterium tuberculosis*. 2000 Dissertação (Mestrado) Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MARTÍNEZ-MORAGÓN, E. et al. Enfermedades por micobacterias ambientales em pacientes com y sin infección por El VIH: características epidemiológicas, clínicas y curso evolutivo. Archivos de bronconeumologia, Barcelona, v. 37, p.281-6, 2001.

MARTINEZ, S. et al. The many faces of pulmonary nontuberculous mycobacteria infection. American journal of roentgenology, Leesburg, v. 189, p.177-186, 2007.

MARRAS, T.K. et al. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003. Thorax, London, v. 62, p. 661-666, 2007.

MIGUEZ-BURBANO, M. et al. Non-tuberculous mycobacteria disease as a cause of hospitalization in HIV-infected subjects. International Journal of Infectious Diseases, Hamilton, v. 10, p. 47-55, 2004.

MARTÍN-CASABONA, N., et al. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. International journal of tuberculosis and lung disease, London, v.8, n.10, p.1186-93, 2004.

MURCIA-ARANGUREN, M. I. et al. Frequency of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in HIV infected patients from Bogotá, Colombia. BMC infectious diseases, London, v.1, p. U1-U7, 2001.

MORITA, Y. et al Genetic diversity of the dnaJ gene in the Mycobacterium avium complex. Journal of Medical Microbiology, Edinburgh, v.53, p. 813–817, 2004.

MUN, H.S. et al. Mycobacterium seoulense sp. nov., a slowly growing scotochromogenic species. International journal of systematic and evolutionary microbiology, Reading , v.57, n.3, p.594-599, 2007.

NEWPORT, M.J. et al. A mutation in the interferon- $\gamma$ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. New England journal of medicine, Boston, v. 335, p. 1941-9, 1996.

OSCARSSON P. N.; SIIWER H. Incidence and coincidence of diabetes mellitus and pulmonary tuberculosis in a Swedish county. II. Incidence of pulmonary tuberculosis among diabetics. Search among diabetics in the county of Kristianstad. Acta medica scandinavica, Stockholm, v.161, suppl 335, p.23-48, 1958.

OPSAHL R.; RIDDERVOLD, H.O.; WESSEL, A. A.S. T. Pulmonary tuberculosis in mitral stenosis and diabetes mellitus. Acta tuberculosea et pneumologica scandinavica, Copenhagen, v.40, p. 290-296, 1961.

PIERRE, C.; OLIVIER, C. Diagnosis of primary tuberculosis in children by amplification and detection of mycobacterial DNA. American review of respiratory disease, New York, v.147, n.2, p. 420-424, 1993.

PADOVEZE, M. C. et al. Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. Journal of Hospital Infection, London, v. 67, n.2, p.161-167.

PALMER, C. E.; JABLON, S.; EDWARDS, P.Q. Tuberculosis morbidity of young men in relation to tuberculin sensitivity and body build. American review of tuberculosis, Baltimore v.76, p. 517-539, 1957.

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

PHILLIPS, M. S.; VON REYN, C.F. Nosocomial infections due to non-tuberculous mycobacteria. Clinical infectious diseases, Chicago, v. 33, p. 1363-1374, 2001.

PRINCE, D.S. et al. Infection with Mycobacterium avium complex in patients with-out predisposing conditions. The New England Journal of Medicine, Boston, v.321, p. 863-868, 1989.

PRIMM, T. P. et al. O Health impacts of environmental mycobacteria. Clinical Microbiology Reviews, Washington, DC, v. 17, n.1, p. 98-106, 2004.

PIERSIMONI, C.; SCAROARO, C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. Lancet infectious diseases, New York, v. 8, n.5, p. 323-334, 2008.

RAJU, B.; SCHLUGER, N. W. Significance of respiratory isolates of Mycobacterium avium complex in HIV-positive and HIV-negative patients. International journal of infectious diseases, Hamilton, v. 4, p. 134-139, 2000.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.35, n.1, p.51-58, 2002.

RINGUET, H. et al. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v.37, p. 852-857, 1999.

ROSSETTI, L. R. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples using DNA purified by glass matrix. Journal of microbiological methods, Amsterdam v. 28, p.139-146, 1997.

SHINNICK, T.M. The 65 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology, Washington, DC, v. 169, p. 1080-1088, 1987.



SILWER, H. Incidence and coincidence of diabetes mellitus and pulmonary tuberculosis in a Swedish county. I. Incidence of diabetes mellitus in a Swedish county. Survey of diabetics in the county of Kristianstad. Acta medica scandinavica, Stockholm v.161, suppl 335, p. 5-22, 1958.

SILVA, C. F. hsp65 PCR-Restricion enzyme análisis (PRA) for identification of mycobacteria in clinical laboratory. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo, v.43, p.25-28, 2001.

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.

SMITH, K.C. et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. Pediatrics, Evanston, v. 97, p.155-60, 1996.

SNIDER, D. E. et al. Tuberculosis in children. Pediatric Infectious Disease Journal, Baltimore, v.7, p.271-278, 1988.

SBARBARO J. Directly observed therapy – Who is responsible? Clinics in chest medicine, Philadelphia, v.18, p.131-133, 1997.

SUBCOMMITTEE OF JOINT TUBERCULOSIS COMMITTEE OF BRITISH THORACIC SOCIETY. Management of opportunist mycobacterial infection. Thorax, London, v. 55, p. 210-218, 2000.

SUFFYS, P. et al. Detection of mixed infections with *Mycobacterium lentiflavum* and *Mycobacterium avium* by molecular genotyping methods. International journal of medical microbiology, v.55, p.127-131, 2006.

SHINNICK, T M. The 65-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. Journal of bacteriology, Washington, DC, v.169, n.3, p. 1080-1088, 1987.

SPRINGER, B. Two laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v. 34, n.2, p.296-303, 1996.

STEINGRUBE, V.A. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v. 33, p.149–153, 1995.

SCHEINERT, P. et al. Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler®. Eppendorf North America. Abr 2003. Disponível em: <[http://www.eppendorfna.com/applications/PCR\\_appl\\_protocolsMC.asp](http://www.eppendorfna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp)> Acesso em: 3 nov 2005.

TAKEWAKI, S. et al. Genus specific polymerase chain reaction for the mycobacterial dnaJ gene and species-specific oligonucleotide probes. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v.31, p. 446-450, 1993.

TVERDAL, A. et al. Body mass index and incidence of tuberculosis. European journal of respiratory diseases, Copenhagen, v. 69, p.355-362, 1986.

TELENTI, A. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v. 31, n.2, p.175-178, 1993.

TANAKA, I.I. et al. Comparison of a multiplex-PCR assay with mycolic acids analysis and conventional methods for the identification of mycobacteria. Microbiology and Immunology, Berlin, v. 47, n.5, p. 307-312, 2003.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. Clinical Microbiology Reviews, Washington, DC, v. 2, p.319-354, 2003.

TIMOTHY, R.A. Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients with pre-existing lung disease. Clinics in chest medicine, Philadelphia, v. 23, p. 643-653, 2002.

UEKI, S.Y.M. et al. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v.41, n.1, p.1-8, 2005.

VAN CREVEL, R. et al. The impact of nontuberculous mycobacteria on management of presumed pulmonary tuberculosis. Infection, Munich, v. 29, n.2, p.59-63, 2001.

WEIL, A. et al. The *mpt40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v. 34, p.2309-2311, 1996.

WAALER, H.T. Height, weight and mortality. The Norwegian experience. Acta medica scandinavica, Stockholm, v. 679, p. 1-56, 1984.

WOLINSKY, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. American review of respiratory disease, New York, v.119, p.107-159, 1979.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Online Tuberculosis Database. Communicable Diseases -Tuberculosis Estimated TB Incidence and Estimated TB Deaths in Adults + HIV. fev 2007, Disponível em: <<http://www.who.int/globalatlas/dataquery/reportdata.asp?rpttype=1>> Acesso em: 20 fev 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. World Report 2008. Global Tuberculosis Control. Surveillance and planning, finance. Genebra, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global Tuberculosis .Control: A short update to the 2009 report. Genebra, 2009.

YUEN, K.W.L. et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. Journal of clinical microbiology, Washington, DC, v.31, p. 1615-1618, 1993.

# Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex

## Differentiation of micobacteria by multiplex PCR

Diogo da Rocha Poroca<sup>1</sup>, Andrea Santos Lima<sup>1</sup>, Juliana Falcão de Araújo Lima<sup>1</sup>,  
Heidi Lacerda Alves da Cruz<sup>1</sup>, Rosana de Albuquerque Montenegro<sup>1</sup>,  
Fábio Lopes de Melo<sup>2</sup>, Haiana Charifker Schindler<sup>1</sup> e Lílian Maria Lapa Montenegro<sup>1</sup>

### RESUMO

O trabalho visou à otimização de um método baseado na reação em cadeia da polimerase multiplex - para diferenciação de micobactérias de interesse para a saúde pública. A PCR Multiplex baseou-se na amplificação simultânea do gene *hsp65*, presente em todo gênero *Mycobacterium*, do gene *dnaJ*, presente apenas em *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* e da sequência de inserção IS6110 presente no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, gerando amplicons de 165pb, 365pb e 541pb, respectivamente. O limite de detecção foi de 1fg para o alvo *hsp65*, 100pg para o *dnaJ* e 0,1fg para o IS6110. A PCR multiplex detectou até 100pg de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. O sistema demonstrou ser específico e sensível na detecção de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium smegmatis*. Os resultados obtidos utilizando cepas de referência demonstraram que a PCR multiplex pode ser uma ferramenta rápida, sensível e específica na diferenciação de micobactérias.

**Palavras-chaves:** Micobactérias. PCR multiplex. IS6110. *dnaJ*. *hsp65*.

### ABSTRACT

This study aimed to optimize a method based on the polymerase chain reaction - multiplex PCR - for differentiation of mycobacteria species of interest for public health. The multiplex PCR was based on simultaneous amplification of the *hsp65* gene, which is present in all species of the *Mycobacterium* genus, the *dnaJ* gene, which is present only in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* and the IS6110 insertion sequence, which is present in the *Mycobacterium tuberculosis* complex, generating amplicons of 165 bp, 365 bp and 541 bp, respectively. The detection limit was 1 fg for the *hsp65* target, 100 pg for *dnaJ* and 0.1 fg for IS6110. The multiplex PCR detected down to 100 pg of DNA of *Mycobacterium tuberculosis*. The system was shown to be specific and sensitive for detection of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. The results obtained using reference strains of mycobacteria showed that multiplex PCR may be a fast, sensitive and specific tool for differentiation of mycobacteria.

**Key-words:** Mycobacteria. Multiplex PCR. IS6110. *dnaJ*. *hsp65*.

Identificado por Robert Koch, em 1882, o *Mycobacterium tuberculosis* é a principal espécie do gênero *Mycobacterium* que compõe um grupo formado pelas espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis-BCG*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipetti*, denominado complexo *Mycobacterium tuberculosis*<sup>14</sup>. Além das espécies causadoras de tuberculose, existem ainda as micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT). Atualmente, a expressão *micobactérias não causadoras de tuberculose* é a mais comumente utilizada para referir-se as espécies do gênero

*Mycobacterium*, com exceção de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, que podem ser patogênicas para o ser humano, causando as enfermidades conhecidas como micobacterioses. As micobactérias não causadoras de tuberculose estão amplamente distribuídas no meio ambiente, tendo sido isoladas na água, incluindo água canalizada, solo, animais e inclusive em instrumentos cirúrgicos, por falha no processo de esterilização e soluções desinfetantes<sup>5,7</sup>. Como ainda não foi demonstrado que as micobactérias não tuberculosas são transmitidas pessoa a pessoa, com o isolamento destes microrganismos em amostras de pele, aparato respiratório ou tubo digestivo de indivíduos saudáveis, se supõe que a colonização ou infecção por estes microorganismos tem origem ambiental<sup>10</sup>. A infecção ocorre por inalação, inoculação ou ingestão de material contaminado por micobactérias, sendo excepcional a transmissão entre humanos<sup>4,7</sup>.

Enquanto as características patogênicas clássicas de *Mycobacterium tuberculosis* têm sido mais extensivamente descritas, pouco se sabe sobre as MNT. Os primeiros quadros clínicos produzidos pelas MNT foram descritos na década de 50 e por muitos anos foram considerados ocasionais e quase

1. Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE. 2. Laboratório de Doenças Transmissíveis, Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE.

Apoio financeiro: CPqAM/FIOCRUZ e FACEPE

**Endereço para correspondência:** Dra. Lílian Maria Lapa Montenegro. Campus da UFPE. Av. Moraes Rego s/n, Caixa Postal 7472, 50670-420 Recife, PE.

Tel: 55 81 2101-2681; Fax: 55 81 3453-2449

e-mail: lilian@cpqam.fiocruz.br

Recebido para publicação em 25/06/2009

Aceito em 09/11/2009

sempre ligados a situações de imunodeficiência. Nos últimos 20 anos, tem se tornado uma infecção relativamente mais frequente, relacionada ou não com quadros de imunodepressão<sup>10</sup>. Os grupos que tem o risco aumentado em desenvolver doenças causadas por micobactérias não causadoras de tuberculose incluem: fibrose cística, enfisema, bronquectasia, doenças obstrutivas pulmonares crônicas, neumoconiosis, silicoses e portadores de imunodeficiência<sup>7</sup>. No entanto, as MNT são reconhecidas, também, como importantes patógenos em indivíduos imunocompetentes<sup>15</sup>.

Estudos revelam que doenças atribuídas as MNT estão aumentando no Brasil, iniciado pela pandemia HIV/AIDS e associado ao crescente número de surtos decorrentes de cirurgias e procedimentos estéticos com equipamentos esterilizados incorretamente. Em razão da gravidade desse fato, o Ministério da Saúde classificou essas infecções como doença de notificação compulsória<sup>20</sup>. Porém, a notificação não está sendo feita de rotina em todos os estados brasileiros, incluindo Pernambuco onde não se tem dados notificados de casos de infecção por micobactérias não causadoras de tuberculose.

O diagnóstico de tuberculose apresenta inúmeras dificuldades: as imagens radiológicas pulmonares nem sempre são conclusivas, a baciloscopia possui sensibilidade limitada, a cultura apesar de ser considerada padrão ouro, necessita de 6 a 8 semanas para a visualização das colônias, prolongando o diagnóstico definitivo. A sensibilidade do diagnóstico convencional está comprometida em pacientes paucibacilares, sendo frequente o resultado negativo<sup>12,27</sup>. Um diagnóstico final tardio do paciente pode, dessa forma, resultar em aumento da taxa de mortalidade. Visto que o estabelecimento do regime terapêutico depende da espécie de micobactéria, a identificação apropriada do organismo pode ser crítica para a adoção de uma terapia adequada<sup>29</sup>.

Nas infecções causadas por MNT, para se definir o diagnóstico é necessário avaliar os achados clínicos e radiológicos do paciente e como os mesmos podem não diferir clinicamente da tuberculose, é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico a correlação clínico-laboratorial<sup>2</sup>. A baciloscopia é o exame que se baseia na pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, sendo indicado nos casos onde ocorre suspeita de micobacterioses, porém apresenta a desvantagem de não diferenciar morfológicamente as espécies de micobactérias, sendo assim necessária a realização da cultura e identificação da espécie que pode ser feita por métodos fenotípicos, moleculares ou pela combinação de ambos. A identificação das micobactérias é realizada a partir de culturas puras e as espécies geneticamente distintas podem apresentar resultados fenotípicos similares ou idênticos. No Brasil, a técnica de PRA-*hsp65*, tem possibilitado a identificação rápida de diversas espécies de micobactérias<sup>20</sup>. O diagnóstico diferencial entre a tuberculose e as doenças causadas pelas micobactérias não tuberculosas (MNT) é de grande importância, pois apresentam fundamental diferença em sua epidemiologia, prognóstico e tratamento.

A pesquisa de novos métodos laboratoriais que possibilitem o diagnóstico mais rápido e preciso torna-se um objetivo importante a ser alcançado<sup>9</sup>. Vários testes de diagnóstico para a

tuberculose utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido descritos e propostos, tanto métodos *in house* como métodos comerciais<sup>17</sup>. A PCR é um método considerado sensível e específico que vem sendo utilizado na detecção de DNA ou RNA de micobactérias, diretamente de espécimes clínicos como escarro, lavado brônquico, líquido cefalorraquidiano, líquido ascítico, material de biópsia, entre outros<sup>11,31,32</sup>. A sensibilidade da técnica de PCR está relacionada, principalmente, ao número de cópias da sequência alvo presente no genoma do patógeno, o tipo de iniciadores, bem como inibidores presentes na amostra clínica. A PCR multiplex é uma técnica que possibilita a detecção de várias sequências de DNA alvo em uma única reação, apresentando vantagens como rapidez, especificidade e reprodutibilidade na detecção, contribuindo na identificação de focos primários de infecção por micobactérias de forma mais rápida<sup>3</sup>.

As sequências alvo exploradas até o momento demonstraram níveis variáveis de sensibilidade bem como dificuldade de reprodutibilidade quando utilizadas isoladamente. Os marcadores moleculares mais comumente utilizados são o 16S rDNA e o elemento de inserção IS6110<sup>18,30</sup>. O IS6110 está presente apenas nas espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo usado para diferenciá-lo das MNT<sup>15</sup>. O gene *dnaJ* codifica uma proteína de estresse e é altamente conservado entre as bactérias. Os membros da família *Mycobacteriaceae* possuem o *dnaJ* e esta sequência nesses organismos provou ser útil na identificação a nível de espécies<sup>21,26</sup>. Outro gene de interesse que vem sendo estudado por diferentes grupos de pesquisa é o gene *hsp65*, comum a todas as bactérias do gênero *Mycobacterium* que codifica o antígeno de 65kDa e bastante utilizado para diferenciação de espécies de MNT<sup>24</sup>. O presente trabalho teve como objetivo à padronização de um método baseado em PCR multiplex, capaz de identificar e diferenciar a espécie *Mycobacterium tuberculosis* de outras cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, o *Mycobacterium bovis* e das micobactérias não tuberculosas de interesse para a saúde pública, utilizando a amplificação de diferentes sequências moleculares (IS6110, *dnaJ*, *hsp65*) numa única reação.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Padronização das técnicas de reação em cadeia da polimerase.** Para realização dos experimentos de padronização da técnica foi utilizado DNA genômico extraído e purificado de cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv), *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium fortuitum*, obtido de cultura em meio Löwenstein Jensen. As cepas foram cedidas pelo laboratório de micobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

**Extração e purificação de DNA de micobactérias.** Foi utilizado o kit comercial Genomic Prep™ - Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Biosciences) seguindo instruções do fabricante, porém com algumas modificações: a) aquecimento prévio da amostra a 90°C por 10 minutos em solução de lise do próprio kit; b) adição de 3µL de proteinase K (20mg/ml) e incubação a 55°C por no mínimo 6h; c) após

a adição de 3µL da RNase, foi adicionada a amostra, álcool isopropílico (1:1) e armazenada a -20°C, por no mínimo 3h, para posterior centrifugação. A quantificação do DNA foi realizada espectrofotometricamente (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech). O DNA foi estocado a -20 °C até sua utilização.

**Padronização das condições da técnica de reação em cadeia da polimerase.** Para avaliação das condições de amplificação dos alvos moleculares IS6110, *dnaJ* e *hsp65*, foram realizadas três reações simples de amplificação, nas seguintes condições: I) A mistura de reação foi composta de tampão da Taq DNA polimerase 1X (Invitrogen), 2,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) 2mM de dNTP (Invitrogen), 20 pmol de cada iniciador P1 e P2 (Invitrogen) e 2.5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), com volume final de 50µL. A fase de desnaturação foi realizada a 94°C por 20segundos, anelamento a 63°C por 20segundos e extensão 72°C por 1 minuto, em um total de 32 ciclos, com uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos<sup>3</sup>. Os iniciadores P1: 5' CTA GGT CGG GAC GGT GAG GCC AGG 3' e P2: 5' CAT TGC GAA GTG ATT CCT CCG GAT 3') amplificam um fragmento de 165pb do gene que codifica o antígeno 65kDa de *Mycobacterium tuberculosis*. II) A mistura de reação foi composta de tampão da Taq DNA polimerase 1X (Invitrogen), 2,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 50pmol de cada iniciador P3 e P4 (Invitrogen), 2mM de dNTP (Invitrogen) e 2.5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), com volume final de 50µL. A fase de desnaturação foi realizada a 94°C por 30 segundos, anelamento 65°C por 1 minuto e extensão 72°C por 2 minutos, em um total de 38 ciclos, com uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos<sup>3</sup>. Os iniciadores P3: 5' AAG AGG AAG GAG AGA GGG G 3' e P4: 5' GTC GTT GAG GTT GAA CTC 3' amplificam um fragmento de 365pb do gene *dnaJ*, presente em *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* e ausente em outras espécies de micobactérias. III) A mistura de reação foi composta de tampão da Taq DNA polimerase 1X (Invitrogen), 2,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10pmol de cada iniciador P5 e P6 (INVITROGEN), 2mM de dNTP (Invitrogen) e 2.5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), com volume final de 50µL. A fase de desnaturação foi realizada a 94°C por 1,5 minuto, anelamento 65°C por 2 minutos e extensão 72°C por 3 minutos, em um total de 40 ciclos, com uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos<sup>3</sup>. Os iniciadores P5: 5' GTG CGG ATG GTC GCA GAT AT 3' e P6: 5' CTC GAT GCC CTC ACG GTT CA 3') amplificam o fragmento de 541pb do elemento de inserção IS6110, presente apenas nas cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

**Avaliação da temperatura de anelamento dos iniciadores na PCR multiplex.** Foi avaliada através da realização de um gradiente de temperatura de anelamento, variando de 54°C a 57,8°C (54°C, 54,8°C, 55,7°C, 56,5°C, 57,2°C, 57,8°C) utilizando o termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf AG). A reação foi desenvolvida nas mesmas condições da PCR multiplex.

**Padronização das condições da técnica de PCR multiplex.** A reação em cadeia da polimerase multiplex foi realizada utilizando os três pares de iniciadores em uma única reação, para a amplificação dos fragmentos alvos descritos nas reações de PCR (I), (II) e (III). A reação foi composta de

tampão da Taq DNA polimerase 1X (Invitrogen), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 2mM de dNTP (Invitrogen), 2.5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 20pmol, 50pmol e 10pmol dos iniciadores P1 e P2, P3 e P4, P5 e P6, respectivamente. Em cada mistura de reação, foram adicionados 5µL de 1ng de DNA genômico purificado de cada cepa de referência de micobactéria, perfazendo um volume final de 50µL. Os ciclos de amplificação constaram de uma etapa de pré-incubação de 85°C por 5 minutos, desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 57,2°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, composta por 40 ciclos, com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos<sup>3</sup>. Todas as reações de amplificação foram realizadas no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf AG) e utilizados controles negativos, livre de DNA.

**Deteção dos fragmentos amplificados por PCR.** Dez µL dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio. Os fragmentos de DNA separados através de eletroforese foram visualizados em um transluminador de luz ultravioleta e fotografados com um sistema de documentação Kodak (Gel Logic 100 Imaging System), utilizando o software Kodak molecular imaging software 4.0.0. O marcador de peso molecular utilizado foi o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

**Avaliação da especificidade e limiar de detecção das técnicas de PCR.** A especificidade foi avaliada utilizando quantidades conhecidas (100pg) de DNA genômico purificado de cepa de referência de micobactérias (*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*), *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium fortuitum*) e DNA genômico humano. O limite de detecção foi definido utilizando concentrações conhecidas de DNA genômico purificado de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* e diluídas serialmente, em água ultra pura tipo I, em fator 10 (1ng a 0,01fg). Nessa fase, foi dada atenção particular as condições de ciclagem principalmente temperatura de anelamento, concentrações de Mg<sup>++</sup> e de iniciadores, visando minimizar o aparecimento de bandas inespecíficas e maximizar o limiar de detecção dos fragmentos específicos.

**Análise da PCR multiplex utilizando amostra clínica.** A PCR multiplex foi avaliada utilizando amostra de sangue total coletada de paciente com diagnóstico confirmado de tuberculose extrapulmonar através de critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, realizado pelo médico do serviço de saúde de Pernambuco. A amostra de sangue foi submetida à extração e purificação de DNA segundo o protocolo de Rossetti, 1997 para posterior utilização no sistema de PCR multiplex.

## RESULTADOS

O teste de especificidade revelou uma amplificação específica do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* (faixas 1, 2 e 3) não havendo amplificação com DNA humano (faixa 4). Os fragmentos de 165pb, 365pb e 541pb foram amplificados, respectivamente, pelos iniciadores P1 e P2, P3 e P4, P5 e P6 (**Figura 1**).

O limite de detecção nas técnicas de PCR simples utilizando DNA genômico de cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis*

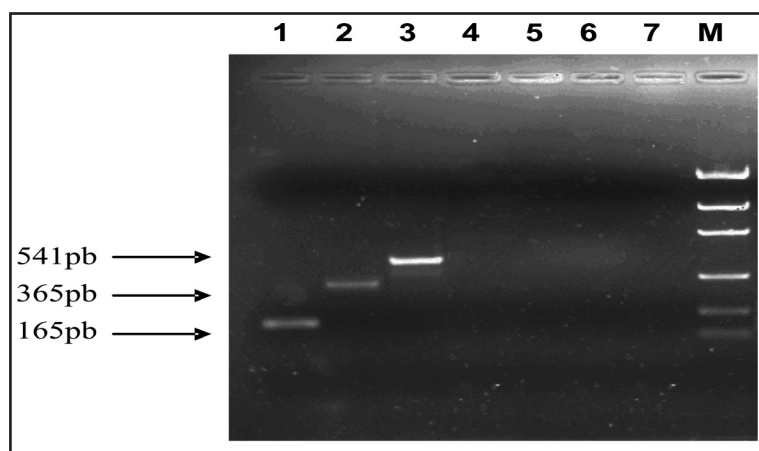


com os iniciadores P1 e P2, P3 e P4, P5 e P6 foi de 1fg, 100pg e 0,1fg, respectivamente. Na PCR multiplex, a quantidade mínima de DNA detectado na eletroforese de gel de agarose foi 100pg.

A temperatura de anelamento ideal na amplificação específica dos fragmentos alvo através da PCR multiplex foi padronizada para 57,2°C, pela observação da presença dos fragmentos específicos (165pb, 365pb e 541pb) e pela ausência de formação de amplicons inespecíficos. A concentração do íon magnésio na qual foram visualizados os três fragmentos alvo (165pb, 365pb e 541pb) com maior nitidez foi a de 2,5mM, sendo estabelecida como concentração padrão nos experimentos da PCR multiplex.

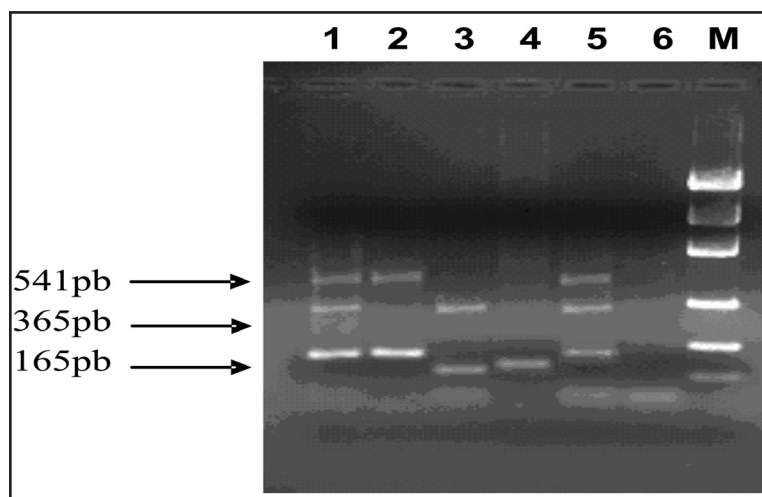
Na PCR multiplex, para o *Mycobacterium tuberculosis*, os três fragmentos foram amplificados (165pb, 365pb e

541pb). Para o *Mycobacterium bovis*, foram amplificados os fragmentos de 165pb e 541pb. Em *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium fortuitum*, foi observado um amplicon menor que o fragmento de 165pb (cerca de 20-40pb), presente em *Mycobacterium bovis* ou *Mycobacterium tuberculosis*. Não houve amplificação do fragmento de 365pb em *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium fortuitum*. Foram amplificados os fragmentos de 365pb e o menor que 165pb (cerca de 20-40pb) na cepa de *Mycobacterium avium*, não sendo observada a amplificação do fragmento de 541pb. A amostra de sangue testada revelou amplificação específica dos três fragmentos (165pb, 365pb e 541pb), indicando o perfil para *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 2).



**FIGURA 1**

Eletroforese em gel de agarose demonstrando os amplicons de 165pb, 365pb e 541pb. Faixas 1, 2 e 3 referem-se à amplificação com os iniciadores P1 e P2; P3 e P4; P5 e P6 com 100pg DNA genômico de cepa de referência *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv). As faixas 4, 5 e 6, referem-se a amplificação de 5ng de DNA genômico humano com os iniciadores P1 e P2; P3 e P4; P5 e P6. Faixa 7, controle negativo livre de DNA; M, Marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder).



**FIGURA 2**

Eletroforese em gel de agarose demonstrando a padronização da PCR multiplex com diferentes cepas de referência de micobactérias e com amostra de sangue de paciente com tuberculose extrapulmonar. Faixa 1, *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv); Faixa 2, *Mycobacterium bovis*; Faixa 3, *Mycobacterium avium*; Faixa 4, *Mycobacterium smegmatis*; Faixa 5, *Mycobacterium tuberculosis* (proveniente de sangue de paciente); Faixa 6, controle negativo; M, Marcador (Low DNA Mass Ladder).

## DISCUSSÃO

Muitos ensaios baseados em PCR têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da tuberculose. Embora esses ensaios tenham se mostrado úteis, possuem algumas limitações. Quando oligonucleotídeos são usados para amplificar uma sequência gênero-específica, geralmente necessita-se de sondas individuais que hibridizam com os amplicons gerados para a diferenciação entre as espécies. Na amplificação de uma região específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, as espécies que formam o complexo não podem ser diferenciadas. Finalmente, quando oligonucleotídeos são usados para amplificar sequências específicas de *Mycobacterium tuberculosis*, as espécies de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum* não podem ser detectadas, sendo também essas espécies causadoras de TB em humanos<sup>6</sup>.

A PCR multiplex é um método proposto para uma detecção rápida e diferenciação de espécies de micobactérias, sendo considerado sensível e específico em relação aos métodos convencionais<sup>3</sup>. Os pares de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho demonstraram ser específicos para cada sequência alvo. Pao e cols<sup>26</sup> testaram os oligonucleotídeos usados no presente trabalho para o gene *hsp65* com DNA genômico extraído e purificado de cepas de referência de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) e em outras nove espécies de MNT (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium pfeiferi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium xenopi*) e obtiveram os mesmos resultados descritos neste trabalho com a obtenção de um amplicon de 165pb para as *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* e amplicons com aproximadamente 20 a 40pb menor que o fragmento de 165pb, para as MNT. Testaram também os oligonucleotídeos com 18 espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas, algumas delas comumente encontradas no trato respiratório e não observaram formação de nenhum amplicon, comprovando a especificidade dos oligonucleotídeos para o DNA de micobactérias. O limite de detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* obtido em seus experimentos foi de 0,1pg (100fg). Em contrapartida, o limite de detecção encontrado no presente estudo foi de 1fg (0,001pg). O resultado obtido demonstra uma alta sensibilidade deste sistema na detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. O sistema usando oligonucleotídeos específicos para o alvo *hsp65* demonstrou ser específico para DNA de micobactérias não ocorrendo amplificação quando utilizado com DNA genômico humano.

Estudos anteriores propuseram a amplificação da sequência de inserção IS1245 para identificação do *Mycobacterium avium*. Ferreira e cols<sup>8</sup> demonstraram que a detecção de *Mycobacterium avium* por amplificação do IS1245, mostrou-se negativa em amostras já identificadas como *Mycobacterium avium* por testes bioquímicos. Oliveira e cols<sup>25</sup> descreveram variabilidades genéticas em cepas de *Mycobacterium avium* em estudos com pacientes aids relatando a ausência do alvo em três isolados.

Estes estudos demonstram a instabilidade da sequência IS1245 na identificação de *Mycobacterium avium*, abrindo espaço para o uso de outros marcadores, visando uma identificação mais confiável deste microrganismo.

Os oligonucleotídeos usados por Takewaki e cols<sup>28</sup> são gênero específicos e baseados na sequência do gene *dnaJ* de *Mycobacterium tuberculosis* dirigidos para a amplificação da região entre as posições 1377-1741 de *Mycobacterium tuberculosis*. Em estudo com 19 espécies diferentes de micobactérias o amplicon, de 365pb foi apenas observado em *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* não sendo observado em nenhuma outra espécie de micobactéria. Ainda em seu estudo, relataram que a amplificação do fragmento de 365pb é mais intensa em *Mycobacterium tuberculosis* do que em *Mycobacterium avium*. O gene *dnaJ* é mais útil do que o gene codificante de rRNAs como alvo para o desenvolvimento de oligonucleotídeos espécie-específicos, pois a sequência de nucleotídeos do *dnaJ* é altamente variável entre as espécies de MNT. Estes resultados foram levados em consideração na escolha deste alvo para o nosso estudo.

No presente estudo, o limite de detecção do sistema utilizando oligonucleotídeos para o alvo *dnaJ* foi de 100pg de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. O sistema utilizando oligonucleotídeos específicos para o *dnaJ* também não demonstrou amplificação de DNA humano, somente amplificando DNA de micobactérias, mais especificamente de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*.

Weil e cols<sup>31</sup> demonstraram que uma PCR multiplex tendo como alvo a sequência de inserção IS6110 pode ser usada para caracterização do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em relação às MNT. A principal vantagem do alvo IS6110 é que está frequentemente presente em várias cópias dentro do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*, em média de 6 a 20 cópias<sup>19</sup>. Este número de cópias aumenta o limite de detecção da técnica, o qual é especialmente importante em infecções paucibacilares.

Estudos demonstraram que a técnica de PCR tendo como base o alvo IS6110, não foi muito específica para o *Mycobacterium tuberculosis* e também apresentaram resultados positivos para DNA de cepas de MNT tais como *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium fortuitum*. Yuen e cols<sup>32</sup> demonstraram a existência de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que pareciam possuir apenas uma ou nenhuma cópia do IS6110. A maioria dessas cepas foi isolada de pacientes de origem asiática. Devido a isso, o uso do IS6110 como alvo único para PCR pode, em alguns casos, levar a resultados falso-negativos. Técnicas de PCR baseadas exclusivamente na sequência IS6110 não discriminam entre o *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias do complexo<sup>3</sup>. O IS6110 é o alvo mais utilizado em ensaios baseados em PCR para diagnóstico de TB. Como muitos estudos ainda usam essa sequência para identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e nenhum estudo relatou cepa de *Mycobacterium tuberculosis* com ausência do elemento de inserção IS6110 no Brasil, este alvo foi um dos escolhidos para a nossa proposta de diagnóstico complementar.



Em estudos realizados por Kox e cols<sup>18</sup>, com os oligonucleotídeos P5 e P6 visando à amplificação do alvo IS6110, o limite de detecção alcançado em seus experimentos variou entre 10fg e 1fg dependendo da cepa de referência utilizada no experimento. No presente estudo, obtivemos uma melhor sensibilidade, sendo detectado 0,1fg de DNA, o equivalente ao DNA de menos de uma micobactéria (5fg), utilizando DNA de cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv). Também foi encontrada uma alta sensibilidade na detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* com a utilização desse sistema. A PCR utilizando os oligonucleotídeos P5 e P6 amplificou apenas DNA de micobactérias não havendo amplificação com DNA humano. Segundo Battacharya e cols<sup>3</sup>, o limite de detecção da PCR multiplex utilizando os mesmos conjuntos de oligonucleotídeos foi de 100fg, em comparação ao valor de 100pg obtido neste trabalho.

No presente estudo, foram observados dois fragmentos na PCR multiplex utilizando DNA de *Mycobacterium bovis*, o primeiro correspondente a amplificação do *hsp65* (165pb) e o segundo que corresponde à amplificação da sequência de inserção IS6110 (541pb). Diferentemente do apresentado por Battacharya e cols<sup>3</sup> que observou apenas o fragmento 165pb, quando utilizou o DNA de *Mycobacterium bovis*. Como membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, a amplificação do fragmento correspondente à sequência IS6110 em *Mycobacterium bovis* deveria ser observada como ocorreu no nosso trabalho.

Diferente do trabalho de Battacharya e cols<sup>3</sup>, que utilizou a temperatura de 55°C para a hibridização de seus oligonucleotídeos, a temperatura de 57,2°C demonstrou ter melhor desempenho no anelamento específico dos oligonucleotídeos, simultaneamente. Foram também realizados ensaios com a PCR multiplex utilizando diferentes concentrações de cloreto de magnésio. A concentração de 2,5mM demonstrou melhor desempenho, discordando dos achados de Battacharya e cols<sup>3</sup> que utilizou 1,5mM.

No experimento realizado para avaliar o desempenho da PCR multiplex, em amostra de sangue coletada de paciente com TB extrapulmonar, a técnica mostrou-se eficaz, conseguindo amplificar os três alvos moleculares, confirmando o diagnóstico de tuberculose. Negi e cols<sup>23</sup> compararam a eficiência de vários alvos moleculares na detecção de TB por PCR e verificou as melhores sensibilidades nos alvos IS6110 e *hsp65*, respectivamente. Esses resultados reforçam os bons limites de detecção encontrados nas reações simples, utilizando os mesmos alvos moleculares demonstrados no presente trabalho.

Os resultados apresentados no presente estudo corroboram para uma avaliação da acurácia do sistema de PCR multiplex em vários espécimes clínicos isolados de pacientes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar, para propor sua implementação em laboratórios de referência de micobacterioses. Neste sentido, acreditamos que tal abordagem, com alta sensibilidade e especificidade para espécies correspondentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e às MNT possa ser empregado como modelo auxiliar no diagnóstico da tuberculose e das micobacterioses.

## AGRADECIMENTOS

À Dr<sup>a</sup> Leila Fonseca do Laboratório de micobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo fornecimento das cepas de micobactérias necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. American Thoracic Society; Centers for Disease Control and Prevention; Council of the Infectious Disease Society of America. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. American Journal of Respiratory Critical Care Medicine 38:1376-1395, 2000.
2. American Thoracic Society Documents, An Official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment and prevention of nontuberculous Mycobacterial diseases. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 175:367-416, 2007.
3. Bhattacharya A, Karak K, Ghosal AG, Roy A, Das S, Dandapat P, Khetaway D, Mondal DK, Bhattacharya S, Chakrabarti S. 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 8: 150-157, 2003.
4. Brown-Elliott BA, Wallace Jr RJ. Infections caused by nontuberculous mycobacteria. In: Mandell Douglas, and Bennett's: Principles and Practice of Infectious disease. Volume 2, 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia, PA: Elsevier, p.2909-2916, 2005.
5. De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. Clinical Infection Disease 42:1756-1763, 2006.
6. Del Portillo P, Thomas MC, Martínez E, Marañón C, Valladares B, Patarroyo ME, Lopez MC. Multiprimer PCR System for differential identification of mycobacteria in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology 34: 324-328, 1996.
7. Esteban J, García Cía JI, Ortiz A, Fernández Roblas R. Infecciones por micobactérias atípicas. Medicina 9:3632-3638, 2006.
8. Ferreira RMC, Saad MHE, Gomes da Silva M, Fonseca LS. Non-tuberculous mycobacteria I: one year clinical isolates identification in Tertiary Hospital Aids Reference Center, Rio de Janeiro, Brazil, in pre highly active antiretroviral therapy era. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97:725-729, 2002.
9. Fundação Nacional de Saúde. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. 5ª edição. FUNASA/CRPHE/SBPT, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2002.
10. Gómez NA. Micobacterias no tuberculosas: ¿una infección emergente? Anales de Pediatría 71: 185-188, 2009.
11. Gopinath K, Singh S. Urine as an adjunct specimen for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. International Journal of Infectious Diseases 13:374-379, 2008.
12. Green C, Huggett JE, Talbot E, Mwaba P, Reither K, Zumla AI. Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification methods. Lancet Infectious Disease 9:505-511, 2009
13. Hermans PWM. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology 28: 2051-2058, 1990.
14. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Moreno TM, Cobacho AV, Pilar SV, Pajares MSJ. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2009. doi: 10.1016/j.eimc.2009.01.008
15. Jarzembowski JA, Young MB. Nontuberculous Mycobacterial Infections. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 132: 1333-1341, 2008.
16. Kim H, Mun H, Kim H, Oh E, Ha Y, Bai G, Park Y, Cha C, Kook Y, Kim B. Differentiation of mycobacterial species by *hsp65* duplex PCR followed by duplex-PCR-based restriction analysis and direct sequencing. Journal of Clinical Microbiology 44:3855-3862, 2006.
17. Kim MH, Yang HY, Suh JT, Lee HJ. Comparison of In-house PCR with Conventional Techniques and Cobas Amplificor *M. tuberculosis*™ Kit for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Yonsei Medical Journal 49: 537-544, 2008.

18. Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, van Heusden S, Kuijper S, Kolk AH. **A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples.** Journal of Clinical Microbiology 32: 672-678, 1994.
19. Kurabachew M, Enger O, Sandaa R, Skuce R, Bjorvatn B. A multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group-, and species-specific detection of mycobacteria. Diagnostic Mycobiology and Infectious Disease 49: 99-104, 2004.
20. Ministério da Saúde. Prêmio de Incentivo em Ciência e tecnologia para o SUS: edição 20 anos de SUS 2008/Ministério da Saúde. Identificação de micobaterias pelo método de PCR - análise de restrição (PRA-hsp65) em um laboratório de referência e elaboração de um algoritmo de padrões de PRA-hsp65. Departamento de Ciência e tecnologia, Secretaria de Ciências, tecnologia e insumos estratégicos Instituto Adolfo Lutz. Editora Ministério da Saúde, p.156, 2008.
21. Morita Y, Maruyama S, Kabeya H, Nagai A, Kozawa K, Kato M, Nakajima T, Mikami T, Katsube Y, Kimura H. Genetic diversity of the *dnaJ* gene in the *Mycobacterium avium* complex. Journal of Medical Microbiology 53:813-817, 2004.
22. Nations JA, Myers JN. Nontuberculous mycobacterium in association with bronchiectasis. Disease-a-Month 54:565-572, 2008.
23. Negi SS, Anand R, Pasha ST, Gupta S, Basir SF, Khare S, Lal S. Diagnostic potential of IS6110, 38kDa, 65kDa and 85B sequence-based polymerase chain reaction in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. Indian Journal of Medical Microbiology 25:43-49, 2007.
24. Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. Journal of microbiological methods 75:1-11, 2008.
25. Oliveira RS, Sircili MP, Ueki SYM, Telles MAS, Schnabel B, Briones MRS, Leão SC. PCR-restriction enzyme analysis of a bone marrow isolate from human immunodeficiency virus-positive patient disclose polyclonal infection with two *Mycobacterium avium* strains. Journal of Clinical Microbiology 38: 4643-4645, 2000.
26. Pao CC, Yen TSB, Jinn-Bang Y, Juehn-Shin M, Fiss EH, Chau-Hsiung C. Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. Journal of Clinical Microbiology 28:1877-1880, 1990.
27. Restrepo BI, Gomez DI, Shipley GL, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Selective enrichment and detection of mycobacterial DNA in paucibacillary specimens. Journal of Microbiological Methods 67:220-229, 2006.
28. Takewaki S, Okuzumi K, Ishiko H, Nakahara K, Ohkubo A, Nagai R. Genus specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and species-specific oligonucleotide probes. Journal of Clinical Microbiology 31: 446-450, 1993.
29. Tanaka II, Anno IS, Leite SRA, Cooksey RC, Leite CQF. Comparison of a multiplex-PCR assay with mycolic acids analysis and conventional methods for the identification of mycobacteria. Microbiology and Immunology 47: 307-312, 2003.
30. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clinical Microbiology Review 16: 319-354, 2003.
31. Weil A, Plikaytis BB, Butler RW, Woodley LC, Shinnick MS. The *mpt40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology 34:2309-2311, 1996.
32. Yuen KWL, Ross CB, Jackson MK, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. Journal of Clinical Microbiology 31: 1615-1618, 1993.

## ANEXO A – FICHA CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA

## PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

IDENTIFICAÇÃO		
<b>1. Número da ficha na pesquisa</b> <div style="text-align: center;"> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> </div>	<b>2. Data da entrevista</b> <div style="text-align: center;">           ____/____/____         </div>	
<b>3. Procedência:</b> 1. Ambulatório <input type="checkbox"/> 2. Enfermaria <input type="checkbox"/>	<b>4. Número do Prontuário do Hospital</b> <div style="text-align: center;"> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> </div>	
<b>5. Hospital de origem:</b> 1. Hospital das Clínicas <input type="checkbox"/> 2. Hospital Otávio de Freitas 3. IMIP 4. Hospital Barão de Lucena 5. Outro: _____	<b>6. Número do SAME</b> <div style="text-align: center;"> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> </div>	
DADOS DO PACIENTE		
<b>7. Nome Completo do Paciente</b> _____ _____		
<b>8. Nome da Mãe ou Responsável</b> _____ _____		
<b>9. Data de nascimento</b> ____/____/____	<b>10. Idade do paciente</b> <div style="text-align: center;"> <input type="text"/> <input type="text"/> anos <input type="text"/> <input type="text"/> meses         </div>	<b>11. Sexo</b> 1. Feminino <input type="checkbox"/> 2. Masculino <input type="checkbox"/>
<b>12. Endereço</b> _____ _____ <b>Ponto de referência</b> _____ _____		
<b>13. Bairro</b> _____	<b>14. Cidade</b> _____	<b>15. UF</b> <div style="text-align: center;"> <input type="text"/> <input type="text"/> </div>
<b>16. Telefone Res. e Celular</b> (____) _____ - _____ (____) _____ - _____	<b>17. CEP</b> _____	<b>18. Zona de localização da moradia</b> 1. Urbana <input type="checkbox"/> 2. Rural <input type="checkbox"/>
DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS		
<b>31. Raça/Cor</b> 1. Branca <input type="checkbox"/> 2. Preta 3. Parda 4. Amarela 5. Indígena		
ANTECEDENTES DO PACIENTE		

<b>39. Já teve alguma doença?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar	<b>40. Qual doença?</b> 1. Asma <input type="checkbox"/> 2. Pneumonia <input type="checkbox"/> 3. Bronquite <input type="checkbox"/> 4. Tuberculose <input type="checkbox"/> 5. Diabetes <input type="checkbox"/> 6. Fibrose Cística <input type="checkbox"/> 7. HIV/AIDS <input type="checkbox"/> 8. Câncer <input type="checkbox"/> 9. Não sabe <input type="checkbox"/> 10. Outro: _____
<b>43. Fez PPD anterior?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Data de realização: ____/____/____ (Vê no cartão)	<b>44. Resultado do PPD:</b> 1. Não reator (0-4mm) <input type="checkbox"/> 2. Reator fraco (5-9mm) <input type="checkbox"/> 3. Reator forte (10-14mm) <input type="checkbox"/> 4. Reator muito forte (>15mm) <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>
<b>45. Toma algum medicamento atualmente?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Qual: _____	<b>46. Já fez TTO para tuberculose?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Qual: _____ <b>Caso sim, quanto tempo?</b> _____ <b>Caso sim, número de TTO anteriores:</b> _____

<b>Médico Responsável:</b>		<b>Fone:</b>	
<b>65. Peso</b> _____ Kg	<b>66. Estatura</b> _____ m		
<b>121. Realizou Baciloscopia?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____	<b>122. Resultado da baciloscopia:</b> 1. Positiva <input type="checkbox"/> 2. Negativa <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> _____ Cruzes	<b>123. Material da baciloscopia:</b> 1. Escarro <input type="checkbox"/> 2. Lavado gástrico <input type="checkbox"/> 3. Líquor <input type="checkbox"/> 4. Biópsia <input type="checkbox"/> 5. Outro material <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> Outro _____	

**EVOLUÇÃO**

<b>144- Resposta ao tratamento específico (feita pelo médico acompanhante)</b> 1. Melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Resposta ao tratamento) <input type="checkbox"/> 2. Não houve melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Não houve resposta ao tratamento) <input type="checkbox"/> 8. Inaplicável	
Entrevistador: _____	Assinatura: _____

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

<b>145. Realizou Nested-PCR pré-tratamento?</b> 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____	<b>146. Resultado</b> 1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	<b>147. Amostra biológica:</b> 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 2. <input type="checkbox"/> Soro 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 4. <input type="checkbox"/> Escarro 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 8. <input type="checkbox"/> Urina 9. <input type="checkbox"/> Outros 99. <input type="checkbox"/> Não se aplica
---	--	--

<p><b>148. Realizou Nested-PCR Único Tubo pré-tratamento?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Data: ____/____/____</p>	<p><b>149. Resultado</b></p> <p>1. Positivo</p> <p>2. Negativo</p> <p>9. Não se aplica <input type="checkbox"/></p>	<p><b>150. Amostra biológica:</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sangue total      6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Soro                      7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Células brancas      8. <input type="checkbox"/> Urina</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Escarro                      9. <input type="checkbox"/> Outros</p> <p>5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico      99. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>
<p><b>151. Realizou PCR colorimétrica pré-tratamento?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Data: ____/____/____</p>	<p><b>152. Resultado</b></p> <p>1. Positivo</p> <p>2. Negativo</p> <p>9. Não se aplica <input type="checkbox"/></p>	<p><b>153. Amostra biológica:</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sangue total      6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Soro                      7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Células brancas      8. <input type="checkbox"/> Urina</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Escarro                      9. <input type="checkbox"/> Outros</p> <p>5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico      99. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>
<p><b>154. Realizou RT-PCR pré-tratamento?</b></p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/></p> <p>2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Data: ____/____/____</p>	<p><b>155. Resultado</b></p> <p>1. Positivo</p> <p>2. Negativo</p> <p>9. Não se aplica <input type="checkbox"/></p>	<p><b>156. Amostra biológica:</b></p> <p>1. <input type="checkbox"/> Sangue total      6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Soro                      7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Células brancas      8. <input type="checkbox"/> Urina</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Escarro                      9. <input type="checkbox"/> Outros</p> <p>5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico      99. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>

Responsável pelo preenchimento da ficha: \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_

Responsável pelos exames moleculares: \_\_\_\_\_

## ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO SUSPEITO

PACIENTE: _____	IDADE: _____
HOSPITAL: _____	Prontuário: _____
ENDEREÇO DO PACIENTE: _____ Nº: _____	
BAIRRO: _____	CIDADE: _____ ESTADO: _____

### TERMO DE CONSENTIMENTO

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa - “**DETECÇÃO RÁPIDA E DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS ATRAVÉS DE UM SISTEMA DE PCR MULTIPLEX.**”, após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

#### TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

**Título do Projeto: Detecção rápida e diferenciação de espécies de micobactérias através de um sistema de PCR multiplex.**

**Pesquisador (a) Responsável:** Andrea Santos Lima

**Telefones para contato:** (81) 2101-2560 ou 2101-2569

**Pesquisadores Participantes:** Dr<sup>a</sup> Haiana Charifker Schindler, Lílian Maria Lapa Montenegro

**Objetivos:** Avaliar um sistema baseado em PCR multiplex para a identificação e diferenciação de espécies de micobactéria em diferentes amostras clínicas de pacientes com suspeita de infecção por micobactérias

**Procedimentos do estudo:** Quando o Sr (a) for atendido pelo médico (a) assistente do hospital, você responderá a um questionário onde irão constar: nome, endereço, telefone para contato, característica do domicílio, escolaridade, queixas principais e tempo de duração, se está tomando algum remédio, exames físico, laboratoriais e tratamento atual. O preenchimento do questionário será feito por um estudante de medicina.

O Sr(a) será acompanhado por uma equipe formada por profissionais de várias áreas envolvendo os médico responsáveis pela Instituição com experiência reconhecida no diagnóstico e tratamento da tuberculose, enfermeiras e técnicos que coletarão outros exames necessários e seguirão os procedimentos adequados e de rotina do hospital para cada caso. O acompanhamento e tratamento serão feitos pelo médico assistente do serviço de saúde que é responsável por todos os leitos, cujos pacientes estão sendo investigados quanto à existência ou não de Tuberculose. Caso for diagnosticada a doença será utilizado como terapia de primeira escolha o esquema com rifampicina, isonizida e pirazinamida para o tratamento e se necessário, um esquema de segunda escolha será oferecido em casos selecionados. Todo o medicamento será fornecido pela rede SUS (seja pelo fornecido pelo Hospital ou pelo Posto de Saúde).

Para a nossa pesquisa o tipo de amostra clínica a ser coletada dependerá da forma da TB que esta sendo investigada, entretanto a coleta de sangue e urina será feita de todos os indivíduos selecionados para a pesquisa, sendo 5ml de sangue (equivalente a meia colher de sopa), 30ml de urina (equivalente a três colheres de sopa), 1-5ml de Escarro (equivalente a meia colher de sopa de catarro), 2-10ml de líquido Pleural (equivalente a uma colher de sopa), 2-10ml Lavado Bronco Alveolar (equivalente a uma colher de sopa, 2-10ml de Líquor (equivalente a uma colher de sopa de aspirado da coluna) serão encaminhadas ao laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de Imunologia do CPqAM para ser submetida a técnica de identificação do DNA do bacilo da tuberculose por profissionais capacitados. Os resultados de todos os exames serão repassados ao médico responsável pelo atendimento para ser encaminhado ao paciente. Os volumes restantes de cada amostra, após realização dos exames, serão congelados e armazenadas em nosso laboratório para repetição do exame caso seja necessário durante o estudo.

**Participação na pesquisa de menores de 18 anos:** Caso o indivíduo selecionado for menor de 18 anos, o seu responsável legal dará o consentimento por escrito através do termo de consentimento para a coleta do(s) material (ais) biológico(s) necessário(s) e sua participação na pesquisa.

**Riscos e Benefícios:** O Sr(a) não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermaria. O benefício deste estudo será contribuir para o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, específicas, rápidas e menos dolorosas que possam ser adequadas à realidade do nosso sistema público de saúde, e a padronização de critérios mais eficazes que irão beneficiar a identificação rápida da tuberculose pulmonar e extrapulmonar.

**Custo/Reembolso para o paciente:** Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

O Sr (a) poderá entrar em contato com o responsável pela amostra no endereço abaixo:

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ  
Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia  
Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.  
Campus da UFPE.

Fone: (81) 2101-2569

Contato: Andrea Santos Lima, Lílian Maria Lapa Montenegro, Dra. Haiana Charifker Schindler, Rosana de Albuquerque Montenegro, Fabiana Cristina Fulco Santos.

## CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG/CPF \_\_\_\_\_ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionado ou constrangido concordo participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o nome do paciente.

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou do responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico/pesquisador

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

## ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO CONTROLE

PACIENTE: _____	IDADE: _____
HOSPITAL: _____	Prontuário: _____
ENDEREÇO DO PACIENTE: _____ Nº: _____	
BAIRRO: _____	CIDADE: _____ ESTADO: _____

### TERMO DE CONSENTIMENTO

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa - “**DETECÇÃO RÁPIDA E DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS ATRAVÉS DE UM SISTEMA DE PCR MULTIPLEX.**”, após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

#### TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:

**Título do Projeto: Detecção rápida e diferenciação de espécies de micobactérias através de um sistema de PCR multiplex.**

**Pesquisador (a) Responsável:** Andrea Santos Lima

**Telefones para contato:** (81) 2101-2560 ou 2101-2569

**Pesquisadores Participantes:** Dr<sup>a</sup> Haiana Charifker Schindler, Lílian Maria Lapa Montenegro

**Objetivos:** Avaliar um sistema baseado em PCR multiplex para a identificação e diferenciação de espécies de micobactéria em diferentes amostras clínicas de pacientes com suspeita de infecção por micobactérias

**Procedimentos do estudo:** Quando o Sr (a) for atendido pelo médico (a) assistente do hospital, você responderá a um questionário onde irão constar: nome, endereço, telefone para contato, característica do domicílio, escolaridade, queixas principais e tempo de duração, se está tomando algum remédio, exames físico, laboratoriais e tratamento atual. O preenchimento do questionário será feito por um estudante de medicina.

O Sr(a) será acompanhado por uma equipe formada por profissionais de várias áreas envolvendo os médico responsáveis pela Instituição com experiência reconhecida no diagnóstico e tratamento da tuberculose, enfermeiras e técnicos que coletarão outros exames necessários e seguirão os procedimentos adequados e de rotina do hospital para cada caso. O acompanhamento e tratamento serão feitos pelo médico assistente do serviço de saúde que é responsável por todos os leitos, cujos pacientes estão sendo investigados quanto à existência ou não de Tuberculose. Caso for diagnosticada a doença será utilizado como terapia de primeira escolha o esquema com rifampicina, isonizida e pirazinamida para o tratamento e se necessário, um esquema de segunda escolha será oferecido em casos selecionados. Todo o medicamento será fornecido pela rede SUS (seja pelo fornecido pelo Hospital ou pelo Posto de Saúde).

Para a nossa pesquisa o tipo de amostra clínica a ser coletada dependerá da forma da TB que esta sendo investigada, entretanto a coleta de sangue e urina será feita de todos os indivíduos selecionados para a pesquisa, sendo 5ml de sangue (equivalente a meia colher de sopa), 30ml de urina (equivalente a três colheres de sopa), 1-5ml de Escarro (equivalente a meia colher de sopa de catarro), 2-10ml de líquido Pleural (equivalente a uma colher de sopa), 2-10ml Lavado Bronco Alveolar (equivalente a uma colher de sopa, 2-10ml de Líquor (equivalente a uma colher de sopa de aspirado da coluna) serão encaminhadas ao laboratório de Imunoepidemiologia do departamento de Imunologia do CPqAM para ser submetida a técnica de identificação do DNA do bacilo da tuberculose por profissionais capacitados. Os resultados de todos os exames serão repassados ao médico responsável pelo atendimento para ser encaminhado ao paciente Os volumes restantes de cada amostra, após realização dos exames, serão congelados e armazenadas em nosso laboratório para repetição do exame caso seja necessário durante o estudo.



**Participação na pesquisa de menores de 18 anos:** Caso o indivíduo selecionado for menor de 18 anos, o seu responsável legal dará o consentimento por escrito através do termo de consentimento para a coleta do(s) material (ais) biológico(s) necessário(s) e sua participação na pesquisa.

**Riscos e Benefícios:** O Sr(a) não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermaria. O benefício deste estudo será contribuir para o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, específicas, rápidas e menos dolorosas que possam ser adequadas à realidade do nosso sistema público de saúde, e a padronização de critérios mais eficazes que irão beneficiar a identificação rápida da tuberculose pulmonar e extrapulmonar.

**Custo/Reembolso para o paciente:** Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

\_O Sr (a) poderá entrar em contato com o responsável pela amostra no endereço abaixo:

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ  
Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia  
Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.  
Campus da UFPE.

Fone: (81) 2101-2569

Contato: , Andrea Santos Lima, Lílian Maria Lapa Montenegro, Dra. Haiana Charifker Schindler, Rosana de Albuquerque Montenegro, Fabiana Cristina Fulco Santos.

## CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG/CPF \_\_\_\_\_ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionado ou constrangido concordo participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o nome do paciente.

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou do responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico/pesquisador

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

## ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CPqAM/Fiocruz



Comitê de Ética  
em Pesquisa

**Título do Projeto:** Detecção rápida e diferenciação de micobactérias através de um sistema PCR Multiplex.

**Pesquisador responsável:** Andrea Santos Lima

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 17/08/09

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 24/09


**Registro no CAAE:** 0022.0.000.095-09

### PARECER Nº 39/2009

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 03 de setembro de 2012. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 03 de setembro de 2009.

*Giselle Campozana Gouveia*  

 Giselle Campozana Gouveia  
 Farmacêutica  
 Coordenadora  
 Mat. SIAPE 0463376  
 CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 03/09/2010.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n  
 CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639  
 Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639  
 Recife - PE - Brasil  
 comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

  
 Centro de Pesquisas  
 AGGEU  
 MAGALHÃES

  
 FIOCRUZ  
 Ministério da Saúde