

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *Mycobacterium spp.*
UTILIZANDO ABORDAGEM MOLECULAR BASEADA EM
PCR PARA O ALVO 16S-23S DO rDNA.**

JULIANA FALCÃO DE ARAÚJO LIMA

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *Mycobacterium spp.* UTILIZANDO
ABORDAGEM MOLECULAR BASEADA EM PCR PARA O ALVO 16S-
23S DO rDNA.**

JULIANA FALCÃO DE ARAÚJO LIMA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas/
Biotecnologia pela UFPE

Orientador: Prof^a Dra. Christina Alves Peixoto

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Haiana Charifker Schindler

**RECIFE
2010**

Lima, Juliana Falcão de Araújo

Identificação de cepas de *Mycobacterium* spp. utilizando abordagem molecular baseada em PCR para o alvo 16S-23S do rDNA / Juliana Falcão de Araújo Lima. – Recife: O Autor, 2010.

56 folhas : il., fig., tab. •

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Tuberculose – Diagnóstico 2. *Mycobacterium tuberculosis* 3. Genética 4. Genoma I. Título.

616.995

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010 - 113

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Parecer da comissão examinadora da dissertação de:
Juliana Falcão de Araújo Lima**

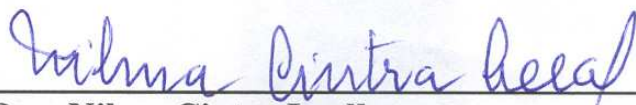
intitulada:

**IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *Mycobacterium spp.* UTILIZANDO ABORDAGEM
MOLECULAR BASEADA EM PCR PARA O ALVO 16S-23S DO rDNA.**

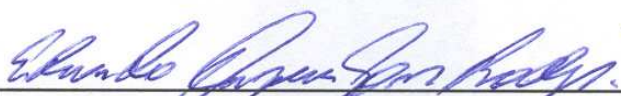
**A comissão examinadora considera o presente trabalho
APROVADO**

**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Juliana Falcão de Araújo Lima faz
jus ao grau de Mestre em Ciências Biológicas/Biotecnologia pela UFPE.**

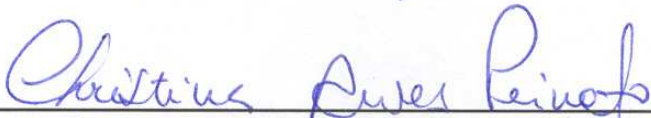
Recife, 26/03/2010



**1º Examinador: [Dra. Nilma Cintra Leal]
[CPqAM/FIOCRUZ]**



**2º Examinador: [Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues]
[CPqAM/FIOCRUZ]**



**Orientador: Profª Dra. Christina Alves Peixoto
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE**



**Co-orientador: Profª Drª Haiana Charifker Schindler
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ**

Dedico este trabalho, fruto de muita dedicação, aos meus pais LÍlian e Roberto, que me apóiam e incentivam com seu amor incondicional, me proporcionando confiança no caminho trilhado; as minhas irmãs Mariana e Roberta, pela compreensão durante os períodos de dificuldade e pela grande ajuda dispensada no dia-a-dia; ao meu filho Roberto que é a luz e a inspiração da minha vida; a Rafael Cabral, meu futuro marido, o meu exemplo de determinação.

AGRADECIMENTOS

Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

À nossa coordenadora Dra. Haiana Charifker Schindler pela valiosa oportunidade de aprendizagem e pela confiança em mim depositada, permitindo desfrutar deste ambiente de aprendizagem diária científica, profissional e pessoal.

Ao Dr. Fabio Lopes idealizador deste projeto pelas infindáveis horas de discussão que contribuíram para meu aprimoramento técnico-científico e por sua amizade;

À doutoranda e amiga Rosana Montenegro incentivadora e colaboradora deste trabalho desde sua elaboração.

À minha mentora Lílían Montenegro por sua disponibilidade irrestrita, pelos momentos dedicados ao desenvolvimento desta dissertação e sem dúvida por sua compreensão e amizade;

À pesquisadora Dra. Christina Peixoto por abrir as portas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para mim no momento em que aceitou este projeto;

Aos amigos do Laboratório de Imunoepidemiologia: Juliana, Heidi, Andréa, Fabiana, Laís, Márcia, André que estiveram sempre presentes, tanto em horas de alegrias com em horas de tristeza, tornando-nos uma grande família;

Aos amigos e companheiros de toda hora: Neide, Bruna, Diogo, Marina, Suellen, Isabel Renata, Maria Claudia, Ana Carolina e Bruno;

A todos do departamento de imunologia que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho;

A Simone, secretária do departamento e amiga, pela grande ajuda resolvendo toda burocracia ligada ao laboratório de Imunoepidemiologia e a este projeto;

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas por esta oportunidade de crescimento profissional;

*O segredo é não correr atrás das borboletas...
É cuidar do jardim para que elas venham até você.
Mário Quintana*

RESUMO

A tuberculose (TB) continua a ser um grave problema de saúde pública. O Brasil, segundo a Organização Mundial da Saúde, ocupa o 18º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. O diagnóstico definitivo da tuberculose é dado pela presença do bacilo através da baciloscopia ou cultura. A cultura apresenta uma sensibilidade maior comparada à baciloscopia, porém necessita de quatro a oito semanas para a multiplicação do bacilo, retardando o diagnóstico definitivo da doença, e os resultados muitas vezes não informam de maneira adequada o direcionamento das decisões clínicas. Os métodos moleculares são úteis para diagnóstico e estudos epidemiológicos da tuberculose. A tipagem molecular é, assim, uma ferramenta epidemiológica importante no controle das infecções. Regiões do genoma do *Mycobacterium* contêm informações específicas da espécie ou mesmo de variantes de cepas. As regiões espaçadoras que separam os genes codificados pelo 16S, 23S e 5S caracterizadas por um alto grau de variação de sequência e tamanho, tanto a nível de gênero quanto espécie. Esta diversidade deve-se, principalmente, a variação no número e no tipo de sequência do tRNA encontrada no interior das regiões espaçadoras, sendo exploradas em estudos discriminatórios. O objetivo do estudo é identificar as cepas de *Mycobacterium* spp. através da técnica de PCR utilizando como alvo a região espaçadora 16S-23S rDNA (ITS-PCR). Para isso foram utilizadas cepas de micobactérias isoladas de meio de cultura específico, provenientes de amostras clínicas coletadas de pacientes diagnosticados com tuberculose doença e infecção por outras micobactérias, encaminhados de hospitais públicos do estado de Pernambuco, para confirmação diagnóstica laboratorial através dos exames convencionais de baciloscopia e cultura. A identificação dos bacilos foi realizada observando a velocidade de crescimento da(s) colônia(s) e pela provas bioquímicas (niacina, catalase, PNB e TCH). As micobactérias não tuberculosas foram identificadas utilizando a técnica molecular de PRA-hsp65, através da colaboração com o Laboratório de Micobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Foram analisados 20 isolados clínicos confirmados por testes bioquímicos e fenotípicos, a maioria proveniente de enfermaria (65%). A média de idade dos pacientes foi de 38,5, estando dentro da média nacional, entre 20 e 49 anos. A maioria sendo do sexo masculino, 65% (n=13), que se justifica por ser o grupo mais exposto à doença. A ITS-PCR e PRA-hsp65 apresentaram concordância de 85,7% e 100%, respectivamente. O sistema de ITS-PCR foi capaz de identificar as cepas de *Mycobacterium* spp. isoladas em meio de cultura. A ITS-PCR se mostra uma ferramenta útil para auxiliar na diferenciação das infecções causadas por TB e por MNT e pode ser utilizada como ferramenta molecular complementar no diagnóstico diferencial quando os testes convencionais apresentam-se inconclusivos.

Palavras-chave: *Mycobacterium* spp, 16S-23S rDNA, identificação.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains a serious public health problem. Brazil, according to World Health Organization, occupies the 18th place among 22 countries responsible for 80% of all tuberculosis cases worldwide. The definitive diagnosis of TB is given by the presence of the bacillus by smear or culture. The culture may be more sensitive compared to the smear, but it requires four to eight weeks for the multiplication of the bacillus, delaying definitive diagnosis of the disease is still arduous and the results often do not adequately inform the targeting of clinical decisions. Molecular methods are useful for epidemiological studies of tuberculosis. Molecular typing is therefore an important epidemiological tool in controlling infections. Regions of the genome of *Mycobacterium* contains information specific to the species or variant strains. The spacer region separating the gene encoded by the 16S, 23S and 5S characterized by a high degree of sequence variation and size, both as species of the genus. This diversity is due mainly to variation in the number and type of sequence found within the tRNA spacer region, being explored in studies discriminatory. The objective is to identify the strains of *Mycobacterium* spp. by using PCR targeting the spacer region 16S-23S rDNA (ITS-PCR). For such purpose, mycobacterial strains isolated from specific culture medium, from clinical specimens collected from patients diagnosed with tuberculosis disease and infection with other mycobacteria, referred from public hospitals in the state of Pernambuco, to confirm the diagnosis through laboratory tests of conventional smear and culture. The identification of the bacilli was performed by observing the growth rate (s) of the colony (s) and biochemical tests (niacin, catalase, PNB and TCH). Nontuberculous mycobacteria were identified using molecular techniques, PRA-hsp65, through collaboration with the Laboratory of Mycobacteria of the Federal University of Rio de Janeiro. We analyzed 20 clinical isolates confirmed by phenotypic and biochemical tests, most from nursing (65%). The average patient age was 38.5, being within the national average, between 20 and 49 years. Most were male, 65% (n = 13), which is justified by being the group most exposed to the disease. The ITS-PCR and PRA-hsp65 were concordant for 85.7% and 100% respectively. The ITS-PCR system was able to identify strains of *Mycobacterium* spp. isolated from the culture medium. The ITS-PCR proves a useful tool to help differentiate infections caused by TB and NTM and can be used as additional molecular tool in the differential diagnosis when conventional tests are presented inconclusive.

Palavras-chave: *Mycobacterium* spp, 16S-23S rDNA, identification

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1 Estimativa da taxas de incidência de tuberculose.....	17
Figura 2 Microscopia eletrônica do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
Figura 3 Regiões espaçadoras 16S-23S rDNA	29
Figura 4 Eletroforese em gel de agarose, demonstrando a otimização da temperatura de anelamento do oligonucleotídeos.....	39
Figura 5 Eletroforese em gel de agarose a 2%, demonstrando o padrão de bandejamento produzido pela ITS-PCR de cepas de <i>Mycobacterium spp</i>	40
Figura 6 Eletroforese em gel de agarose demonstrando o padrão molecular de cepas de <i>Mycobacterium spp</i> , obtidas de meio de cultura Lowestein-Jensen, isolados de amostras clínicas de pacientes com diagnóstico de micobacteriose, produzido pela ITS-PCR.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
Tabela 1	Apresentação dos oligonucleotídeos utilizados na ITS-PCR.....	36
Tabela 2	Desempenho da técnica de ITS-PCR e do PRA- <i>hsp65</i>	42
Tabela 3	Características clínicas e demográficas dos 20 pacientes estudados..	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- Água Milli-Q – água ultra pura;
- BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
- CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães;
- dATP- desoxiadenosina;
- dCTP – desoxicitosina;
- dGTP – desoxiguanina;
- dTTP – desoxitimina;
- dNTP – desoxinucleotídeos;
- DNA - Ácido desoxirribonucléico;
- DOTS – Tratamento Diretamente Supervisionado
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz;
- HBL - Hospital Barão de Lucena;
- HC-UFPE - Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco;
- HGOF - Hospital Geral Otávio de Freitas;
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana;
- ITS-PCR – Reação em cadeia da polimerase utilizando como alvo a região espaçadora 16S-23S rDNA ;
- LJ - Löwenstein-Jensen;
- MgCl₂ – Cloreto de magnésio;
- min. – minutos;
- mM – milimolar;
- MNT - Micobactérias não tuberculosas;
- MTB – *Mycobacterium tuberculosis*;
- ng – nanogramas;
- OMS – Organização Mundial de Saúde;
- pb – pares de bases;
- PCR – Reação em cadeia da polimerase;
- pMol – picomol;
- PRA-PCR - Análise de restrição do polimorfismo do DNA por PCR;
- rDNA – DNA codificador do RNA ribossomal;
- rpm – rotações por minuto;
- rRNA – RNA ribossomal;
- SINAN/MS - Sistema de Informação de Notificação de Agravos do Ministério da Saúde;
- Taq polimerase – enzima termofílica da bactéria *Thermus aquaticus*,
- TB – tuberculose;
- ° C – Grau(s) Celsius;
- µl – Microlitro.

SUMÁRIO

Item	Página
1. Introdução.....	14
1.1 Histórico.....	15
1.2 Epidemiologia.....	16
1.2.1 A tuberculose no mundo.....	16
1.2.2 A tuberculose no Brasil.....	18
1.2.3 A tuberculose em Pernambuco.....	18
1.3 Agente Etiológico.....	19
1.3.1 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.3.2 Micobacterias Não Tuberculosas (MNTs).....	21
1.4 Métodos de detecção de Micobactérias.....	22
1.4.1 Baciloscopia.....	23
1.4.2 Cultura e identificação bioquímica.....	23
1.4.3 Métodos moleculares.....	24
1.4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	25
1.4.3.1.1 PCR convencional.....	25
1.4.3.1.2 PCR Multiplex.....	26
1.4.3.1.3 Nested-PCR.....	26
1.4.3.1.4 Nested PCR em único tubo (STNPCR).....	27
1.4.3.2 Regiões espaçadoras 16S-23S rRNA.....	28
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Materiais e Métodos.....	32
3.1. Informações do estudo.....	33
3.2 Casuística.....	33
3.3 Considerações Éticas.....	33
3.4 Critérios de inclusão.....	33
3.5 Critérios de exclusão.....	33
3.6 Critérios de perda.....	34
3.7 Isolados micobacterianos.....	34
3.8 Métodos laboratoriais convencionais de diagnóstico de	

micobacterioses.....	34
3.8.1 Baciloscopia.....	34
3.8.2 Descontaminação.....	34
3.8.3 Cultura de bacilos e testes de identificação.....	35
3.9 Métodos Moleculares.....	35
3.9.1 Extração e purificação de DNA genômico de micobactérias.....	35
3.9.2 Quantificação do DNA extraído de micobactérias.....	35
3.9.3 Reação de amplificação por PCR.....	36
3.9.3.1 Reação de ITS-PCR.....	36
3.9.4 Eletroforese.....	36
3.10 Análise Estatística.....	36
4. Resultados e Discussão.....	37
5. Conclusões.....	45
6. Referências Bibliográficas.....	47
7. Anexos.....	55
7.1 Parecer do comitê de ética.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Há evidências que a tuberculose existe desde os tempos pré-históricos tendo sido encontrada em esqueletos de múmias do antigo Egito (3000 a.C) e, numa múmia pré-colombiana no Peru. A doença disseminou-se na Europa, com a urbanização crescente e no século XVIII tornou-se conhecida como a peste branca (Brasil, 2007).

No Brasil, em meados do século XIX, a medicina associava a tuberculose (*tísica*) diretamente às condições de miséria em que vivia a população, acreditava-se também que ela estava intrinsecamente ligada à hereditariedade, devido ao adoecimento de várias pessoas da mesma família. Contudo, a teoria mais corrente definia a tuberculose como uma doença da “constituição”, ou seja, nascia-se com o organismo predisposto ou com a moléstia. Talvez esta idéia tenha-se formado devido ao fato de muitas crianças nascerem doentes ou mortas, quando a mãe sofria do mal. Na época, não havia métodos diagnósticos e nem terapêuticos eficazes para combater-la e também não se sabia qual o agente causador da doença, nem como lidar com ele (GONÇALVES, 2000).

Em 1882, um dos grandes trabalhos sobre a tuberculose (TB) foi realizado por Robert Koch, que isolou e cultivou o *Mycobacterium tuberculosis* de tubérculos macerados, identificando assim o agente etiológico da doença (BLOOM & MURRAY, 1992). Em 1890, Koch anunciou a descoberta de um líquido, nomeado tuberculina, como uma ferramenta útil na detecção da doença, devido a intensidade da reação desenvolvida por animais doentes quando inoculados com essa substância. Este conceito perpetuou-se por vários anos até a observação de que tanto animais saudáveis quanto doentes poderiam responder à droga. Como resultado, ficou estabelecido que animais infectados com o *M. tuberculosis* reagiriam à tuberculina, diferentemente dos indivíduos saudáveis. O teste tuberculínico tornou-se, então, a principal ferramenta diagnóstica para os casos de infecção pelo bacilo (DUCATI et al., 2006). No mesmo período, Koch desenvolveu métodos de coloração para sua identificação. Estas técnicas foram subsequentemente melhoradas pelo doutor e bacteriologista alemão Paul Ehrlich, cujo método de detecção do bacilo proporcionou a base para o desenvolvimento da coloração de Ziehl-Nielsen, sendo uma das ferramentas diagnóstica mais importantes que vem sendo utilizada até o momento (DUCATI et al, 2006).

A descoberta de Koch permitiu que outros pesquisadores concentrassem esforços no desenvolvimento de novas terapias mais eficazes para o tratamento de pacientes

tuberculosos. Em 1916, os jovens cientistas Albert Calmette e Camille Guérin conseguiram isolar uma linhagem avirulenta do *Mycobacterium bovis* e a partir de sucessivas repicagens em meio de cultura, desenvolveram a vacina intradérmica, atualmente conhecida como BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), amplamente utilizada para combater a tuberculose, de maneira profilática em crianças (DUCATI et al, 2006).

Porém, a noção de doença social, de flagelo social ou doença operária tornava-se cada vez mais forte no país, pois, baseava-se na capacidade de contaminação e nas condições de vida desfavoráveis daqueles que a contraíam e disseminavam: os pobres e os trabalhadores (GONÇALVES, 2000).

Ao final do século XIX, a associação da doença com as condições de vida e higiene trouxe à tona a diferenciação e o repúdio social destes doentes, rotulando-os como responsáveis por um tipo de mal social. Tornaram-se perigosos e contagiosos para a sociedade saudável. A tuberculose passou de doença social a ser tratada como doença individual e a saúde, neste contexto, parecia ser um bem percebido e valorizado (GONÇALVES, 2000).

Como a evolução clínica da tuberculose é lenta, os sintomas não eram, de início, atribuídos primeiramente a ela. Além disso, alguns sinais clínicos não eram únicos da tuberculose, e os que eram podiam manifestar-se com menor intensidade, levando o doente a crer que não possuía sintomas específicos da enfermidade. Isto, particularmente, levava à demora do diagnóstico, ao agravamento do estado físico, ao tratamento mais prolongado e, em síntese, à maior disseminação da doença (GONÇALVES, 2000).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

1.2.1. A tuberculose no mundo

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publica um relatório anual sobre o controle global da tuberculose (TB) a cada ano desde 1997 cujo principal objetivo é fornecer uma avaliação atualizada da epidemia da TB e os progressos no controle da doença em nível global, regional e do país no contexto das metas globais estabelecidas para 2015. O relatório de 2009 (13^a da série) foi publicado, como em todos os anos anteriores, em 24 de Março - Dia Mundial da Tuberculose (OMS, 2008).

A tuberculose é contagiosa e se propaga através do ar. Caso não tratada, cada pessoa pode contaminar, em média, 10 a 15 indivíduos por ano. Estima-se que cerca 2 bilhões de

peessoas estejam infectados com o bacilo da tuberculose, ou seja, uma em cada 10 pessoas infectadas torna-se doentes com tuberculose ativa (OMS, 2008).

Em 2008 foi notificado 9,4 milhões de novos casos, sendo 1,4 milhões coinfectados com HIV. A mortalidade em 2008 foi de 1,8 milhões de pessoas, incluindo 500 000 pessoas com HIV, o equivalente a 4.500 mortes por dia (OMS, 2008).

A desigualdade social é o aspecto de maior importância, uma vez que essa tem sido a responsável pela geração de pobreza e má nutrição, condições precárias de moradia e educação entre outros, que influenciam praticamente todos os outros fatores associados ao desenvolvimento da tuberculose (DUCATI et al., 2006).

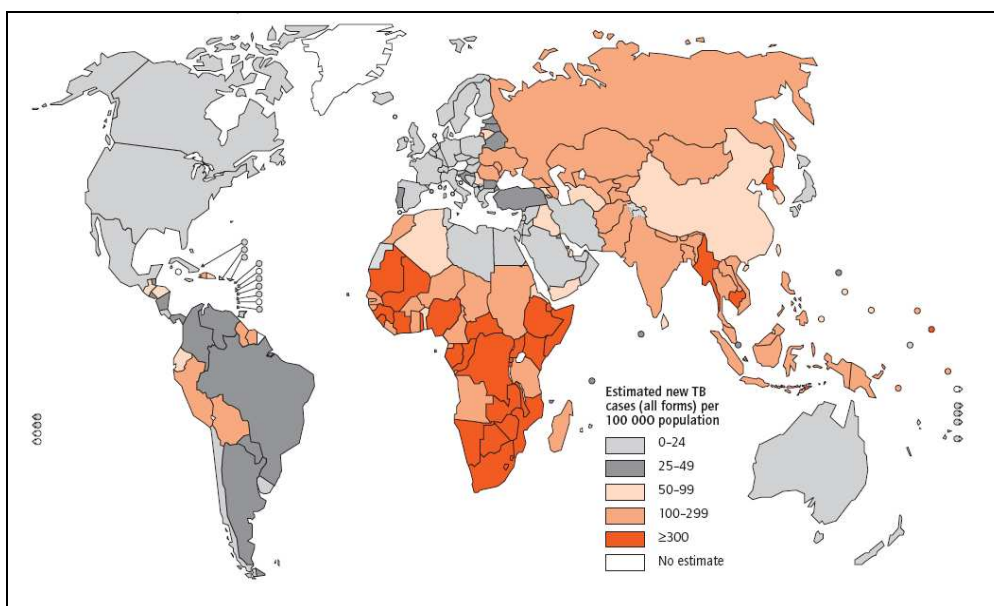


FIGURA 1: Estimativa da taxas de incidência de tuberculose. **FONTE:** OMS, 2009

Aproximadamente, 95% dos casos de tuberculose ocorrem nos países em desenvolvimento, países esses que detêm 98% dos casos de mortes mundiais por TB (KHAN et al., 2005; OMS, 2009). Tais dados referem-se principalmente a países como a África, sudeste da Ásia e algumas regiões do Pacífico (Figura 1), onde a TB tem se transformado em ameaça tanto para a Saúde Pública quanto para a economia. É consenso mundial que para o controle da tuberculose é necessário uma intervenção em nível global (OMS, 2008).

1.2.2. A tuberculose no Brasil

Um novo balanço do Ministério da Saúde sobre a incidência de casos de tuberculose mostra queda na taxa de detecção da doença no Brasil, que passou de 51,44/100 mil habitantes, em 1999, para 37,12, em 2008. Segundo dados divulgados em 2009, no Rio de Janeiro, isto representa uma redução de 27,58% em 10 anos. Em números absolutos, o Brasil registrou 82.934 novos casos no final da década passada, contra 70.379 no ano de 2009 (BRASIL, 2009).

Segundo a OMS, 22 países concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo e nos últimos três anos, o Brasil passou da 14^a para a 18^a posição no ranking mundial de casos da doença, o que significa que algumas ações de controle estão sendo eficazes, sobretudo em relação ao DOTS. Além do que a TB é a 4^a causa de morte por doenças infecciosas e a 1^a em pacientes com AIDS (BRASIL, 2009).

Referindo-se à influência dos fatores responsáveis pelo crescimento dos casos de TB no mundo, quando comparado a outros países o Brasil apresenta uma condição intermediária, uma prevalência pequena quanto ao problema da multirresistência às drogas, porém existe uma grande desigualdade social, com grupos populacionais mais vulneráveis à tuberculose como os índios, os presidiários e os moradores de rua (DUCATI et al., 2006; BRASIL, 2009).

Além da redução de casos (incidência e óbitos), o novo balanço mostra a expansão da cobertura do tratamento supervisionado (DOTS), que consiste no acompanhamento do paciente durante os seis meses em que ele necessita tomar os medicamentos contra a doença. Essa medida integra a lista de recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para aumentar o percentual de cura da tuberculose. Desde que foi adotado no Brasil, a partir de 2001, o percentual de cobertura do tratamento supervisionado cresceu de 3,5% dos casos novos para 39,4% (BRASIL, 2009).

1.2.3. A tuberculose em Pernambuco

O Nordeste é a segunda maior região em taxa de incidência de tuberculose, com 48.7 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2007). No estado de Pernambuco, foram notificados 4.200 novos casos de tuberculose, em 2008, sendo aproximadamente 4% em crianças e adolescentes (0 a 14 anos). Um dos fatores que sinaliza urgência no combate à doença no Estado é a constatação de que Pernambuco encontra-se entre os piores no País em incidência

de tuberculose, com uma taxa de 47,79 casos para cada 100 mil habitantes, número este acima da média nacional de 41,7/100 mil habitantes, ficando atrás apenas dos estados do Rio de Janeiro e do Amazonas (BRASIL, 2009).

Pernambuco permanece em primeiro lugar tanto para as taxas de incidência quanto de mortalidade. Uma posição nada animadora para uma doença milenar e que disponibiliza de tratamento há muito tempo, desde 1849, quando o médico Joaquim de Aquino Fonseca, dirigente do Conselho Geral de Salubridade da Província de Pernambuco, alertou o governo para o aumento dos casos de tuberculose. Em 1894, Octávio de Freitas voltou-se inteiramente para o enfrentamento dessa doença, do qual resultou a criação da Liga Pernambucana contra a Tuberculose, inaugurada em julho de 1900 no Teatro Santa Isabel (FUNDO GLOBAL, 2008).

Atualmente, o Governo Brasileiro considera Recife uma das cidades brasileiras de prioridade para a execução de medidas de controle para a TB. Além disso, a população carcerária é uma das mais afetadas pela doença, tendo sido registrados em 2008, 826 casos nos presídios do Estado, tornando-se uma doença grave e de amplo espectro dentro do cenário da Saúde Pública do País (BRASIL, 2009).

1.3. AGENTE ETIOLÓGICO

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, subordem Corinebacteriaceae, ordem Actinomycetales. O gênero *Mycobacterium* compreende cerca de 100 espécies, sendo a maioria saprófitas de vida livre (UEKI et al., 2005).

O *M. tuberculosis* é uma forma de transição entre as eubactérias e os actinomicetos. Mede de 1 a 4 µm de comprimento por 0,3 a 0,6 µm de largura, além de apresentar um complexo envelope celular e homogeneidade genética. Trata-se de um bacilo imóvel que não forma esporos, não produz toxinas, aeróbio estrito e cujo único reservatório é o ser humano (KRITSKI et al., 1997).

Sua parede é constituída principalmente por ácidos micólicos, formando uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação, à descoloração por álcool e ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos, bem como à ação de agentes físicos, como o calor e a radiação ultravioleta. Por ser capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior de células fagocitárias, é considerado um parasito intracelular facultativo (BRASIL, 2002).

Os bacilos crescem lentamente, com tempo de geração de 18 a 48 horas, tanto em meio artificial quanto em organismos animais, dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio, sendo necessárias várias semanas para que as colônias tornem-se visíveis no meio de cultura (KRITSKI et al., 1997). Algumas vezes formam filamentos e tendem a crescer em cachos, característica dada por um componente céreo da célula, o fator de encordamento (TORTORA et al, 2003).

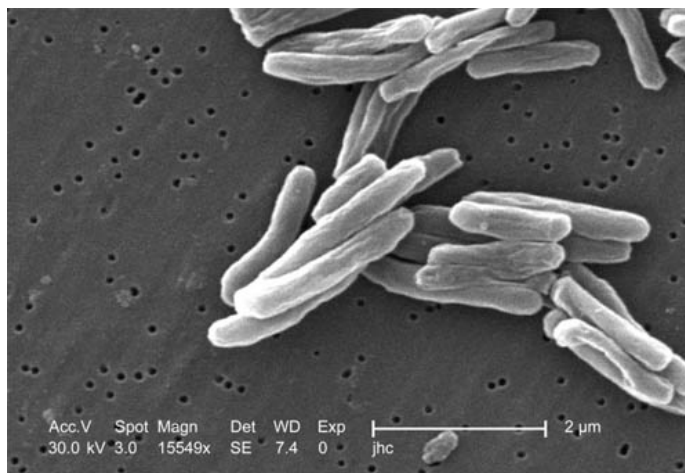


Figura 2: Microscopia eletrônica do *Mycobacterium tuberculosis* **Fonte:**allamericanpatriots.com

1.3.1. Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose, doença causada pelas espécies do complexo *M. tuberculosis*, é a mais comum infecção micobacteriana em países em desenvolvimento (MOKADDAS & AHMAD, 2007).

As espécies que constituem o complexo *Mycobacterium tuberculosis* são: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium microti* que causam a tuberculose humana e animal (UEKI et al., 2005).

Tradicionalmente, a identificação das espécies do complexo se baseia em suas características morfológicas e sua tolerância ao ácido 2-tiofencarboxílico (TCH). Classicamente, a tolerância ao TCH é assinalada no *M. tuberculosis*. Contudo, Yates e col. (1982) mostraram que uma grande quantidade das cepas isoladas de pacientes asiáticos apresentavam sensibilidade ao TCH, o que dividiu o *M. tuberculosis* em “variedade clássica” e “variedade asiática” (HERRERA-LEON et al, 2009).

1.3.2. Micobactérias Não Tuberculosas (MNTs)

Pertencem ao gênero *Mycobacterium spp.* mais de 100 espécies de micobactérias que ao longo do tempo tem recebido diversos nomes (atípicas, não tuberculosas, ambientais, oportunistas, entre outros.) que procuram ressaltar suas diferenças clínico-epidemiológicas das espécies do complexo *M. tuberculosis* (ESTEBAN et al, 2006). Várias Micobactérias não tuberculosas foram descritas. Essas espécies, geralmente oportunistas, são classificadas, conforme sua capacidade de causar doença no homem, como potencialmente patogênicas e não-patogênicas (UEKI et al., 2005).

Algumas espécies pertencentes às MNT são patogênicas tanto para homens como para animais, causando doença pulmonar, cutânea, linfadenite e infecções disseminadas. Estas espécies são um crescente risco a saúde da população, especialmente nos indivíduos imunodeficiente (CHEMLAL & PORTAELS, 2003; UEKI *et al.*, 2005).

As MNT's são documentadas como sendo responsáveis por infecções pulmonares humanas tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. A incidência entre 2 – 20% é notificada em várias partes do mundo, levando a taxas acentuadas de mortalidade e morbidade (MAWAK et al, 2006). Apesar do *M. tuberculosis* ser a micobactéria mais importante e isolada com mais frequência, as MNT's representam, na atualidade, 10% a 30% dos isolamentos em laboratórios de microbiologia clínica. Sendo um grande número delas patógenas para o homem, requer assim, um tratamento específico para cada caso. Por isso, diante de qualquer isolamento micobacteriano, se recomenda realizar uma identificação precisa de espécies, inclusive as do complexo *M. tuberculosis* (VEGA, 2006).

Sua importância tem aumentado com a melhora dos métodos diagnósticos, a descrição dos quadros clínicos que produzem, assim como a predisposição ao seu desenvolvimento evidenciado em pacientes imunodeprimidos, principalmente pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GARCIA GARCIA et al, 2005; WANGER & YOUNG, 2004).

Clinicamente e radiologicamente as doenças pulmonares produzidas por micobactérias não tuberculosas são indistinguíveis da tuberculose pulmonar clássica, contudo as duas doenças apresentam fundamental diferença em sua epidemiologia, conduta e prognóstico. É importante que os clínicos e os bacteriologistas avaliem que nem todo BAAR encontrado na baciloscopia é *M. tuberculosis* (MAWAK et al, 2006).

A maioria das MNTs são, em geral, causadoras de doenças cutâneas. Nos Estados Unidos e na Europa a espécie mais comum é o *M. marinum*. O *M. ulcerans* é endêmico em 32 países da África, Ásia e América do Sul (DODIUK-GAD et al, 2007). Já as micobactérias responsáveis por causar doença pulmonar são principalmente do complexo *M. avium* e o *M. kansasii*. Existem outros agentes que causam doença mais raramente, como as micobactérias de crescimento rápido, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. abscessus* e *M. chelonae*. Não se sabe bem o mecanismo de desenvolvimento dessa enfermidade, onde pode se encontrar lesões granulomatosas indistinguíveis das produzidas por *M. tuberculosis*, que se presume que tenha patogenia é similar (ESTEBAN et al, 2006).

Este grupo de micobactérias apresenta pouco contágio entre pessoas, incluindo os casos com baciloscopia positiva. Isto tem implicações práticas, pois se houver um caso de um paciente com diagnóstico de tuberculose, e posteriormente se demonstra uma micobactéria não tuberculosa, deve-se suspender tanto o estudo de contatos como o tratamento específico para tuberculose latente caso tenha sido iniciado (GARCIA GARCIA et al, 2005).

O número de espécies é muito grande e cresce à medida que os meios de identificação melhoram, mas existe um número limitado de espécies que provocam doença com maior ou menor incidência dependendo das diversas áreas geográficas. Os principais patógenos que provocam doença pulmonar são: *M. kansasii*, complexo *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. celatum*, *M. asiaticum* e *M. szulgai* (GARCIA GARCIA et al, 2005).

Em países desenvolvidos, à medida que diminui a incidência de tuberculose, a ocorrência das MNTs nas doenças pulmonares aumenta. A disseminação hematogênica das MNT's tem sido descrita com alta frequência após o advento da epidemia da AIDS, aumentando assim o fator de risco de doença disseminada por MNT, onde 95% desta é devido ao complexo *Mycobacterium avium* (MAC). Normalmente a espécie das MNT's não é identificada, o que não deixa claro a real prevalência destas doenças (FERREIRA et al, 2002).

1.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MYCOBACTÉRIAS

As técnicas bacteriológicas tradicionais permanecem como os únicos métodos seguros para diagnosticar TB, pois demonstram a presença do bacilo causador da patologia (KRITSKI et al, 1997). Para a identificação do gênero *Mycobacterium* existem diversos tipos de abordagens metodológicas: fenotípico convencional, cromatográfico e genotípico ou

molecular. Os métodos tradicionais se baseiam numa identificação preliminar mediante o tempo de crescimento (lento ou rápido), aspectos morfológicos e produção de pigmentos nas colônias, complementado por diferentes provas bioquímicas para uma identificação específica. Contudo, como os métodos fenotípicos são laboriosos e o tempo de crescimento é lento, a identificação demora várias semanas, e em muitos casos é impossível identificar a espécie (VEGA, 2006)

1.4.1 Baciloscopia

Uma das principais técnicas utilizadas é a baciloscopia, onde a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) no material biológico sinaliza para o diagnóstico de micobacteriose, não sendo possível distinguir entre as espécies de micobactérias, o que demanda tipagem posterior. Para que uma amostra seja positiva à baciloscopia, um mínimo de 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro deve estar presente, justificando a negatividade deste método nas formas paucibacilares (KRITSKI et al,1997). O rendimento desta técnica é de 50% a 80% dos casos de TB pulmonar, de acordo com a prevalência no local e com os cuidados metodológicos empregados na manipulação das amostras respiratórias (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2004).

1.4.2 Cultura e características bioquímica

Existem disponíveis vários meios de cultura para o isolamento das micobactérias. O mais utilizado no Brasil e recomendado pelo Ministério da Saúde é o de Löwenstein-Jensen (LJ), um meio sólido à base de ovo. A cultura exige o processamento do material, inoculação em meios de cultura, incubação em temperaturas adequadas, identificação das diferentes espécies por métodos bioquímicos convencionais e teste de avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos mais frequentes, utilizados no tratamento destas infecções. O tempo médio para esta detecção é geralmente longo, e a taxa de isolamento é inferior àquela obtida com a utilização de meios líquidos. Apesar de ainda não existir um processo automatizado que realize todas as etapas já mencionadas, alguns equipamentos, meios ou metodologias desenvolvidas já melhoraram muito os procedimentos citados em termos de tempo e mão-de-obra empregados na sua realização (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2004).

Vários estudos foram publicados estabelecendo critérios para o diagnóstico das infecções causadas pela MNT, pois estas espécies podem colonizar transitoriamente o homem. Embora exista certa variação entre esses critérios, todos enfatizam a importância do isolamento repetido do mesmo agente a partir de amostras biológicas não-estéreis ou obtidas de um cultivo puro de biópsia ou de outros fluidos de sítios estéreis. Os critérios aplicam-se a pacientes com sinais clínicos, radiológico ou histopatológico compatíveis com um quadro de infecção (UEKI et al, 2005).

As provas bioquímicas clássicas de identificação das micobactérias são: redução do nitrato, termoinativação da catalase a 68°C, produção da niacina, prova da urease, crescimento em presença de agentes inibidores (como o ácido paranitrobenzóico-PNB, hidrazida do ácido tiofeno-carboxílico-TCH) (BARRETO et. al, 2000)

Nas últimas décadas, com a excessiva confiança na efetividade do controle da tuberculose, através do uso do esquema terapêutico encurtado, gerou expectativas quanto a sua possível erradicação. Isso determinou gradual desinteresse pela pesquisa em TB, seja para obtenção de novos fármacos, seja na avaliação de novos métodos diagnósticos (KRITSKI et al, 1997). O diagnóstico diferencial entre a tuberculose e as doenças causadas pela micobactérias não tuberculosas é de grande importância pelo fato das duas doenças apresentarem diferenças fundamentais em sua epidemiologia, prognóstico e tratamento (ANDRADE, 1986).

1.4.3 Métodos Moleculares

Os avanços da genética molecular têm causado grande impacto na pesquisa médica. A descoberta das endonucleases de restrição, juntamente com os procedimentos de ligação e transformação do ácido desoxirribonucléico (DNA), possibilitou clonar e propagar sequências gênicas de quaisquer organismos em laboratórios. A técnica de PCR tem sua importância baseada na habilidade de replicar o DNA *in vitro* sem proliferação biológica do organismo portador de tal genoma. É possível amplificar sequências específicas de DNA mais de um milhão de vezes em poucas horas (KRITSKI et al, 1997).

1.4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

1.4.3.1.1 PCR convencional

A PCR baseia-se em ciclos que se repetem na forma de três etapas que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação, em um mesmo tubo, na presença de reagentes termoestáveis, e seqüências específicas de DNA a serem amplificadas. Os reagentes são: (1) dois pequenos iniciadores (primers), sintetizados para serem complementares às seqüências conhecidas do DNA alvo, (2) grande quantidade dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e (3) a enzima termoestável Taq DNA-polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* e tampão (EISENSTEIN, 1990). A PCR é um sistema que envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92/95°C, para quebrar as ligações tipo ponte de hidrogênio que mantêm as fitas unidas. Esta etapa expõe a fita de DNA, denominada “template” ou molde, à qual se anelará outra fita de DNA que contenha seqüência complementar a ela (iniciador). Esta técnica não exige que o DNA esteja puro, podendo ser detectado em misturas de DNAs ou deste com outras substâncias. No entanto, há maior sensibilidade da detecção em amostra contendo somente DNA purificado (EISENSTEIN, 1990; SCHEINERT et al., 2005). Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35/60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência dos iniciadores utilizados, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Os dois iniciadores não podem anelar-se um ao outro e seus sítios de anelamento devem ser suficientemente distantes um do outro, para permitir a síntese subsequente de novo produto (EISENSTEIN, 1990). Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão no sentido 5’ → 3’ (TAYLOR, 1993) a uma velocidade de cerca de 24 nucleotídeos por segundo (SCHEINERT et al., 2003). Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. À medida que os ciclos vão se repetindo, os iniciadores são consumidos e o número de novas fitas de DNA aumentam (EISENSTEIN, 1990). Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo aumenta exponencialmente a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo. Esta escala de amplificação permite, portanto,

iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA especificamente amplificado, resultando em moléculas de DNA

com sequência homóloga ao DNA que serviu de origem (TAYLOR, 1993).

1.4.3.1.2 PCR Multiplex

Nessa abordagem, são amplificados dois ou mais segmentos diferentes de DNA em uma única reação, utilizando-se para isso mais de um conjunto de pares de primers. Essa técnica permite a co-amplificação de mais de um segmento do genoma. Isso garante praticamente 100% de especificidade para a reação, no caso da identificação de microorganismos, diminuindo os riscos de falso-positivos. Também, usualmente, são incluídos na reação multiplex, iniciadores para controle interno da reação de amplificação. A inclusão do controle interno de amplificação visa à eliminação dos falso-negativos que ocorrem devido à presença de inibidores da reação de amplificação e permite, assim, uma análise de materiais como urina, líquido, líquido amniótico e efusões, onde a presença de inibidores da reação de amplificação tem sido descrita com frequência. Por permitir a amplificação simultânea de múltiplas regiões alvo a PCR multiplex vem sendo bastante útil na detecção da deleção de exon em desordens ligadas ao cromossomo X, tais como a distrofia muscular de Duchenne (CHAMBERLEIN et al., 1988) e síndrome de Lesch-Nyhan (GIBBS et al., 1990).

1.4.3.1.3 Nested-PCR

Para aumentar a sensibilidade de detecção, a técnica de PCR tem sofrido algumas adaptações, como por exemplo, a dupla amplificação (Nested-PCR). Nesta modalidade de PCR o ensaio se realiza em duas etapas consecutivas (duas PCRs simples). Na primeira etapa, uma sequência maior de DNA alvo é amplificada com um par de iniciadores externos. Uma alíquota, do amplicon assim obtido, é então submetida à segunda etapa, para amplificação de uma sequência interna do DNA alvo, usando-se um novo par de iniciadores (internos em relação à posição de anelamento do primeiro par utilizado). Assim, ao final desta última etapa tem-se amplificada a sequência alvo interna, que pode ou não se sobrepor a uma das terminações finais da sequência alvo maior (PIGNON et al. 1990). É precisamente esta

segunda etapa de amplificação com iniciadores internos, que confere a nested PCR especificidade e sensibilidade superiores às aquelas obtidas em PCR simples. Sua grande sensibilidade inclusive torna a nested PCR altamente recomendada para a detecção de alvos com baixo número de cópias (por exemplo, em amostras clínicas, de solo, de água e alimentos) (DUPIN et al. 2002). A necessidade de abertura do tubo de reação para a transferência dos amplicons, que serve de molde para a segunda etapa de amplificação, aumenta o risco de contaminação e o aparecimento de resultados falso positivos diminuindo a confiabilidade do método.

1.4.3.1.4 Nested PCR em único tubo (STNPCR)

A implementação de duas reações de amplificação em um único tubo (STNPCR) reduz consideravelmente o risco de contaminação (LLOP et al., 2000; MATHIS et al., 1997; ABATH et al., 2002). Há basicamente duas abordagens básicas utilizadas no desenvolvimento da nested PCR em único tubo. Elas envolvem uso de iniciadores internos e externos com distintas temperaturas de anelamento (esta abordagem limita bastante as seqüências que poderiam vir a servir de alvo para amplificação, como também possibilita o aumento do aparecimento de bandas inespecíficas), e a separação física dos reagentes necessários à segunda etapa de amplificação. Como exemplo da separação física pode ser citado o recurso do tip de pipeta modificado para conter e isolar temporariamente os reagentes (da segunda etapa) do conteúdo restante do tubo de reação. Também se tem utilizado resinas ou componentes estranhos à reação para seqüestrar os componentes da segunda reação. No entanto, isto pode interferir na reação enzimática (TAO et al., 2004).

O diagnóstico laboratorial de rotina através da PCR pode produzir resultados falso-positivos quando a sequência alvo não está uniformemente presente em todos os isolados clínicos. Apesar do desenvolvimento de sondas ter melhorado muito a identificação de micobactérias, em particular o complexo *M. tuberculosis* (MTC), os sistemas comercialmente disponíveis AccuProbe e DNA probe system (Gen-Probe, San Diego, Calif., USA) além de ser caros, oferecem um limitado número de sondas específicas e os isolados clínicos são identificados sobretudo como sendo MTC ou MNT (MOKADDAS & AHMAD, 2007).

Na última década, avanços dos métodos diagnósticos têm facilitado a identificação rápida e específica de várias espécies de micobactérias através de recursos moleculares.

Sondas de ácidos nucleicos, PCR espécie-específica, hibridização e a sequência 16S do RNAr tem sido consideradas para aplicações em laboratórios clínicos (YAM et al 2006), sendo esta ultima sequência, utilizada durante vários anos, e ainda é, o principal alvo para estudos de taxonomia molecular (TORTOLI, 2003; MOHAMED, et al, 2009).

Os ensaios de sondas de hibridização reversa (INNO-LiPA Mycobacteria e Genotype Mycobacteria) possuem alto custo e seus padrões complexos tornam difíceis sua implementação nos laboratórios de diagnóstico de rotina. O sequenciamento dos genes alvos de micobactérias como o 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65*, *secA* e a região espaçadora 16S-23S rRNA tem o potencial de identificação espécie-específica de quase todas as *Mycobacterium spp.* Contudo, o sequenciamento de todas as culturas isoladas em um laboratório de diagnóstico clínico se torna inviável pelo seu alto custo, particularmente em países em desenvolvimento. Sendo a TB a infecção por micobactéria mais comum, faz-se necessário o desenvolvimento de um método simples, econômico e confiável que possa discriminar o MTC das MNT (MOKADDAS & AHMAD, 2007).

1.4.3.2 Regiões espaçadoras 16S-23S rRNA

As regiões espaçadoras 16S-23S rRNA são utilizadas para a identificação e tipagem de um grande número de espécies de bactérias, incluindo espécies de micobactérias (GÜRTLER et al, 2006).

Existe, até o momento, dois sistemas comerciais utilizados na identificação de *Mycobacterium spp.* os quais se baseiam na hibridização de sondas, o INNO-LiPA Mycobacterium system (Immunogenetics, Ghent, Belgium), onde o alvo é a região espaçadora (ITS) do gene 16S-23S rRNA que identifica 16 espécies de micobactérias, e o GenoType Mycobacterium CM/AS System (Hain Life Science, Nehren, Germany) cujo alvo é o gene 23S rRNA que identifica 13 espécies (XIONG et al, 2006).

Em adição as áreas altamente conservadas que são estudadas nos relacionamentos entre linhagens diferentes, a sequência 16S contém mais regiões variáveis utilizadas na diferenciação de gênero e espécie. Esta diferenciação é realizada através do uso de sondas que foram geradas utilizando sequências conservadas da região 16S como *primers* universais para a amplificação da PCR de determinadas regiões variáveis do 16S (JENSEN et al, 1993). O gene 16S rRNA (~1550pb) é amplamente aceito e utilizado na identificação de bactérias, que

é universal e apresenta alto grau de conservação devido a sua importância como um componente funcional da célula, além do que é o mais indicado na identificação de micobactérias por conter tanto regiões conservadas como regiões altamente variáveis (STOHR et. al, 2005).

As regiões espaçadoras que separam os genes codificados pelo 23S, 16S e 5S caracterizam-se por um alto grau de variação de sequência e tamanho tanto no nível de gênero quanto de espécie. Esta diversidade deve-se, principalmente, a variação no número e no tipo de sequência do RNA_t encontrada no interior das regiões espaçadoras, sendo exploradas em estudos discriminatórios (ABED et al 1995).

Devido o aumento da incidência da infecção por MNT, é possível que os métodos que identificam apenas o *M. tuberculosis* falhem em detectar as MNTs. Assim, métodos que possam detectar e identificar simultaneamente *M. tuberculosis* e as MNTs seriam muito úteis no diagnóstico precoce e no tratamento adequado (KIM et al, 2006).

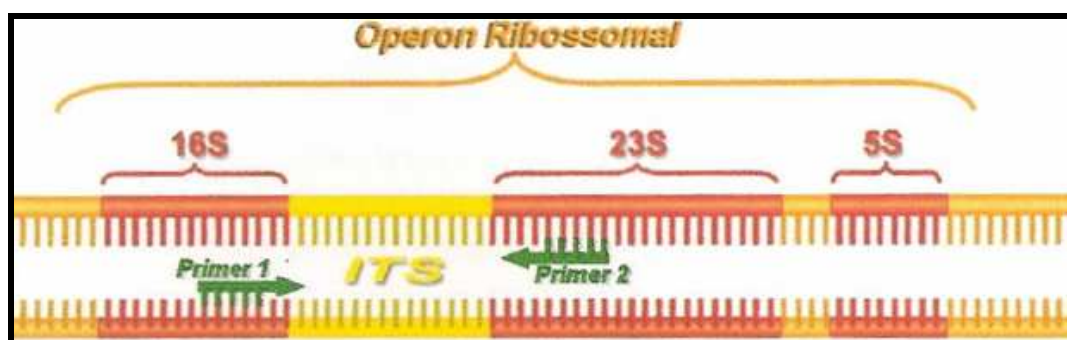


Figura 3: Regiões espaçadoras 16S-23S rDNA

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as cepas de *Mycobacterium* spp. através da técnica de ITS-PCR utilizando como alvo a região espaçadora 16S-23S rDNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar as condições da ITS-PCR utilizando a região espaçadora do alvo 16S-23S rDNA;

Determinar o perfil molecular das espécies de micobactérias produzidos pela ITS-PCR;

Comparar o sistema de ITS-PCR utilizando DNA genômico de *Mycobacterium* spp., com os métodos convencionais de diagnóstico e através da técnica de PRA-*hsp65*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Informações do estudo: foi realizado um estudo observacional analítico e prospectivo, desenvolvido no Laboratório de Imunoepidemiologia (Departamento de Imunologia) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). No estudo foram utilizadas 30 cepas de micobactérias isoladas de meio de cultura específico, provenientes de amostras clínicas coletadas de pacientes com suspeita de tuberculose doença ou infecção por outras micobactérias, encaminhados de hospitais públicos do estado de Pernambuco, para confirmação diagnóstica através dos exames convencionais de baciloscopia e cultura. Para detecção laboratorial das micobactérias foi utilizado o critério estabelecido pelo Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, 2002.

3.2 Casuística: foram selecionadas amostras de pacientes de ambos os sexos, sem restrição de idade, provenientes de ambulatório e enfermaria do Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), do Hospital Barão de Lucena (HBL), do Hospital Geral Otávio de Freitas (HGOF) e do Instituto Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) do estado de Pernambuco, que depois de semeadas em meio de cultura de Lowenstein-Jansen apresentaram crescimento de BAAR .

3.3 Considerações Éticas: todos os participantes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para coleta das amostras biológicas necessárias. No caso do paciente ser menor de idade, seu responsável deu consentimento por escrito através do termo de consentimento livre e esclarecido equivalente. Este projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEP-CPqAM/FIOCRUZ), apresentada no Anexo I, e teve a anuência dos hospitais supracitados participantes da pesquisa por meio de carta oficial e assinada pelo responsável no serviço referente.

3.4 Critérios de inclusão: pacientes com suspeita de tuberculose, encaminhados pelo médico acompanhante para esclarecimento diagnóstico, com baciloscopia positiva ou negativa, história de contato com adulto bacilífero (valorizado sobretudo nos menores de 15 anos) ou com recidiva da doença.

3.5 Critérios de exclusão: foram excluídos os pacientes que haviam iniciado tratamento antes da coleta das amostras.

3.6 Critérios de perda: pacientes que faleceram durante a pesquisa antes da definição diagnóstica; 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 clínico-epidemiológica da pesquisa preenchida de maneira incompleta; cujas amostras coletadas foram contaminadas ou insuficientes.

3.7 Isolados micobacterianos: foram incluídas cepas de referência de *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas: *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. intracelulari*, *M. fortuitum*, isoladas através de cultura em meio Lowestein-Jensen e identificadas utilizando testes fenotípicos e bioquímicos. As micobactérias não tuberculosas foram identificadas utilizando a técnica molecular de PRA-*hsp65*, através da colaboração com o Laboratório de Micobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro, seguindo o protocolo estabelecido por Telenti et al, 1993 e Devallois et al, 1997.

3.8 Métodos laboratoriais convencionais de diagnóstico de micobacterioses:

Todas as 30 amostras clínicas provenientes dos pacientes selecionados para a pesquisa foram submetidas aos seguintes testes:

3.8.1 Baciloscopia: Esfregaços de material crescido em meio de cultura, proveniente de amostras clínicas foram fixados na chama e corados pelo método de Ziehl Neelsen (BRASIL, 2002).

3.8.2 Descontaminação: após a coleta, as amostras clínicas foram descontaminadas pelo Método de Petroff: Adicionar hidróxido de sódio a 4% contendo vermelho de fenol a 0,4% em volume igual ao do espécime contido no tubo de centrífuga com capacidade para 50mL, agitar 10 min. Em agitados, em seguida neutralizar o material gotejando a solução de Ac. sulfúrico a 5% até o aparecimento da cor âmbar. Centrifugar a 3000 G por 20 min. Após a centrifugação despreza o sobrenadante e ressuspende o sedimento com 2mL de água Milli-Q, podendo, assim, ser semeada em meio de cultura (ANDRADE, 1980; BARRETO, 1994).

3.8.3 Cultura de bacilos e testes de identificação: após descontaminação, as amostras clínicas foram semeadas em meio Lowenstein-Jensen. As culturas foram incubadas a 37°C por um período de 60 dias. A identificação dos bacilos micobacterianos foi realizada observando a velocidade de crescimento da(s) colônia(s) e pelas provas bioquímicas (niacina, catalase, PNB e TCH) (BRASIL, 2005).

Para comparação dos testes considerou-se como padrão ouro as características fenotípicas e as provas bioquímicas realizadas a partir das culturas de micobacterias.

3.9 Métodos Moleculares:

3.9.1 Extração e purificação de DNA genômico de micobactérias: Para a obtenção do DNA genômico foram retiradas duas alças com colônias de micobactérias do meio de cultura e colocadas em tubo tipo eppendorf de 1,5mL com 100µL de água Milli-Q, posteriormente aquecida em bloco seco à 100°C por 10 min e em seguida congelada a -75°C por 20min. Após descongelamento foi adicionado 400µL de solução de lise (NaCl 100mM; TrisCl 10mM, pH 8; SDS 0,5%), agitado em vortex por 1 min e posteriormente adicionou-se 6µL de proteinase K e incubada a 65°C por 30 min. Após a lise celular a etapa da extração consistiu na utilização do método de Fenol/Cloroformio, utilizando primeiro 500µL dos Fenol e centrifuga a 5000rpm por 3 min, em seguida adiciona-se 500µL de Fenol/Cloroformio (1:1) e centrifuga a 5000rpm por 3 min, posteriormente adiciona-se 500µL de Clorofórmio e centrifuga a 5000rpm por 3 min. Em seguida, o sobrenadante é transferido para novos tubos e adiciona-se 200µL de isopropanol absoluto gelado e mantido no congelador por no mínimo 4 horas. Após outra centrifugação, agora a 5000rpm por 10 min., o sobrenadante foi completamente desprezado e o pellet seco a temperatura ambiente. Ressuspender em 50µL de água Milli-Q e estocado a -20°C para posterior quantificação e usado nas reações de PCR (SAMBROOK et al,1989).

3.9.2 Quantificação do DNA extraído de micobactérias: As amostras extraídas foram quantificadas utilizando o Espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech). A diluição para a quantificação do DNA foi feita a partir do volume final de 70µL, sendo 10µL do DNA extraído e 60µL de água Milli-Q.

3.9.3 Reação de amplificação por PCR: foram realizadas as técnicas de ITS-PCR segundo Abed et al, 1995.

3.9.3.1 Reação de ITS-PCR: foi otimizada utilizando os iniciadores G1 e L1 em um total de 25 ciclos, com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55°C por 7 min e extensão a 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C de 10 min. A mistura da reação de amplificação foi composta de KCl 50mM, Tris – HCl 10 mM, pH 8,3, 1,5 mM de MgCl₂, 2 mM de dNTP (Invitrogen), 75 pmol de cada primer e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase, em um volume final de 50 µl. As temperaturas ideais de anelamento foram definidas através de experimentos com gradientes de temperatura. Nos experimentos de otimização foi utilizada a concentração de 25ng de DNA de *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. intracelulari*, *M. fortuitum*, *M. tuberculosis*.

Tabela 1: Apresentação dos oligonucleotídeos utilizados na ITS-PCR

NOME	SEQUÊNCIA	TIPO DE PCR	REFERÊNCIA
L1	5' –CAAGGCATCCACCGT– 3'	SIMPLES	Abed et al, 1995
G1	5' – AAGTCGTAACAAGG – 3'	SIMPLES	Abed et al, 1995

3.9.4 Eletroforese: os amplicons produzidos na reação de ITS-PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio, visualizados 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.

3.10 Análise estatística: foi realizada uma análise estatística descritiva da distribuição de frequência das cepas micobactérias isoladas em meio de cultura a partir de amostras clínicas de origem pulmonar e extrapulmonar obtidas de pacientes com suspeita de tuberculose doença ou infecção por micobactérias, comparando os resultados dos diferentes testes com o padrão ouro e entre si.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente a tuberculose (TB) representa a oitava causa de morte, a nona causa de incapacidade nos países pobres e emergentes e a sétima em morte prematura, no mundo. Cerca de 1,86 bilhões de pessoas apresentam infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis*, sendo a principal espécie do complexo *M. tuberculosis* que incluem ainda: *Mycobacterium. africanum*, *Mycobacterium. bovis*, *Mycobacterium bovis-BCG*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipetti* (OMS, 2008; POROCA et al 2009). Destes, 10% dos imunocompetentes e 50% dos imunocomprometidos irão desenvolver TB em algum momento da vida. Os principais fatores de risco para a tuberculose são: pobreza, desnutrição, infecção pelo HIV, tabagismo, desigualdade social em países pobres e emergentes, diabetes *mellitus*, e poluição. (ATS, 1997; CUNHA & NEDER, 2009).

Ao contrário das espécies do complexo *M. tuberculosis*, as micobactérias não tuberculosas (MNT) encontram-se dispersas na natureza e 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 nos laboratórios de micobactérias (TORTOLI, 2003, ATSD, 2007). O diagnóstico de doença causada por MNT exige muita cautela, pois o seu isolamento de espécimes clínicos não estéreis do organismo pode significar colonização transitória ou contaminação. Por isso, a correlação clínico-laboratorial é de fundamental importância para o estabelecimento do diagnóstico preciso da doença, bem como na determinação da estratégia terapêutica (ATSD, 2007).

A identificação das micobactérias por métodos laboratoriais tradicionais é baseada em características fenotípicas e bioquímicas e os resultados são obtidos de duas a quatro semanas após o seu isolamento em culturas primárias (KHAN et al, 2005). Na última década os avanços dos métodos diagnósticos têm facilitado a identificação rápida e específica de várias espécies de micobactérias através de ferramentas moleculares (YAM et al, 2006). Estas têm proporcionado um melhor entendimento a respeito de colonização, infecção, e transmissão de organismos, e ultimamente tem contribuído na redução da morbidade e mortalidade de importantes doenças (PATEL & GRAHAM, 2007).

No presente estudo foi utilizada como alvo a região espaçadora localizada entre as subunidades 16S e 23S do rDNA, que segundo a literatura são responsáveis por apresentar variabilidade genética, e promover eficiente identificação de espécies, sendo assim

considerado um alvo capaz de diferenciar espécies intimamente relacionadas, podendo ser utilizada para distinguir as micobactérias de relevância clínica (KHAN et al, 2005; MOHAMED et al, 2009)

Estas regiões são utilizados para diferenciar diversos tipos de bactérias. A amplificação por PCR das regiões espaçadoras a partir destas áreas conservadas do DNA produzem fragmentos, cujo tamanho e número, podem ser utilizados na identificação de uma ampla diversidade de bactérias (JENSEN et al, 1993).

Devido a não obtenção da reprodutibilidade do protocolo estabelecido por Abed et al (1995), no laboratório de imunoepidemiologia do CPqAM/FIOCRUZ, foi necessária a realização da etapa de otimização da técnica de ITS-PCR. Inicialmente, foi avaliada as concentrações dos oligonucleotídeos, com o objetivo de uma melhor amplificação dos produtos gerados, produzindo fragmentos de DNA mais bem definidos, utilizando as concentrações de 50pMol, 75pMol, 100pMol em cada reação onde a concentração de 75pmol dos oligonucleotídeos foi a que apresentou melhor performance, diferente das condições propostas por Abed et al (1995).

Além da concentração dos oligonucleotídeos, foi avaliada também a temperatura ideal de anelamento dos mesmos, realizada através de um gradiente de temperatura. O gradiente realizado variou entre 54.1°C e 59.2°C, tendo obtido as melhores amplificações nas temperaturas de 54.7°C e 55.3°C. Desta forma resolveu-se padronizar como temperatura ótima do teste a mesma proposta por Abed et al (1995), ou seja, de 55°C (vide figura 4).

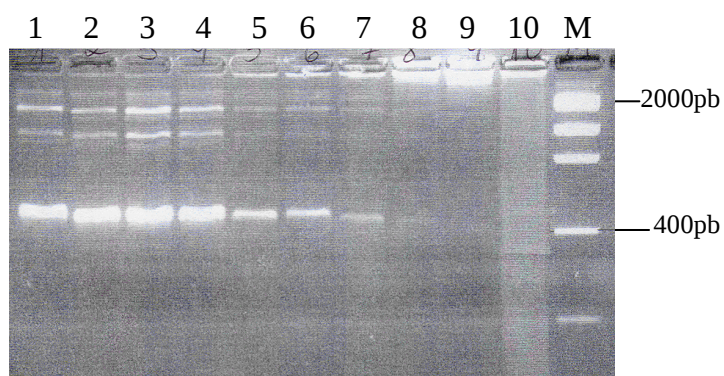


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose, demonstrando a otimização através da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos com a técnica de ITS-PCR, utilizando DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. Coluna 1 – 54.1°C; Coluna 2 – 54.3°C; Coluna 3 – 54.7°C; Coluna 4 – 55.3°C; Coluna 5 – 56.1°C; Coluna 6 – 56.9°C; Coluna 7 – 57.7°C; Coluna 8 – 58°C; Coluna 9 – 59.2°C; Coluna 10 – Controle negativo; Coluna M – Marcador de peso molecular Low Mass Ladder.

No experimento realizado para determinar o perfil molecular de identificação produzida pela ITS-PCR, o padrão de bandejamento das cepas de referências de *Mycobacterium spp.* demonstrou que o DNA genômico de *M. avium* produziu bandas de 500pb e 700pb; o DNA de *M. smegmatis* produziu um fragmento intenso de 650pb, dois menos intensos de 900pb, 1500pb e um fragmento maior que 2000pb; o DNA de *M. intracelulari* produziu amplicons de 600pb, 850pb e 1200pb; o DNA de *M. fortuitum* produziu duas bandas bem definidas de 600pb e 950pb; o DNA de *M. tuberculosis* produziu bandas de 400pb, 1350pb e 2000pb e duas menos intensas de 680pb e 780pb. A figura 5 apresenta a análise em gel de agarose demonstrando o padrão de bandejamento produzido pela ITS-PCR. Os resultados do presente estudo apresentaram um padrão de bandejamento diferente do que foi encontrado por Abed et al (1995), provavelmente devido a procedência das cepas utilizadas em seu estudo, onde as mesmas foram provenientes dos continentes Europeu, Asiático e Africano (GAGNEUX & SMALL, 2007; LOPEZ et al, 2003).

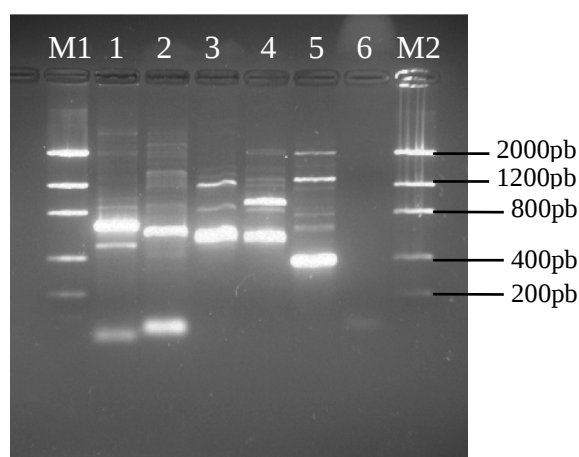


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose, demonstrando o padrão de bandejamento produzido pela ITS-PCR em cepas de *Mycobacterium spp.* Coluna 1: DNA de *M. avium* com bandas de 500pb e 700pb; Coluna 2: DNA de *M. smegmatis* com fragmentos de 650pb, 900pb, 1500pb e 2000pb; Coluna 3: DNA de *M. intracelulari* com amplicons de 600pb, 850pb e 1200pb; Coluna 4: DNA de *M. fortuitum* com bandas de 600pb e 950pb; Coluna 5: DNA de *M. tuberculosis* com fragmentos de 400pb, 1350pb e 2000pb; Coluna 6: controle negativo da reação; Colunas M1 e M2: Marcador de Peso Molecular Low Mass Ladder (Invitrogen).

Katoch et al (2007) utilizando a região espaçadora 16S-23S conseguiu distinguir espécies e subespécies de micobacterias utilizando isolados clínicos de pacientes obtidos de um banco de amostras de várias regiões da Índia.

Quando a técnica de ITS-PCR foi avaliada com DNA genômico extraído de cepas de *Micobactérias* spp. obtidas de meio de cultura Lowestein-Jensen, isoladas de amostras clínicas de pacientes com suspeita de micobacteriose, observou-se diferentes padrões moleculares para o *M. tuberculosis* e as MNT's (Figura 6). Os DNAs obtidos através de extração das cepas de pacientes isoladas em meio Lowenstein-Jansen produziram padrões moleculares semelhantes aos obtidos pelas cepas de *Mycobacterium* spp. de referência. Isto nos permitiu comparar e avaliar a eficiência do teste com o método padrão ouro utilizado na identificação laboratorial de micobactérias (testes fenotípicos e bioquímicos), e também com a técnica molecular de PRA-*hsp65*. Com relação aos testes fenotípicos e bioquímicos eles apresentam algumas desvantagens como demora na obtenção do resultado final que leva de quatro a oito semanas para o crescimento das colônias de *Mycobacterium tuberculosis* e algumas semanas para as MNT's, podendo ainda apresentar resultados inconclusivos na presença de culturas com pouco crescimento ou mistas (UEKI et al, 2005).

Vale ressaltar que a ITS-PCR foi capaz de diferenciar as cepas de referência e as obtidas de amostras clínicas distinguindo-as em *M. tuberculosis* (MTB), *M. avium*, *M. intracelulari*, *M. smegmatis* e *M. fortuitum* em uma única reação de PCR, diferentemente do encontrado quando realizamos a técnica do PRA-*hsp65*, que além de uma reação de amplificação por PCR, possui uma etapa que realiza digestão com enzimas restrição específica, o que aumenta o tempo e o custo para o diagnóstico. Além disso, não apresenta a capacidade de diferenciar as espécies do complexo *M. tuberculosis*, sendo indicada apenas para a identificação das espécies de MNT (TELENTI et al, 1993 e DEVALLOIS et al, 1997).

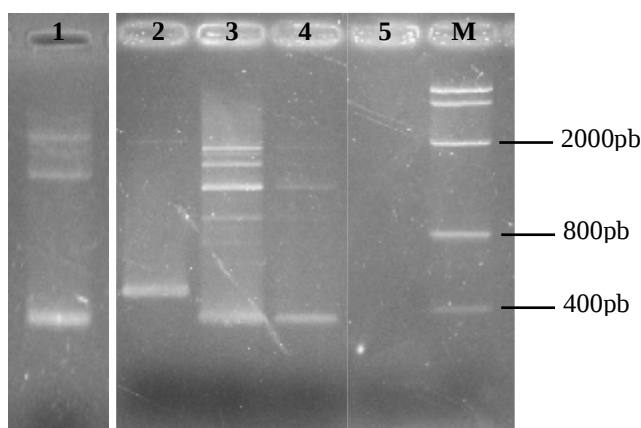


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose demonstrando o perfil molecular de cepas de *Mycobacterium* spp. obtidas de meio de cultura Lowestein-Jensen, isolados de amostras clínicas de pacientes com diagnóstico de micobacteriose, produzido pela ITS-PCR. Coluna 3: Micobacteria não tuberculosa; Colunas 1, 2, 4 e 5: *M. tuberculosis*; Coluna 5: controle negativo da reação; Coluna M: Marcador de Peso Molecular E-Gel® High Range DNA Ladder (invitrogen)

Quando as técnicas de ITS-PCR e o PRA-*hsp65* foram comparadas com o padrão ouro (testes fenotípicos e bioquímicos), foi observado que das 21 cepas identificadas como sendo do complexo *M. tuberculosis* ou micobacterias não tuberculosas, a ITS-PCR apresentou bom resultado de concordância em 85,71% (n=18). Quando comparamos o PRA-*hsp65* com o padrão ouro na identificação de MNT, obtivemos excelentes resultados apresentando 100% (n=20) de concordância (Tabela 2).

Pelo fato de não encontrarmos na literatura trabalhos que comparem os resultados obtidos pela ITS-PCR com outros testes moleculares, ou mesmo, com o diagnóstico laboratorial de rotina, os testes fenotípicos e bioquímicos, não foi possível discutir os nossos resultados com embasamento na literatura, visto que, em geral, os trabalhos abordam apenas padrões obtidos para a identificação mostrando a viabilidade da ferramenta molecular na diferenciação da micobactérias (KATOCH et al, 2007; STOUT et al, 2008; ABED et al, 1995).

Na literatura existem diferentes estudos publicados visando estabelecer critérios para o diagnóstico das infecções causadas por MNT, devido ao fato destas espécies colonizarem transitoriamente o homem. Embora haja variação nestes critérios, todos enfatizam a importância do isolamento repetido do agente causador da doença a partir de amostras biológicas não-estéreis ou obtidas de um cultivo puro de biópsia ou outros fluidos de sítios estéreis. Estes critérios podem ser aplicados a pacientes com sinais clínicos, radiológicos ou histopatológicos compatíveis com um quadro de infecção por micobactéria (UEKI et al., 2005, ATSD, 2007). O diagnóstico diferencial entre o MTB e as MNT's é de grande importância visto que ambas apresentam fundamental diferença em sua epidemiologia, prognóstico e tratamento (Andrade, 1986).

Tabela 2: Desempenho da técnica de ITS-PCR e PRA-*hsp65*.

	ITS-PCR	PRA- <i>hsp65</i>
TESTES	18 (85,71%)	20 (100%)
FENOTÍPICOS E BIOQUÍMICOS	21	20

Neste estudo foram realizadas as análises clínicas e demográficas dos 20 pacientes com diagnóstico clínico e microbiológico de micobacteriose, onde os isolados clínicos foram confirmados através de cultura com teste fenotípico e bioquímico. Neste grupo de pacientes com a forma ativa da doença, a maioria foi proveniente de enfermaria, provavelmente pela rotina clínica dos serviço de referencias em internar o paciente com baciloscopia positiva para iniciar o tratamento específico. A média de idade dos pacientes foi de 38,5, estando dentro da média nacional, entre 20 e 49 anos (SANTO et al, 2009). A maioria foi do sexo masculino, 65% (n=13), que se justifica por ser o grupo mais exposto à doença (SANTO et al, 2009). Quanto à forma da tuberculose, a pulmonar prevaleceu, com 80% (n=16) dos casos diagnosticados e a maioria das amostras clínicas 75% (n=15) foram de natureza pulmonares, tais como escarro e lavado bronco alveolar (Tabela 3). O estudo demonstrou ainda um caso clínico com diagnóstico final de TB pulmonar, realizado pelo médico do serviço de saúde e iniciado o tratamento específico, porém foi identificado como cepa de MNT, através do exame padrão ouro, pela técnica de ITS-PCR e pelo PRA-*hsp65*. Provavelmente este paciente foi diagnosticado através do exame de baciloscopia (pesquisa de BAAR), que não apresentando a capacidade de distinção e identificação micobacteriana (MS, 2008; MAWAK et al, 2006). A baciloscopia é uma técnica rápida e de baixo custo, utilizado no diagnóstico da tuberculose pulmonar, porém apresenta importantes desvantagens, como a não identificação da espécie micobacteriana infectante no paciente. A literatura ressalta que nos últimos 20 anos, as infecções causadas por MNT's tem se tornado relativamente mais freqüente, relacionada ou não com quadros de imunodepressão. Sendo assim, o diagnóstico correto através da identificação adequada das espécies micobacterianas torna-se de fundamental importância, principalmente nos casos de co-infecção com o vírus HIV e demais doenças que causam imunodepressão (GÓMEZ, 2009).

Contudo, para o diagnóstico laboratorial de doenças causadas por MNT é necessário o isolamento micobacteriano em uma amostra clínica estéril. Em relação as amostras clínicas não estéreis é necessário dois isolamentos e uma baciloscopia positiva para confirmação do diagnóstico bacteriológico, pois o isolamento em uma única amostra clínica de sítios não-estéreis, como escarro, urina ou fezes, geralmente não tem significado clínico, podendo ser considerada contaminação transitória (ATSD, 2007; UEKI et al, 2005).

Tabela 3: Características clínicas e demográficas dos 20 pacientes estudados

	TB pulmonar	TB extrapulmonar	Total
Procedência			
Ambulatório	6 (30%)	1 (5%)	7 (35%)
Enfermaria	10 (50%)	3 (15%)	13 (65%)
Sexo			
Masculino	12 (60%)	1 (5%)	13 (65%)
Feminino	4 (20%)	3 (15%)	7 (35%)
Total	16 (80%)	4 (20%)	

Devido as limitações apresentadas pelas técnicas utilizadas como, por exemplo, a não restrição na técnica de PRA-*hsp65*, o crescimento insuficiente de colônias nos meios de cultura, provenientes de amostras paucibacilares, para realizar os testes bioquímicos apresentando muitas vezes resultados inconclusivos e a falta do diagnóstico final dado pelo médico assistente do serviço de saúde fez com que apresentássemos um número reduzido de amostras.

Novas abordagens diagnósticas da tuberculose vêm sendo desenvolvidas devido às limitações dos métodos micobacteriológicos convencionais utilizados de rotina. Avanços nas técnicas de Biologia Molecular 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 (CAMPOS, 2006). A detecção rápida e precisa do *M. tuberculosis* tem um forte impacto na precocidade da confirmação diagnóstica e no tratamento adequado da doença, sendo considerada uma das principais estratégias de intervenção, interrompendo o elo de transmissão e evitando a disseminação da doença (ROSSETTI et al, 2006). A amplificação do DNA de micobactérias através da PCR tem demonstrado ser uma ferramenta útil para o diagnóstico rápido da tuberculose, sobretudo em crianças e indivíduos paucibacilares (KOX et al., 1994; PORTILLO-GOMÈZ et al., 2000).

Estudos são necessários com um maior número de amostras obtidas de grupos bem caracterizados clinicamente para se conhecer o real desempenho da técnica de ITS-PCR na diferenciação das micobacterioses em pacientes provenientes de regiões com alta endemicidade da doença.

5. CONCLUSÃO

- O sistema de ITS-PCR foi capaz de diferenciar as cepas de referência de *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracelulari*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis* isoladas em meio de cultura;
- A ITS-PCR parece ser uma ferramenta útil para auxiliar na diferenciação das infecções causadas por TB e por MNT em regiões com alta endemicidade da doença de países em desenvolvimento;
- A ITS-PCR pode ser utilizada como ferramenta molecular complementar no diagnóstico diferencial quando os testes convencionais apresentam-se inconclusivos.

6. BIBLIOGRAFIA

1. ABATH, F. G. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. BioTechniques, Natick, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, 2002.
2. ABED, Y., et al. Efficient discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by 16S-23S spacer region-based Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. Journal of Clinical Microbiology, Washington, p. 1418-1420, 1995.
3. ABED, Y.; Bollet, C.; Micco, P. Demonstration of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity by amplification of the 16S-23S spacer region. Journal of Clinical Microbiology, Washington – v. 43, p. 156-158, 1995 Short Report.
4. ABED, Y.; Bollet, C.; Micco, P. Identification and strain differentiation of *Mycobacterium* species on the basis of DNA 16S-23S spacer region polymorphism. Research in Microbiology, Paris, v. 146, p. 405-413, 1995.
5. AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS). Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, New York, v. 156, p.1-25, 1997
6. AMERICAN THORACIC SOCIETY DOCUMENTS (ATSD). Na 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.
7. ANDRADE L. Micobactérias atípicas – micobacterioses. Etiopatogenia, diagnóstico, tratamento e epidemiologia. Jornal de Pneumologia, Brasília, v. 12(4), p. 241-248, 1986.
8. ANDRADE, L. M., et al. Manual de bacteriologia da tuberculose. 1ª edição. Ministério da Saúde, 1980.
9. ANTHONY R. M., et al. Acquisition of rifabutin resistance by a rifampicin resistant mutant of *Mycobacterium tuberculosis* involves an unusual spectrum of mutations and elevated frequency. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, London v. 4, p. 9, 2005.
10. ARAYA P. R., VELASCO M. P., FERNÁNDEZ J. O. Identificación rápida de micobacterias no tuberculosas mediante análisis de patrones de restricción. Revista Médica de Chile, Santiago, v. 134, p. 868-873, 2006.
11. 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.
12. BARRETO, A. M. W., CAMPOS, C. E. D., MARTINS, F. M. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2ª edição, Ministério da Saúde. 1994.
13. BLOOM, B. R. & MURRAY, C. J. L. Tuberculosis: Commentary on a reemerging Killer. Science, Washington, v. 257, p. 1055-1064, 1992

14. BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde; Centro de Referência Prof. Hélio Fraga; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5ª ed - Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF /SBPT, 2002.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. SVS (Secretaria de Vigilância Em Saúde) – SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Indicadores de Morbidade e Fatores de Risco. Taxa de Incidência de Tuberculose. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2007/d0202.def>>. Acesso em: 20 de março de 2009.
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância em saúde. Tópicos de saúde. Tuberculose. Situação Atual da Doença. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=23499>. Acesso em 19 de fevereiro de 2007;
17. BRASIL. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”.Divisão de Controle da Tuberculose CVE-SES/SP. A doença milenar que acompanha a história da humanidade, São Paulo, SP. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2010;
18. BRUNELLO F., et al. Identification of 54 Mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. Journal of clinical microbiology, Aug, 2001, p 2799-2806;
19. CAMPOS H. S. Diagnóstico da tuberculose. Pulmão RJ, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 92-99, 2006.
20. CHAMBERLAIN, J. S. et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 16, n. 23, p. 11141–11156, 1988.
21. CHEMLAL, K. C. & PORTAELS, F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. Current opinion in infectious diseases, London v. 16, p. 77-63, 2003.
22. CHIMARA E. et al. Realible identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme análise (PRA)- hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. BMC Microbiology, London v. 20, p. 8:48, 2008.
23. CUNHA T. M. & NEDER J. A. Repercussões estruturais e funcionais das seqüelas de Tuberculose tóraco-pulmonar em pacientes imunocompetentes. Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia, v. 22, n. 5, p. 11 – 17, 2009.
24. 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, p. 2969-2973, 1997.

-
25. DODIUK-GAD, R., et al. Nontuberculous mycobacteria infections of the skin: A retrospective study of 25 cases. Journal of the American Academy of Dermatology, St. Louis,; v. 57, p. 413-420, 2007.
 26. DRMANAC, R., et al. Reliable hybridization of oligonucleotides as short as six oligonucleotides. DNA and Cell Biology, New York, v. 9, p. 527-534, 1990;
 27. DUCATI R. G., et al. The resumption of consumption – A review on tuberculosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.
 28. DUPIN, N. et al. HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV- infected patients with lipodystrophy. AIDS, London, v. 16, n. 18, p. 2419-2424, 2002.
 29. EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. The New England Journal of Medicine, Boston, v. 322, n. 3, p. 178-183, 1990.
 30. ESPINAL M. A. The global situation of MDR-TB. Tuberculosis (Edinburgh), Edinburgh, v. 83, p. 44-51, 2003.
 31. ESTEBAN, J., et al. Infecciones por micobacterias atípicas. Medicine, La Rioja, v. 9, n. 56, p. 3632-3638, 2006.
 32. 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. 725-729, 2002.
 33. GAGNEUX, S. & SMALL, P. M. Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. Lancet Infectious Diseases, New York, v. 7, p. 328-337, 2007.
 34. GARCÍA- GARCÍA, J. M., PALACIOS GUTIÉRREZ, J. J., SÁNCHEZ ANTUÑA, A. A. Infecciones respiratorias por micobacterias ambientales. Archivos de bronconeumología, Barcelona, v. 41, n. 4, p. 206-219, 2005.
 35. GIBBS, R. A. et al. Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesch–Nyhan families. Genomics, San Diego, v. 7, n. 2, p. 235–244, 1990.
 36. GÓMEZ NA. Micobacterias no tuberculosas: ¿una infección emergente?. Anales de Pediatría, Barcelona, v. 71, p. 185-188, 2009.
 37. GONÇALVES, H.: ‘A Tuberculose ao longo dos tempos’. História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro, v. VII, n. 2, p. 303-325, 2000.

-
38. GÜRTLER, V., et al. Direct identification of slow growing *Mycobacterium* species by analysis of the intergenic 16S-23S rDNA spacer region (ISR) using a GelCompar II database containing sequences based optimization for restriction fragment site polymorphisms (RFLPs) for 12 enzymes. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 64, p. 185-199, 2006.
39. GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – II Consenso Brasileiro de Tuberculose; Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasilia, v. 30, n. 1, 2004.
40. HAMES, B.D., & HIGGINS, S.J. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach. Nucleic Acids Abstracts, London, 1985;
41. HERRERA-LEÓN L, et al. Aplicación de métodos moleculares para La identificación de las espécies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Enfermedades Infecciosas y microbiología Clínica, Barcelona, v. 27, n. 9, p. 496-502, 2009.
42. HUARD R. C., et al. PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 41, n. 4, p. 1637–1650, 2003.
43. JENSEN, M. A., WEBSTER, J. A., STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 59, n. 4, p. 945-952, 1993.
44. KANDUMA E, MCHUGH T. D, GILLESPIE S. H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 94, p. 781-791, 2003.
45. KASER M., et al. Optimized method for preparation of DNA from pathogenic end environmental Mycobacteria. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.75, n. 2, p. 414-418, 2009.
46. KATOCH, V. M., et al. Rapid Identification of mycobacteria by gene amplification restriction analysis technique using 16S-23S ribosomal RNA internal transcribed spacer & flanking region. Indian Journal of Medical Research, New Delhi, v. 125, p. 155-162, 2007.
47. KHAN I. U. H.; SELVARAJU S. B.; YADAV J. S. Method for rapid identification and differentiation of the species of the *Mycobacterium chelonae* complex based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer PCR-restriction analysis. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 43, n. 9, p. 4466-4472, 2005.
48. KIM H., et al. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm 644bp Heat Shock Protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 62, p. 199-209, 2005.
49. KIM, H-J., et al. Differentiation of mycobacterial species by *hsp65* duplex PCR followed by duplex-PCR-based restriction analysis and direct sequencing. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 44, n. 11, p. 3855-3862, 2006.

-
50. KOX L.L.F., et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 32, p. 672-678, 1994.
51. KRITSKI, A. L., et al. Reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnostico de tuberculose. Jornal de Pneumologia, v. 23, n. 1, 1997.
52. LLOP, P. et al. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Applied And Environmental Microbiology, Washington, v. 66, n. 5, p. 2071-2078, 2000.
53. LÓPEZ, B. et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. Clinical and Experimental Immunology, London, v. 133, p. 30-37, 2003.
54. MAWAK, J. D., et al. Human Pulmonary Infection with Bovine and Environment (Atypical) *Mycobacteria* in Jos, Nigeria. Ghana Medical Journal, Accra, v. 40, n. 4; 2006.
55. MATHIS, A. et al. Simplified sample processing combined with a sensitive one-tube nested PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 35, n. 7, p. 1691-1695, 1997.
56. MOHAMED A. M.; ABOU EL-ELLA G. A.; NASR E. A. Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species from slaughtered pigs in Egypt. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, Columbia, v. 21, p. 48-52, 2009.
57. MOKADDAS, E. & AHMAD, S. Development and Evaluation of a Multiplex PCR for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members from Non-tuberculous *Mycobacteria*. Japanese Journal of Infectious Diseases, Tokyo, v. 60, p. 140-144, 2007.
58. National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes: approved standards. NCCLS document M24-A, 23 (18), 2005Replaces M24-T2, 20 (26).
59. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential. OMS, Report 2006.
60. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. World Report 2008. Global Tuberculosis Control. Surveillance and planning, finance., 2008.
61. PATEL, S. J. & GRAHAM, P. L. Use of molecular typing in infection control. Pediatric Infectious Disease Journal, Baltimore, v. 26, n. 6, 2007.
62. PIGNON, J. M. et al. Frequent detection of minimal residual disease by use of the polymerase chain reaction in long term survivors after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K., Baltimore, v. 4, n. 2, p. 83-86, 1990.

-
63. POROCA D R, et al. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 42, n. 6, 2009.
64. PORTILLO-GOMÈZ L., MORRIS S. L., PANDURO A. Rapid and efficient detection of extrapulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v. 4, n. 4, p. 361-370, 2000.
65. POURAHMAD F., et al. Comparative evaluation of Polymerase chain reaction – restriction enzyme analysis (PRA) and sequencing of heat shock protein 65 (*hsp65*) gene for identification of aquatic micobacteria. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 76 p. 128–135, 2009.
66. RODRIGUES, M. A. V., et al. Standardization of in-house polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* at the Reference Tropical Disease Hospital in the State of Goiás, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n. 4, p. 415-419, 2004.
67. ROSSETI, M. L. R. & SPERHACHE, R. D. in Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. Rosseti, M. L. R., Silva, C. M. D., Rodrigues, J. J. S. Editor Guanabara Koogan, 1ª edição, Rio de Janeiro, 2006;
68. ROZMAN, L. M., SANTO, A. H., ROZMAN, M. A. Resistência de *Mycobacterium tuberculosis* às drogas em pacientes HIV+ em cinco municípios da Baixada Santista, São Paulo, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, p. 1051-1059, 2007.
69. SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
70. SANTO, L. A. L. A., SANTOS, P. C. H. S., MOREIRA, M. E. Perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos pacientes com tuberculose em hospitais universitários da região do Vale do Paraíba, Boletim Epidemiológico, São Paulo, v. 6, n. 68, p. 14-21, 2009.
71. SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler®. Eppendorf North America, Apr. 8. 2003. Disponível em: <
http://www.eppendorfna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp> acesso em:
3 Nov. 2009.
72. SILVA C. F., et al. hsp65 PCR-Restricion enzyme análise (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.
73. 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, v. 40, n. 11, p. 4191-4196, 2002.

-
74. SMITH, K. C., et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. Pediatrics, Evanston, v. 97 n. 2, 1996.
 75. STÖHR, K., et al. Species-Specific identification of Mycobacterial 16S rRNA PCR amplicons using smart probes. Analytical Chemistry, Washington, v. 77, p. 7195-7203, 2005.
 76. STOUT, J. E., et al. Association between 16S-23S Internal Transcribed Spacer Sequence Group of *Mycobacterium avium* Complex and Pulmonary Disease. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 46, n. 8, p. 2790-2793, 2008.
 77. 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, Tokyo, v. 47, n. 5, p. 307-312, 2003.
 78. TAYLOR, C. et al. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. The Biochemical Journal, London, v. 291, n. 2, p. 493-504, 1993.
 79. 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, v. 31, n. 2, p. 175-178, 1993.
 80. TORTOLI E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. Clinical Microbiology Reviews, Washington, p. 319-354, 2003.
 81. TORTORA, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. in Microbiologia. Editora ARTMED, 6ª edição, Porto Alegre, 2003;
 82. 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.
 83. VEGA, F. A. F. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Barcelona, v. 24, n. 1, p. 53-57, 2006.
 84. WAGNER D, & YOUNG L S. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review, Infection, Munich, v. 32, p. 257-270, 2004.
 85. XIONG. L., et al. Use of PCR and reverse line blot hybridization microarray based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for rapid identification of 34 *Mycobacterium* species. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.44, n. 10, p. 3544-3550, 2006.
 86. YAM, W. C., et al. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. Journal of Medical Microbiology, Edinburgh, n. 55, p. 529-536, 2006.

7. ANEXOS

6.1 Anexo 1: Parecer do comitê de Ética

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

COMISSÃO DE ÉTICA DO CPqAM/FIOCRUZ**Projeto**

“Desenvolvimento e validação de abordagens moleculares e imunológicas para o diagnóstico de tuberculose infantil”

Coordenador: Haiana Charifker Schindler

Departamento de Imunologia/CPqAM

PARECER

A Comissão 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.

Recife, 05 de março de 2005.

Nilma Cintra Leal
Coordenador