



Unifametro
Formar para transformar

**CENTRO UNIVERSITÁRIO FAMETRO
CURSO DE FARMÁCIA**

DENISE ELEM DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE TRIATOMÍNEOS
PELA METOLOGIA PCR-*hsp65***

**FORTALEZA
2020**

DENISE ELEM DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE TRIATOMÍNEOS
PELA METOLOGIA PCR-*hsp65*

Artigo Científico apresentado ao curso de Farmácia do centro universitário – UNIFAMETRO – como requisito para a obtenção do grau de Bacharel, sob a orientação da prof.^a Dra. Andréa Bessa Teixeira e coorientação da Bióloga Caroliny Soares Silva.

FORTALEZA

2020

DENISE ELEM DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE TRIATOMÍNEOS
PELA METOLOGIA PCR-*hsp65*

Esse artigo científico foi apresentado no dia 11 de dezembro de 2020 como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia do centro universitário – UNFAMETRO – tendo sido aprovado pela banca examinadora composta pelos professores abaixo:

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Andréa Bessa Teixeira
Centro universitário FAMETRO - UNIFAMETRO

Dr. Anderson Clayton Sá Feitosa
Secretaria de Saúde do Distrito Federal - SESDF

Me. Thales Alves Campelo
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, “planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro.”

Jeremias 29:11

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, o maior orientador da minha vida, por ter me concedido saúde, força e disposição para fazer a faculdade e trabalhar. Sem ele, nada disso seria possível. Também sou grato ao senhor por ter dado saúde aos meus familiares e tranquilizado o meu espírito nos momentos mais difíceis da minha trajetória acadêmica até então.

Gostaria de agradecer minha família, especialmente minha mãe, pilar da minha formação, que fez de tudo para tornar os momentos difíceis mais brandos, e ao meu pai (*in memoriam*), que de onde estar me ilumina e guia.

Deixo também um agradecimento especial a minha tia, Sílvia, que sempre cuidou de mim como uma filha, saibam que sem a força de vocês eu não conseguiria seguir em frente.

Sou grata à minha orientadora, Dra. André Bessa, por esclarecer tantas dúvidas sendo tão atenciosa e paciente, uma professora que ao longo da minha vida acadêmica me inspirou e se tornou uma referência pra mim.

Gostaria também de deixar o meu profundo agradecimento a Dr.^a Cristiane Cunha Frota, ao professor Anderson Feitosa, ao Me. Thales Campelo e a Bióloga Caroliny Soares Silva por todo apoio e paciência ao longo da elaboração do meu projeto final e por estarem presentes sempre que eu precisei.

Manifesto aqui minha gratidão eterna por compartilharem suas sabedorias, seus tempos e suas experiências comigo.

Por últimos, mas não menos importantes, agradeço aos meus irmãos, Rachel Farias, Renato Farias e Gabriel Diógenes, pois jamais serei capaz de retribuir todo carinho, amor, força e incentivo que recebi. Amo vocês.

IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE TRIATOMÍNEOS PELA METOLOGIA PCR-*hsp65*

Denise Elem da Silva*
Andréa Bessa Teixeira**
Caroliny Soares Silva***

RESUMO

INTRODUÇÃO: A importância de um método rápido e sensível para o diagnóstico laboratorial das micobactérias levou ao desenvolvimento das técnicas moleculares. Nas últimas décadas, diferentes ferramentas revolucionaram o processo de amplificação e identificação dos microrganismos, como as do gênero *Mycobacterium*. Apesar da investigação de micobactérias ser dificultada pelo o lento crescimento delas, há pesquisas que abordam sobre sua identificação em amostras ambientais. No Ceará, o município de Sobral, contém um elevado índice de doenças causadas por micobactérias, onde foram encontrados dentro do perímetro urbano vetores triatomíneos contendo na sua microbiota o gênero *Mycobacterium* como um dos grupos dominantes. **OBJETIVO:** Identificar micobactérias, por PCR-*hsp65*, presentes em triatomíneos e ressaltar a importância de uma técnica rápida para o processo de identificação. **METODOLOGIA:** Os insetos utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Sobral. Foi realizada a extração do DNA genômico dos triatomíneos e amplificação da região *hsp65* do DNA de *Mycobacterium sp.*, seguido de identificação das MNT ambientais por padrão de digestão com enzimas de endorrestrição (RFLP). **RESULTADOS:** 167 amostras de triatomíneos foram submetidas às reações de PCR para a identificação da região *hsp65* do DNA de *Mycobacterium sp.* Das amostras analisadas, 43,11% (72/167) apresentaram amplificação positiva ao gênero *Mycobacterium* pela análise por PRA-*hsp65*. As espécies predominantemente encontradas nas amostras após a digestão enzimática foram aquelas pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (40,84%); *M. senegalense* e *M. smegmatis*. **CONCLUSÃO:** O estudo demonstrou o quanto é importante métodos de detecção rápido, como o PCR-*hsp65* para a identificação da maioria das micobactérias em laboratórios clínicos podendo contribuir para um diagnóstico precoce e assim auxiliar no controle das doenças, bem como na otimização do tempo necessário para a identificação.

Palavras-chave: PRA-*hsp65*. Restrição enzimática. Micobactérias.

*Discente do curso de Farmácia do Centro Universitário FAMETRO (UNIFAMETRO)

E-mail: deniseelemds@gmail.com

**Graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará, com habilitação em Análises Clínicas e Toxicológicas e mestre e doutora em Ciências Farmacêuticas. Docente do curso de Farmácia e Enfermagem do Centro Universitário FAMETRO (UNIFAMETRO).

E-mail: dea_bessa@hotmail.com

*** Graduada em Biologia pela Universidade Federal do Ceará, com experiência na área de Biologia Molecular de Microorganismos e mestrando em Patologia pela Universidade Federal do Ceará.

E-mail: karolinysoares2303@gmail.com

Artigo Científico apresentado ao curso de Farmácia Centro Universitário FAMETRO – UNIFAMETRO – como requisito para a obtenção do grau de Bacharel, sob a orientação da prof.^a Dra. Andréa Bessa Teixeira.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The importance of a fast and sensitive method for the laboratory diagnosis of mycobacteria has led to the development of molecular techniques. In the last decades, different tools have revolutionized the process of amplification and identification of microorganisms, such as those of the genus *Mycobacterium*. Although the investigation of mycobacteria is hampered by their slow growth, there is research that addresses their identification in environmental samples. In Ceará, the municipality of Sobral, contains a high rate of diseases caused by mycobacteria, where triatomine vectors containing the genus *Mycobacterium* were found within the urban perimeter as one of the dominant groups. **OBJECTIVE:** To identify mycobacteria, by PCR-hsp65, present in triatomines and to emphasize the importance of a quick technique for the identification process. **METHODOLOGY:** The insects used in this study were supplied by the Sobral Zoonosis Control Center. The genomic DNA was extracted from the triatomines and amplified the hsp65 region of the *Mycobacterium sp.* **RESULTS:** 167 samples of triatomines were subjected to PCR reactions to identify the hsp65 region of *Mycobacterium sp.* Of the analyzed samples, 43.11% (72/167) presented positive amplification to the genus *Mycobacterium* by the analysis by PRA-hsp65. The species predominantly found in the samples after enzymatic digestion were those belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (40.84%); *M. senegalense* and *M. smegmatis*. **CONCLUSION:** The study demonstrated how important rapid detection methods are, such as PCR-hsp65 for the identification of most mycobacteria in clinical laboratories, which can contribute to an early diagnosis and thus help in the control of diseases, as well as in the optimization of the necessary time for identification.

Keywords: PRA-hsp65. Enzymatic restriction. Mycobacteria.

1. INTRODUÇÃO

As técnicas laboratoriais convencionais e/ou moleculares devem ser aptas não só para diferenciar micobactérias tuberculosa (do complexo de *M. tuberculosis*) da micobactéria não tuberculosa (MNT), mas também para identificar as micobactérias ao nível de espécie. Porém, como todas técnicas laboratoriais possuem limitações, o uso de mais de um método nesse processo pode facilitar a identificação e amenizar erros (BRASIL, 2008).

A necessidade de um teste rápido e sensível para o diagnóstico laboratorial das micobactérias levou ao desenvolvimento das técnicas moleculares. Nas últimas décadas, diferentes ferramentas revolucionaram o processo de amplificação e identificação dos microrganismos. Dessa forma, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) tornou-se imprescindível para ocorrer a amplificação do DNA e, posteriormente, auxiliar na identificação dessas espécies, por meio de técnicas, como sondas genéticas, sequenciamento de DNA e análises com enzimas de restrição (WILLIAMS et al., 2007; NEONAKI et al., 2008; WILSON, 2011).

A técnica PCR, e suas variações, consistem na amplificação de ácido nucleico (DNA) *in vitro* em um processo altamente rápido. O método representa uma série de reações enzimáticas catalisadas pela enzima DNA polimerase termoestável, que se processa em três etapas (desnaturação, anelação e extensão). Em conjunto estas etapas formam um ciclo que se repete em diversas vezes (ROSSETTI; SPERHACKE, 2006).

Em 1989, uma pesquisa realizada por Hance et al. realizou estudos baseados na amplificação de um gene fragmentado da proteína de choque térmico da 65 kDa (hsp65) para identificação de espécies micobactérias por meio de amostras clínicas. Essa descoberta era o que faltava para a criação do método de polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição, PCR-RFLP *hsp65* ("*restriction fragment length polymorfism*"), também descrita na literatura por análise de restrição enzimática, PCR-PRA *hsp65* ("*restriction enzyme analysis*"), uma técnica capaz de diferenciar a maioria das espécies de micobactérias existentes, por meio de enzimas de restrição (*BstEII* e *Hae III*) (TELENTI et al., 1993; CHIMARA et al., 2008).

O resultado é verificado através da eletroforese dos produtos resultantes em gel de agarose, e visualizado em luz ultravioleta através de um equipamento de fotodocumentação (TELENTI et al., 1993; CHIMARA et al., 2008).

Quando falamos de micobactérias, não podemos deixar de ressaltar que na saúde pública a espécie mais significativa é a *M. tuberculosis*, causadora da tuberculose (TB) (SIMON, 2016), outras espécies de importância clínica é a *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), causadora da hanseníase, e o complexo micobactérias não tuberculose (MNT), responsável pela doença conhecida micobacteriose. Muitas MNT são saprófitas podendo ser encontradas em locais pouco prováveis como sistemas de água potável e até mesmo contaminado materiais cirúrgicos, apresentam resistência ao cloro e a outros produtos químicos usados em limpeza (BULLIN et al., 1970; DAWSON et al., 1982).

De modo geral as transmissões das doenças infectocontagiosas são atribuídas principalmente por meio de liberações de bacilos ao meio, sendo o homem sua principal fonte de infecção (FROTA et al., 2012).

Apesar da investigação de micobactérias ser dificultada pelo o lento crescimento delas, há pesquisas que abordam sobre sua identificação em amostras ambientais. No Ceará, o município de Sobral, contém um elevado índice de doenças causadas por micobactérias, tendo a TB, tratável, sendo apontada com uma alta incidência na região (SOUZA, CUSTÓDIO, MELO, 2019).

Em 2010, Frotas e colaboradores detectaram bacilos de formas variadas em tatus, e em 2017 foi identificaram bacilos em águas ambientais (FROTA et al., 2012; ARRAES et al., 2017). Próximo as localidades ao qual foi encontrado a maioria das amostras de micobactérias, foi visto em grande frequência insetos vetores de *Trypanosoma cruzi* (PARENTE et al., 2017), os triatomíneos, presentes em todo território de Sobral, sendo causador da doença de chagas, potencialmente fatal.

Segundo as estatísticas da OMS em 2020, estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, devido aos movimentos populacionais. A maioria das pessoas infectadas vivem em meios urbanos e posteriormente causam a disseminação para outros continentes, tendo 30% dos indivíduos cronicamente infectados exibindo alterações cardíacas e 10% mostrando alterações digestivas, neurológicas ou mistas, sendo preciso tratamento mais específico (WHO, 2020).

Partindo da relevância do tema, baseando-se nos estudos já realizados na região de Sobral-CE e nas evidências que demonstram o ambiente como colaborador para a disseminação de doenças causadas por micobactérias, o presente trabalho levantou a seguinte pergunta: O emprego da técnica PCR-*hsp65* na

identificação de espécies de micobactérias realmente é considerada uma vantagem sobre os métodos convencionais?

Com base nesse questionamento, este projeto empregou a técnica de PCR- *hps65* na detecção e identificação de micobactérias presentes em triatomíneos, uma vez que a investigação de micobactérias pode ser complicada pelo o lento crescimento delas. No caso da *M. leprae*, a sua incapacidade de crescimento *in vitro* dificulta o diagnóstico, sendo necessário o estudo do DNA utilização da PCR.

Diante desse contexto, o vigente estudo é justificado, pois a identificação de micobactérias, por PCR-*hps65*, presentes em triatomíneos, poderá ressaltar a importância de uma técnica rápida para o processo.

Assim, o estudo teve como objetivo analisar a utilização da técnica PCR-*hsp65*, por meio da caracterização das espécies de triatomíneos encontradas no peridomicílio urbano do município de Sobral-Ceará, identificando as espécies de micobactérias, presentes nos insetos capturados e os comparando com os dados da literatura.

2. METODOLOGIA

2.1 Tipo e local de estudo

O estudo é do tipo experimental, de abordagem qualitativa e aconteceu durante o período de fevereiro de 2020 a outubro de 2020. O processamento das amostras e as reações de PCR-RFLP-*hsp65* foram realizadas no Laboratório Micobactérias do Departamento Patologia e Medicina Legal (DPML) do Bloco de Biomedicina, da Universidade Federal do Ceará (UFC).

2.2 Aspectos Éticos

Não foi necessário submeter este projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa Humana ou Animal, visto que o projeto se baseia na investigação de espécies de micobactérias em insetos triatomíneos.

2.3 Amostras ambientais: coleta e processamento

As amostras ambientais utilizadas na pesquisa foram de triatomíneos, fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Sobral, onde 167 insetos foram coletados, oriundos de diversos distritos selecionados para a coleta, escolhidos de acordo com a demanda encontrada pelos agentes de zoonoses, que informaram a grande quantidade de insetos nas residências e no peridomicílio, pela própria população de Sobral, e enviados a um dos 24 Postos de Informação de Triatomíneo (PIT) instalados nas unidades de saúde do município.

A população coletou por demanda espontânea, mensalmente, cerca de 10 insetos (ninfas e insetos adultos) e, posteriormente encaminhou ao Centro de Controle de Zoonoses de Sobral, onde foram armazenados a temperatura de -20 °C.

O Centro de Controle de Zoonoses realizou a seguinte caracterização dos insetos: identificação da espécie do triatomíneo, sexo e estágio evolucionário. Os vetores, após identificação, foram transferidos ao Laboratório Micobactérias do DPML da UFC, ao qual foram aplicadas técnicas moleculares de extração de DNA e de PCR-RFLP-*hsp65* para detecção das espécies de micobactérias.

2.4 Extração de DNA

Todo o processo de extração de DNA descrito a seguir foi realizado por procedimento *in house*, devido a grande quantidade de material e DNA obtido nas amostras, seguindo o protocolo de purificação de DNA usando fenol/clorofórmio.

O abdômen dos insetos foram individualmente fragmentados com auxílio de lâmina de bisturi estéril e depois foram adicionados à 200 µl de tampão TE (Tris-Edta). Em seguida, foi adicionado 150 µl de proteinase K 10 mg/mL (preparada em tampão TE) e 30 µl de SDS 20% e logo depois as amostras foram homogeneizadas através ressuspenção por pipetagem e incubado a 45°C por overnight (16h-18h) em Thermo-shaker. Após esta etapa, foi adicionada 400 µl de solução de lisozima 50mg/mL (concentração final de 2mg/mL dissolvida em tampão TE) sendo novamente ressuspendida com a ponteira e incubada a 37°C por duas horas em Thermo-shaker. Posteriormente, foi adicionado ao extrato de DNA o mesmo volume da mistura fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e misturado gentilmente aproximadamente cinco vezes por inversão e centrifugado durante 10 minutos à 6.000 rpm (temperatura ambiente). A fase superior aquosa foi coletada e transferida para outro microtúbulo. Foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, sendo homogeneizado por inversão e seguida centrifugado a 6.000 rpm por 10 minutos (temperatura ambiente), onde novamente foi coletada a fase superior aquosa.

Foi adicionado 1/50 volumes de cloreto de sódio 5M e 2 volumes de etanol absoluto ao extrato de DNA. A solução foi homoneizada por lenta e gentil inversão até a formação de uma “nuvem” de DNA. Caso não houvesse a visualização, as amostras eram incubadas a -20°C por até 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo, restando apenas o sedimento contendo o DNA. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado novamente por inversão do tubo. O tubo foi deixado aberto em posição invertida, sobre uma gaze limpa em temperatura ambiente por até 30 minutos, para que todo o resíduo de etanol pudesse evaporar.

Por último, foi adicionado ao sedimento de DNA 75 µL de tampão TE e incubado a 65°C no banho seco até a dissolução completa do material. Após esta etapa, a amostra foi centrifugada à 13.000 rpm por 1 minuto e estocada a -20°C. A concentração de DNA obtida nas amostras foi medida em um nanoespectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) na absorbância de 260 nm.

2.5 Técnica PCR-RFLP *hsp65*

2.5.1 Amplificação de DNA por PCR

Neste trabalho foi utilizado método molecular PRA-*hsp65* recomendado pelo Ministério da Saúde (2008) e por LEÃO *et al.* (2004). O DNA extraído de cada inseto foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo amplificado o fragmento de 441 pb do gene *Hsp65*. Este gene é comum em todas as micobactérias, sendo utilizado os iniciadores Tb11 e Tb12 (5'- ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT - 3' e 5'- CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT -3'). A reação realizada no termociclador Bioer ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 65 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, seguido de extensão final a 72 °C por 10 min. Cinco microlitros do produto amplificado foi adicionado à 2µL de tampão de carregamento 6X (Promega) e a mistura foi separada por eletroforese em gel agarose 1% preparado em tampão TBE 0,5X. Foi empregado o marcador de DNA de 90pb. A eletroforese ocorreu a 100V (5V/cm) por aproximadamente 45 minutos. Como controles, foram utilizados DNA de *M. tuberculosis* H37Rv no positivo e para o negativo o DNA foi substituído por água ultrapura. Ambos os controles foram realizados em todas as reações.

Ao final da corrida eletroforética, o gel foi imerso em tampão TBEX contendo 2µl de solução de brometo de etídio 0,5mg/ml. Os géis corados foram visualizados em luz ultravioleta e depois fotodocumentados.

2.5.2 Restrição Enzimática (PCR-RFLP)

Para a restrição foram utilizadas as enzimas *BstEII* e *HaeIII*, onde foram aliqüotados dois volumes de 20 µL de produto da PCR de cada amostra para cada uma das duas enzimas utilizadas. Em seguida, estes volumes foram transferidos para microtubos de 0,2 mL e adicionados à mistura contendo 3 µL do tampão específico (tampão R 10x para *HaeIII* ou tampão O 10x para *BstEII*), para cada enzima, 2 µL da enzima de digestão e 5 µL de água ultrapura esterilizada, para um volume final de 30 µL.

Os padrões de restrição foram analisados por eletroforese em gel Metaphor 3,5%. Os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta misturados ao reagente fluorescente intercalante de DNA brometo de etídio 0,5mg/ml. Foram utilizados

marcadores de DNA de peso molecular de 50pb e de 25pb. A identificação foi finalizada através dos contrastes dos padrões das bandas com algoritmos descritos no PRASITE e padrões publicados na literatura. As digestões descritas seguiram o protocolo descrito por LEÃO *et al.* (2004).

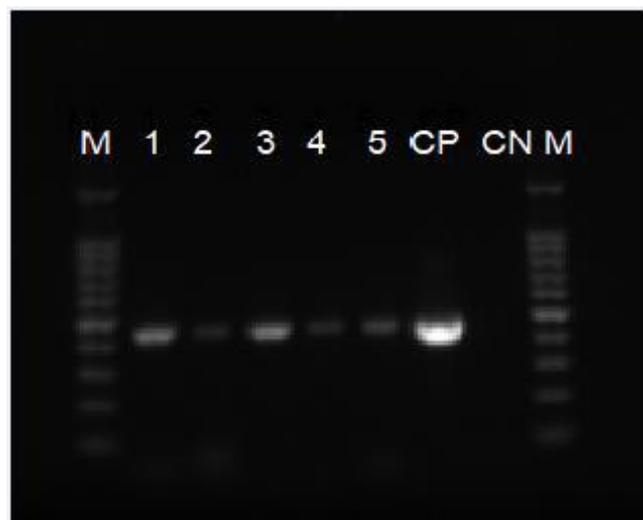
2.6 Análise estatística

As informações obtidas na pesquisa foram antes de tudo organizadas em planilhas com auxílio do Programa *Microsoft*® *Excel* 2010, de acordo com os parâmetros verificados. Posteriormente, foram analisados de forma descritiva e apresentados no formato de tabelas simples e cruzadas para uma melhor observação e comparação dos resultados.

3. RESULTADOS

Foram processadas 167 amostras, onde houve a análise do gene *hsp65*, por meio da amplificação da região *hsp65* do DNA de *Mycobacterium sp.* (FIGURA 1).

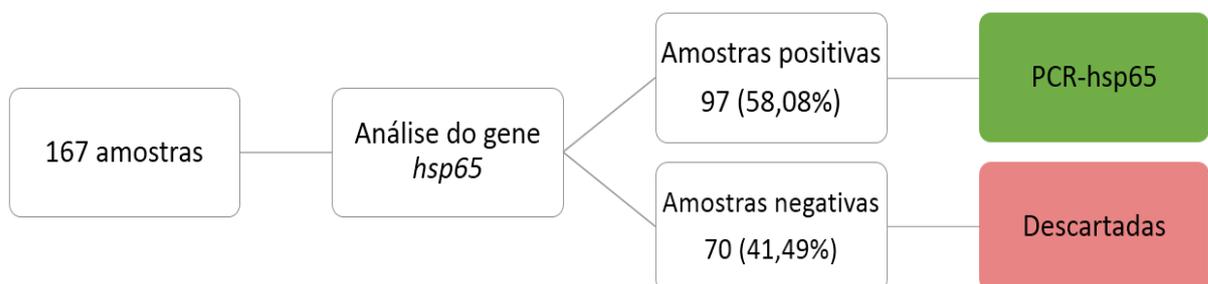
FIGURA 1: Eletroforese em gel agarose 1% com resultados da amplificação realizada na região *hsp65* de *M. Tuberculosis*.



Fonte: Carolyny Sousa Silva (2019). Poços M: marcadores 100 pb; poços 1 a 5 representam amostras positivas; poço CP: controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis* e poço CN: controle negativo com H₂O.

Das amostras amplificadas foram identificadas 97 amostras positivas (58,08%) e 70 (41,49%) amostras negativas, ocasionando a exclusão delas (FIGURA 2).

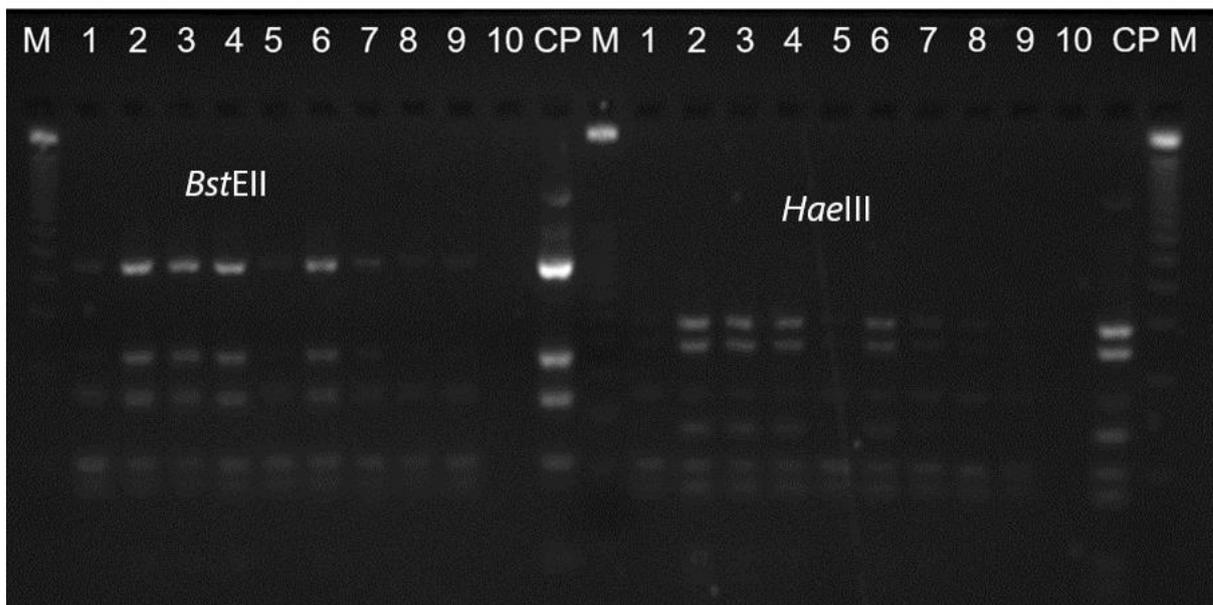
FIGURA 2: Etapas utilizadas para obtenção de resultados.



FONTE: Dados da pesquisa, 2020

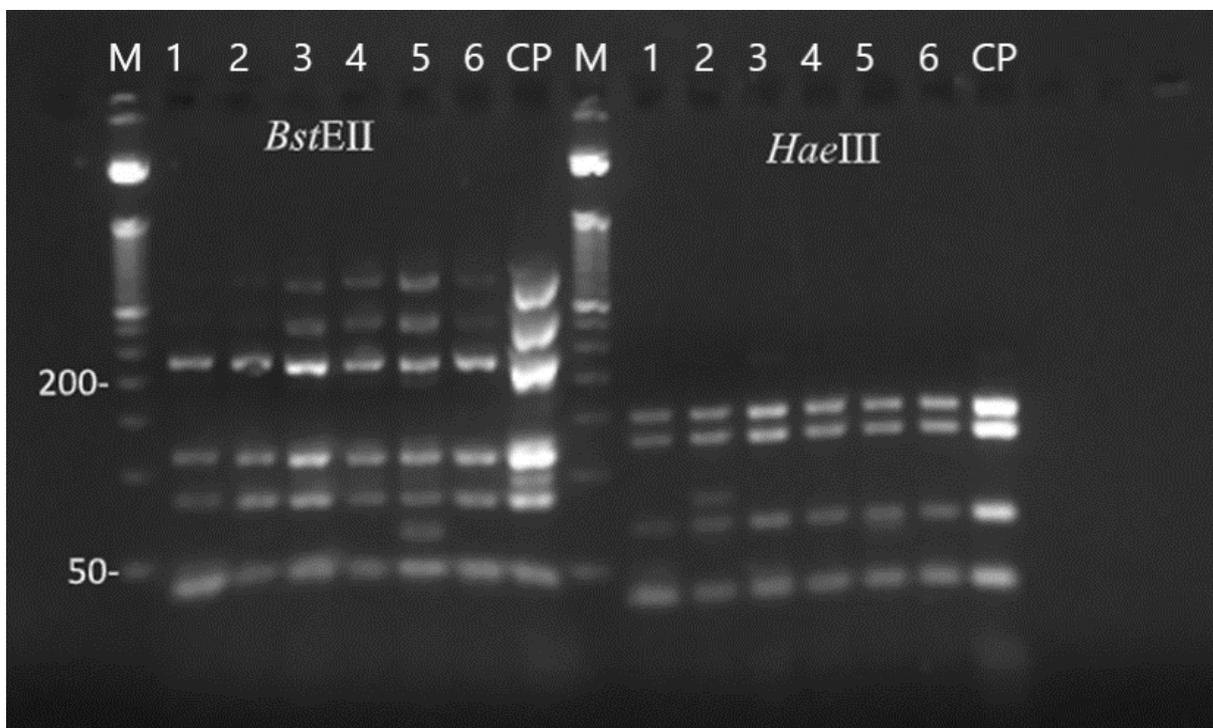
Logo após, as amostras positivas para o gene *hsp65* foram submetidas a restrição enzimática, pelas enzimas *HaeIII* e *BstEIII* (FIGURA 1.2 e 1.3).

FIGURA 1.2: Eletroforese em gel Methaphor 3,5% com os resultados da restrição enzimática do gene *hsp65* (441 pb).



Fonte: Caroliny Soares Silva (2020). Poços M: marcadores de 50 pb; poços de 1 a 10 representam amostras digeridas; poço CP: controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis*.

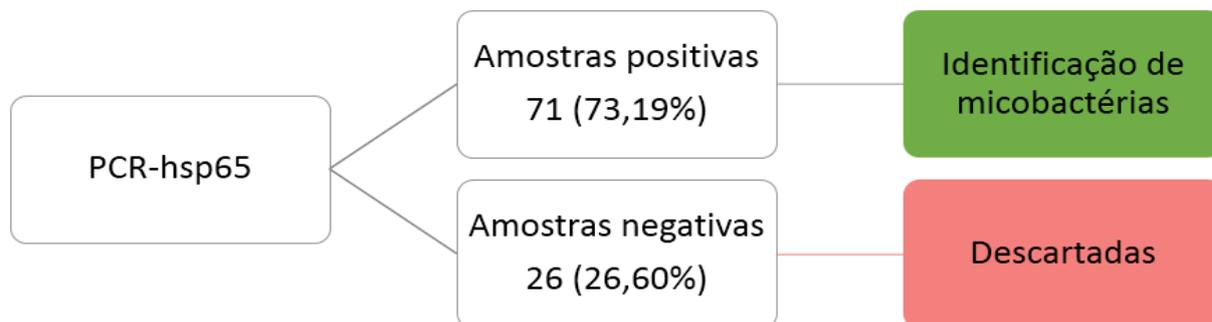
FIGURA 1.3: Eletroforese em gel Methaphor 3,5% com os resultados da digestão enzimática pelas enzimas *BstEII* e *HaeIII*.



Fonte: Caroliny Soares Silva (2020). Poços M: marcadores de 50 pb; poços de 1 a 6 representam amostras digeridas; poço CP: controle positivo com a cepa padrão H37Rv *M. tuberculosis*.

O resultado da restrição teve 71 (73,19%) amostras positivas e 26 (26,60%) amostras descartadas, por ter o resultado negativo (FIGURA 2.2).

FIGURA 2.2: Etapas utilizadas para obtenção de resultados.



FONTE: Dados da pesquisa, 2020

As micobactérias identificadas nessa etapa foram respectivamente: *mycobacterium tuberculosis*, tipo 1; *mycobacterium fortuitum*; *mycobacterium smegmatis*/ *mycobacterium wolinsky*/ *mycobacterium mageritense*; *mycobacterium agri* tipo 1; *mycobacterium gordonae* tipo 2; *mycobacterium senegalense* tipo 4; *mycobacterium simiae* tipo 3; *mycobacterium senegalense* tipo 1; *mycobacterium triviale* tipo 1 (FIGURA 2.3). Micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* tipo 1 foram as mais identificadas, com 29 (40,84%) unidade do total. Outras bactérias também apresentaram relevância na identificação, como *M. fortuitum* tipo 1 com 10 (14,08%) e *M. senegalenses* com 5 (7,04%) amostras.

FIGURA 2.3: Espécies identificadas com base na restrição enzimática realizada.

Espécie	N (%)	Padrões de bandas
<i>Complexo Mycobacterium tuberculosis, tipo 1</i>	29 (40,84)	235/115/85 / 145/130/75
<i>Mycobacterium fortuitum tipo 1</i>	10 (14,08)	235/115/85/145/130/75/60
<i>Mycobacterium smegmatis/ Mycobacterium wolinski 1/ Mycobacterium mageritense 1</i>	7 (9,85)	235/120/85 / 145/125/70
<i>Mycobacterium gordonae tipo 2</i>	5 (7,04)	235/115/85 / 265/130/0
<i>Mycobacterium agri tipo 1</i>	5 (7,04)	235/130/85 / 160/145/60
<i>Mycobacterium senegalense tipo 4</i>	4 (5,63)	235/120/85 / 180/140/50
<i>Mycobacterium simiae tipo 3</i>	4 (5,63)	235/130/85 / 145/130/0
<i>Mycobacterium wolinsky / Mycobacterium senegalense 1 / Mycobacterium fortuitum</i>	2 (2,81)	235/115/85/ 145/130/75/60
<i>Mycobacterium simiae / Mycobacterium lentiflavum tipo 1</i>	2 (2,81)	440/0/0 / 150/120/0
<i>Mycobacterium senegalense tipo 1</i>	1 (1,40)	235/130/75 / 140/165/60/50
<i>Mycobacterium triviale tipo 1</i>	1 (1,40)	440/0/0 / 170/130/0
<i>Mycobacterium fortuitum / Mycobacterium senegalense tipo 1</i>	1 (1,40)	235/115/85/145/130/75/60
TOTAL	71 (100)	

FONTE: Dados da pesquisa, 2020

4. DISCUSSÃO

O uso de métodos moleculares tem se mostrado bastante eficazes devido sua alta especificidade e obtenção de resultados em poucas horas, o que é impossível quando se utilizam testes químicos e de crescimento, pois o tempo necessário para que esses tipos de testes identifiquem as espécies de maneira definitiva variam de algumas semanas a dois meses (Esparcia *et al.*, 2011).

A determinações da metodologia adequada para a detecção e identificação de micobactérias por PCR-hsp65 tem como critérios mais importante a escolha certa das sequências alvo no genoma. No presente estudo, 58,08% das amostras testadas apresentaram positividade para o gene *hsp65*. Esse alvo genômico é o que possibilita diferenciar as espécies de micobactérias umas das outras bem como de outros microrganismos, sendo utilizado devido ao seu grau de conservação em cada uma das espécies do gênero (SILVA *et al.*, 2001; SAIFI *et al.*, 2013).

Nas amostras analisadas 73,19% do material, apresentaram bandas correspondentes a digestão pelas enzimas *HaeIII* e *BstEII*, indicando assim a presença de micobactérias.

Mesmo que a técnica do PRA-hsp65 como os métodos clássicos consumam a mesma quantidade de tempo nas etapas iniciais, o PRA-hsp65 apresenta uma grande vantagem sobre os métodos convencionais nas etapas seguintes. O PRA-hsp65 é capaz de identificar micobactérias em um dia após o isolamento do material em cultura, enquanto que são necessários até 60 dias para que os métodos convencionais, identifiquem as micobactérias depois do isolamento em cultura (Esparcia *et al.*, 2011).

Nas bandas que analisamos, após a digestão enzimática, 59,16% dos isolados foram MNT, e as cepas que apresentaram maiores índices foram *M. fortuitum* tipo 1 com 14,08% e *Mycobacterium smegmatis*/ *Mycobacterium wolinski* 1/ *Mycobacterium mageritense* 1 com 9,85% das amostras.

As doenças causadas por MNT em seres humanos é originada do ambiente, que serve como uma espécie de reservatório, permitindo que o bacilo permaneça infeccioso após longos períodos fora do corpo humano e, dessa forma, exista a transmissão e a contaminação continuada da doença (MARTIN-CASABONA *et al.*, 2004; HOLANDA *et al.*, 2017).

A presença de micobactérias de rápido crescimento, como bactérias pertencentes ao complexo *M. fortuitum*, causam infecções em locais como pele, tecidos e ossos, podendo também, em alguns casos, acarretar doença pulmonar (GRIFFITH *et al.*, 2007) uma vez que as micobacterioses compõem mais de 140 espécies, elas podem ser identificadas com base nas suas características morfológicas, tempo de crescimento e produção ou não de pigmentos após a exposição à luz (SAIFI *et al.*, 2013).

No ambiente, as micobacterioses são apontadas em vários locais como patógenos ambientais (TALAVLIKAR *et al.*, 2011), países como Canadá e Estados Unidos da América as micobacterioses são consideradas emergentes (LIN, 2018).

As espécies de *Mycobacterium smegmatis*/ *Mycobacterium wolinski* 1/ *Mycobacterium mageritense* 1 são consideradas bactérias oportunistas, por serem encontradas em pacientes imunossuprimidos ocasionando infecções na pele e em tecidos moles. Essas espécies tem uma associação bastante rara quando relacionadas a infecções significativas, porém são facilmente encontradas em ambientes de água doce, solos, esgotos e animais pequenos (OFER, *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013).

No presente estudo, observou-se também que 40,84% das amostras apresentaram padrões de bandas correspondentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que podem estar presentes em ambientes naturais, como água, solo e em insetos, onde pesquisadores identificaram os bacilos de *M. tuberculosis* no intestino e nas fezes de insetos que circulavam em residências de pacientes com tuberculose (RODRIGUEZ-RUANO *et al.*, 2018; MARTINEZ *et al.*, 2019).

Por se tratar da doença infectocontagiosa que mais mata no mundo a tuberculose afetando a humanidade há milhares de anos (SIMON, 2016), tendo seu marco no século XIX quando devastou centena de milhares de pessoas em todos os continentes (SAAVACOOOL, 1986), e mesmo que a Organização Mundial de Saúde (OMS) informe que a ocorrência de TB tenha reduzido mundialmente, é estimado que um quarto da população do mundo esteja infectada com o bacilo (WHO, 2017).

No ano de 2018, foi estimado que cerca de 10 milhões (variação: 9,0 - 11,1 milhões) pessoas no mundo adoeceram com TB, considerado nos últimos anos um número moderadamente estável, sendo que a maior parte das ocorrências de TB aconteceram nas regiões Sudeste Asiático (44%), África (24%) e Pacífico Ocidental

(18%) e com porcentagens menores no Mediterrâneo Oriental (8%), nas Américas (3%) e Europa (3%) (WHO, 2019).

O entendimento de como ocorre as transmissões de micobactérias colaboram para que tenhamos a necessidade de métodos rápidos para sua identificação a fim que se tenha o controle e até mesmo a prevenção das doenças causadas por elas (VIEIRA *et al.*, 2018; MARTINEZ *et al.*, 2019).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo demonstrou o quanto é importante métodos de detecção rápido para a identificação da maioria das micobactérias em laboratórios clínicos. Embora, é importante ressaltar que não se pode considerar a troca dos métodos já utilizados, como por exemplo no diagnóstico da TB, mas sim, considerar técnicas de biologia molecular como ferramenta de diagnóstico adicional. Dessa forma, pode-se destacar a importância de métodos moleculares, como PCR-hsp65, para identificações da micobactérias, podendo contribuir para um diagnóstico precoce e assim auxiliar no controle das doenças, bem como na otimização do tempo necessário para a identificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acervo Saúde, [S.l.], v. 445, n. 23, p. 1-8, 18 mai. 2019. Cenário epidemiológico da tuberculose no município de Sobral (CE) entre os anos de 2013 e 2017. **Revista Eletrônica Acervo Saude**. Maio, 2019.

ARRAES, M. L. B. D. M. *et al.* Natural environmental water sources in endemic regions of northeastern Brazil are potential reservoirs of viable *Mycobacterium leprae*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 12, p. 805-811, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1.ed. Brasília, 2008a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf. Acesso em: 04 ago. 2020.

BULLIN, C. H. E. I. *et al.* Isolation of *Mycobacterium xenopi* from water taps. **J. Hyg.** v. 68, p. 97-100, 1970.

Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY *et al.* Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA- hsp65 patterns. **BMC Microbiol**; v.8, n.48, 2008

DAWSON, D. J.; ARMSTRONG, J. F.; BLACKLOCK., Z. M. Mycobacterial crosscontamination of bronchoscopy specimens. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 126, n.6 p. 1095-1097,1982.

FROTA, C.C., LIMA, L.N.C., ROCHA, A.D.S., SUFFYS, P.N., ROLIM, B.N., RODRIGUES, L.C., BARRETO, M.L., KENDALL, C. and KERR, L.R.S. *Mycobacterium leprae* in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Northeast Brazil **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107,n.1 p. 209-213, 2012.

GRIFFITH, D. E. *et al.* An Official ATS/IDSA Statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **Am J Respir Crit Care Med** , [v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.

HOLANDA, M. V. *et al.* Presence of *Mycobacterium leprae* genotype 4 in environmental waters in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 2, p. 216-222, mar. 2017.

LEÃO, S. C.; MARTÍN, A.; MEJIA, G. I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. 2004. Disponível em: https://www.academia.edu/14472338/Practical_handbook_for_the_phenotypic_and_genotypic_identification_of_mycobacteria. Acesso em: 12 março. 2019.

LIMA, A. S. *et al.* First case report of infection by *Mycobacterium wolinskyi* after mammoplasty in Brazil. **Infect. Dis. Rep** v. 5, n. 2, p. 12-14 out. 2013.

LIN, C. *et al.* Increasing Prevalence of Nontuberculous *Mycobacteria* in Respiratory Specimens from US-Affiliated Pacific Island Jurisdictions¹. **Emerg. Infect. Dis** v. 24, n. 3, p. 485-491, mar. 2018.

MARTÍN-CASABONA, N.. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. a multi-country retrospective survey. **Int J Tuberc Lung Dis** , Barcelona, v. 8, n. 10, p. 1186-1193, 2004.

MARTINEZ, L. Detection, survival and infectious potential of *Mycobacterium tuberculosis* in the environment: a review of the evidence and epidemiological implications. **Eur. Respir. J** , v. 53, n. 6, p. 1-16, 2 2019.

MOKADDAS, E.; AHMAD, S. Species Spectrum of Nontuberculous *Mycobacteria* Isolated from Clinical Specimens in Kuwait. **Curr. Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 413-417, 2008. Springer Science and Business Media LLC.

NEONAKIS, I. K. *et al.* A Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 75, n.1, p. 1-11, 2008.

OFER, N. *et al.* Eyal. Ectoine Biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis*. **AEM**, v. 78, n. 20, p. 7483-7486. 2012.

PARENTE, C.C. *et al.* Community-based entomological surveillance reveals urban foci of Chagas disease vectors in Sobral, state of Ceará, northeastern Brazil. **PloS one**, v. 12, n. 1, 2017.

RODRÍGUEZ-RUANO, S. M *et al.* Microbiomes of North American Triatominae: the grounds for chagas disease epidemiology **Front. Microbiol**, v. 9, n.4 p.1-11, 2018.

ROSSETTI, M. L. R.; SPERHACKE, R. D. Tuberculose. In: ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SAIFI, M. *et al.* HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. *Clin. Microbiol. Infect*, [v.19, n.8, p.723-728, 2013.

SAAVACOOOL, J. Philadelphia and the white plague. **Trans Stud Coll Physicians Phila**, v. 8, n.3 p. 147-182, 1986.

SCHERER, L. C. *et al.* Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection. **BMC Pulm. Med**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 29 mar. 2011. Springer

SILVA, C F. *et al.* Hsp65 PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. **Rev Inst Med Trop São Paulo** ,], v. 43, n. 1, p. 25-28. 2001.

SIMON, G.G. Impacts of neglected tropical disease on incidence and progression of HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *Int. J. Infect. Dis* , v.42, n.9, p.54-57, 2016.

SOUZA, A. C.; CUSTÓDIO, F. R.; MELO, O. F. Cenário epidemiológico da tuberculose no município de Sobral (CE) entre os anos de 2013 e 2017. **REAS/Electronic. v.43, n 445, p.2178-2091,2019**

TALAVLIKAR, R. *et al.* *Mycobacterium senegalense* Tissue Infection in a Child After Fish Tank Exposure. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, v. 22, n. 3, p. 101-103, 2011.

TELENTI, A. *et al.* Rapid Identification of *Mycobacteria* to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **J. Clin. Microbiol**, v. 31, n. 2, p.175-178, 1993.

VIEIRA, C. B. *et al.* Triatomines: *trypanosomatids*, bacteria, and viruses potential vectors?. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* v. 8, p. 1-12, 16 nov. 2018. Frontiers Media SA.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis) 2020**. Geneva 2020.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2017**. Geneva. 2017.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis report 2019**. Geneva, p.1-8, 2019.

WILLIAMS, K. J. *et al.* A paradigm for the molecular identification of *Mycobacterium* species in a routine diagnostic laboratory. *J. Med. Microbiol* v. 56, n. 5, p. 598-602, 2007.

WILSON, M. L. Recent advances in the laboratory detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and drug resistance. **Clin. Infect. Dis**, v.52, n.11, p. 1350-1355, 2011.

