

Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex

Differentiation of micobacteria by multiplex PCR

Diogo da Rocha Poroca¹, Andrea Santos Lima¹, Juliana Falcão de Araújo Lima¹,
Heidi Lacerda Alves da Cruz¹, Rosana de Albuquerque Montenegro¹,
Fábio Lopes de Melo², Haiana Charifker Schindler¹ e Lílian Maria Lapa Montenegro¹

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*¹⁴. 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^{5,7}. 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 ambiental¹⁰. A infecção ocorre por inalação, inoculação ou ingestão de material contaminado por micobactérias, sendo excepcional a transmissão entre humanos^{4,7}.

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 imunodepressão¹⁰. 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 imunodeficiência⁷. No entanto, as MNT são reconhecidas, também, como importantes patógenos em indivíduos imunocompetentes¹⁵.

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 compulsória²⁰. 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^{12,27}. 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 adequada²⁹.

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-laboratorial². 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 micobactérias²⁰. 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 alcançado⁹. 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 comerciais¹⁷. 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^{11,31,32}. 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 rápida³.

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^{18,30}. O IS6110 está presente apenas nas espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo usado para diferenciá-lo das MNT¹⁵. 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^{21,26}. 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 MNT²⁴. 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 MgCl₂ (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 minutos³. 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 MgCl₂ (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 minutos³. 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 MgCl₂ (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 minutos³. 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 MgCl₂ (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 minutos³. 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⁺⁺ 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).

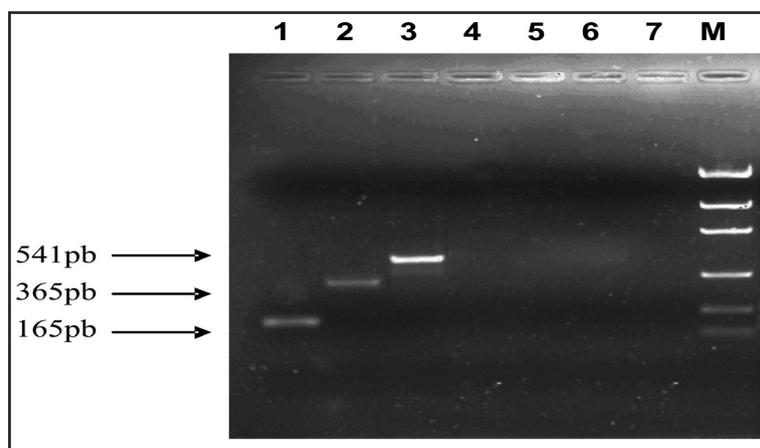


FIGURA 1

Eletroforese em gel de agarose demonstrando os amplicon 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 faixa 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).

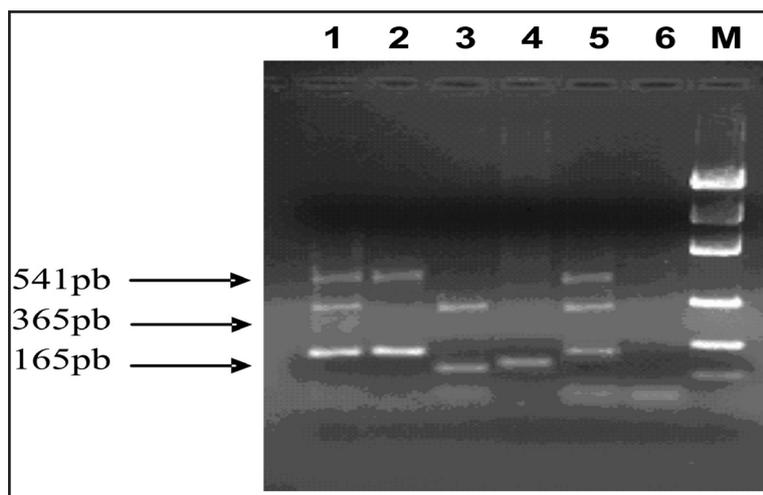


FIGURA 2

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 humanos⁶.

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 convencionais³. Os pares de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho demonstraram ser específicos para cada sequência alvo. Pao e cols²⁶ 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 pfelei*, *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 cols⁸ 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 cols²⁵ 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 cols²⁸ 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 cols³¹ 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 cópias¹⁹. 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 cols³² 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 complexo³. 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 cols¹⁸, 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 cols³, 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 cols³ 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 cols³, 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 cols³ 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 cols²³ 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^a 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, 6th 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. Multiplex 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. *Medicine* 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. 5^a 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.