

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

CAMILA DA SILVA MOURA

**DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GRUPO
Mycobacterium abscessus ATRAVÉS DA TÉCNICA PCR DO GENE *erm*(41)**

RIO DE JANEIRO

2020

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

CAMILA DA SILVA MOURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Paulo Cesar de Souza Caldas

RIO DE JANEIRO
2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

M929d Moura, Camila da Silva.

Diferenciação de espécies pertencentes ao grupo *mycobacterium abscessus* através da técnica PCR do gene erm(41). / Camila da Silva Moura. – 2020.

25 f. : il. ; 31 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Biomedicina) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, Duque de Caxias, 2020.

“Orientadora: Prof^a. Daniely R. de F. Alves”.

Bibliografia: f. 18.

1. Biomedicina. 2. Infectologia. 3. PCR. I. Alves, Daniely R. de F. II. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. III. Título.

CDD – 610.28

CAMILA DA SILVA MOURA

**DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GRUPO
Mycobacterium abscessus ATRAVÉS DA TÉCNICA PCR DO GENE *erm*(41)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Paulo Cesar de Souza Caldas

Aprovada em:

Barra da Tijuca, _____ de _____ de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Mestre Paulo Cesar de Souza Caldas (orientador)

Prof.e Dra. Natália Moraes Cordeiro

Mestre Luciana Distásio de Carvalho

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho de conclusão de curso às seguintes pessoas:

Ao meu orientador Paulo Cesar Caldas, pelas ajudas, paciência, disponibilidade e carinho;a todos do Laboratório CRPHF, em especial Luciana Distásio por aceitar fazer parte da banca;aos meus professores que me ajudaram com grandes conhecimentos, sei que contribuíram profissionalmente e socialmente, principalmente a minha professora de TCC Natália de Moraes;ao coordenador do curso de Biomedicina da Unigranrio, Daniel Reynaldo Pereira, que, além de estar sempre a disposição, possibilitou com que eu continuasse estudando na instituição;aos meus familiares, que sempre me apoiando me deram forças para não desistir.Ao meu pai (em memória), e minha mãe, que me possibilitaram estudar em uma Universidade particular e sempre correram atrás junto comigo; e a Deus que me deu força, garra e determinação.

Este ano não está sendo fácil sem meu pai, mas nunca vou desistir, tudo que conquistei e conquistarei daqui para frente será em homenagem a ele que me serviu de espelho. Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Perfil das amostras analisadas através do método PRA-hsp65	15
Figura 2- Resultado da PCR do gene erm (41)	17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3. RESULTADOS	15
4. DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÃO.....	18
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	18

DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GRUPO *Mycobacterium abscessus* ATRAVÉS DA TÉCNICA PCR DO GENE *erm(41)*

Camila da Silva Moura¹

Paulo Cesar de Souza Caldas²

RESUMO

O Grupo *Mycobacterium abscessus* é dividido em três subespécies: *Mycobacterium abscessus* subespécie *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subespécie *massiliense* e *Mycobacterium abscessus* subespécie *bolletii*. Elas causam doenças semelhantes e diferenciam-se quanto ao padrão de suscetibilidade aos fármacos e tratamento. Surto de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido são relatados em todo o mundo, geralmente associados a procedimentos médicos. No Brasil, a maioria deles estão associados a espécies do Grupo *Mycobacterium abscessus*. Em 97,2% dos casos a subespécie *massiliense* foi envolvida. Macrolídeos, como a claritromicina e azitromicina, são os únicos antibióticos orais contra essas subespécies, entretanto, foram relatados casos de resistência ao tratamento. Dentre os mecanismos de resistência, o mais importante é a presença do gene *erm(41)*, que confere resistência à claritromicina. A identificação laboratorial destas micobactérias é rotineiramente realizada por métodos fenotípicos trabalhosos e demorados. Metodologias utilizando ferramentas moleculares como sequenciamento e hibridização reversa, são métodos rápidos, mas, possuem limitações e custo muito alto. *M. abscessus* subsp. *massiliense* tem sido considerado como um patógeno humano em potencial, tornando-se imprescindível sua identificação. Como alternativa aos métodos convencionais e comerciais novas ferramentas rápidas, fáceis de executar e de baixo custo são necessárias. Neste estudo utilizou-se uma ferramenta rápida, a PCR do gene *erm(41)*, que possibilitou a amplificação da sequência de DNA alvo em uma única reação, resultando na economia de tempo e reagentes, permitindo a diferenciação das subespécies. Os resultados desta metodologia foram comparados com os do sequenciamento do gene *rpoB*, apresentando concordância de 100% entre as amostras testadas.

Palavras-chave: PCR. Grupo *Mycobacterium. abscessus*. *erm41*. MNT.

¹ Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio -UNIGRANRIO.

² Mestre em Epidemiologia em Saúde Pública.

ABSTRACT

The *Mycobacterium abscessus* Group is divided into three subspecies: *Mycobacterium abscessus* subspecies, *Mycobacterium abscessus* subspecies *massiliense* and *Mycobacterium abscessus* subspecies *bolletii*. They cause similar diseases and differentiate themselves in terms of drug susceptibility and treatment. Outbreaks of infections caused by fast-growing mycobacteria are reported all over the world, usually associated to medical procedures. In Brazil, most of them are associated with species of the *Mycobacterium abscessus* Group. In 97.2% of the cases the subspecies *Massiliense* was involved. Macrolides, such as clarithromycin and azithromycin, are the only oral antibiotics against these subspecies, however, cases of resistance to treatment have been reported. Among the mechanisms of resistance, the most important is the presence of the *erm(41)* gene, which confers resistance to clarithromycin. The laboratory identification of these mycobacteria is routinely performed by laborious and time-consuming phenotypic methods. Methodologies utilizing molecular tools such as sequencing and reverse hybridization are fast methods, but have limitations and very high cost. *M. abscessus* subsp. *massiliense* has been considered as a potential human pathogen, making its identification essential. As an alternative to conventional and commercial methods, new fast, easy to perform and low cost tools are needed. In this study a fast tool was used, the PCR of the *erm* gene(41), which enabled the amplification of the target DNA sequence in a single reaction, resulting in time and reagent savings, allowing the differentiation of subspecies. The results of this methodology were compared with those of the *rpoB* gene sequencing, showing 100% agreement between the samples tested.

Keywords: PCR.Grupo *Mycobacterium. abscessus. erm(41)*. MNT.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* é composto por um grupo de patógenos que apresentam características fenotípicas e genotípicas em comum. Este gênero é constituído por patógenos importantes como *Mycobacterium tuberculosis* (TB), agente etiológico da tuberculose e *Mycobacterium leprae*, agente causador da lepra ou hanseníase. Outras espécies de micobactérias são encontradas na natureza, principalmente no solo e na água, são as denominadas micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT) (RAJU *et al.*, 2016). Normalmente são espécies de crescimento lento (SGM) ou de crescimento rápido (RGM) (Runyon, 1959; BRASIL, 2005), não-transmissíveis, ambientais, podendo ocasionalmente infectar seres humanos ou animais causando uma série de doenças incluindo as pulmonares, da pele, ossos, articulares, disseminadas e principalmente doenças crônicas, além de epidemias de infecções da pele e tecidos moles, após inoculação resultante de e um procedimento médico ou acidental (GRIFFITH *et al.*, 2007; DRAGE *et al.*, 2009; FALKINHAM *et al.*, 2015; MOUGARI *et al.*, 2016; FEDRIZZI *et al.*, 2017).

Dentre as MNT de crescimento rápido, pode-se destacar o Grupo *Mycobacterium abscessus*. Este Grupo é constituído de 3 subespécies: *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* e *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* que é o tema central do trabalho. Estudos mostram que 90% das infecções em todo o mundo nas últimas décadas são causadas pelas espécies deste Grupo. Muito se discute sobre a identificação destas espécies. A posição taxonômica dos membros do Grupo *M. abscessus* tem sido objeto de intensa investigação e, em alguns aspectos, confusão nos últimos anos, como resultado de diferentes abordagens à interpretação dos dados genéticos (TORTOLI *et al.*, 2016).

Devido aos crescentes casos de doenças após trauma, cirurgias e em pacientes com fibrose cística, é motivo de grande preocupação clínica (LEAO, 2009; CARVALHO, 2012; TORTOLI *et al.*, 2016; LIPWORTH *et al.*, 2019). A alta resistência *in vitro* desses microrganismos à maioria dos agentes quimioterápicos é de grande preocupação para a saúde pública (NESSAR *et*

al., 2012). A claritromicina tornou-se o fármaco de escolha para infecções por *M. abscessus* na década de 1990 e sucessos terapêuticos foram relatados (GRIFFITH *et al.*, 2007). As três subespécies pertencentes ao Grupo *Mycobacterium abscessus* são resistentes a uma variedade de antibióticos, utilizados no tratamento (KIM *et al.*, 2010).

Os Macrolídeos, como a Claritromicina e a azitromicina, são frequentemente os únicos antibióticos orais ativos contra as espécies do Grupo *Mycobacterium abscessus* (WALLACE R.J. JR, *et al.*, 1996).

A suscetibilidade dessas subespécies aos agentes antimicrobianos depende de múltiplos mecanismos de resistência, onde o mais importante é a presença de um gene o metilato de eritromicina (*erm*), em particular o *erm* (41) (confere resistência indutível) e o *rrl* no gene 23S rRNA (conferem resistência de alto nível), que estão potencialmente relacionados à resistência à claritromicina (KUSUKI *et al.*, 2018).

Estudos demonstram que a resistência indutível aos macrólidos não é encontrada na infecção por *M. abscessus subsp. massiliense* onde o gene é conhecido por ter 2 deleções, tornando-o não funcional (KOH *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2010).

No Brasil, surtos causados por micobactérias de crescimento rápido, têm sido relatados desde 1998, nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Pará. Surtos após cirurgias a laser para correção de miopia, seções de mesoterapia (injeções intradérmicas), mamoplastia e laparoscopia foram descritos, e a maioria deles associados a espécies do Grupo *M. abscessus* (FREITAS *et al.*, 2003; SAMPAIO *et al.*, 2006; VIANA-NIERO *et al.*, 2008; NUNES-COSTA *et al.*, 2016). De agosto de 2006 a julho de 2007, 1051 casos suspeitos foram notificados em 63 hospitais, onde uma análise genética identificou o *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense* em 97,2% dos casos (LORENA *et al.*, 2009).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em 2009 determinou através de uma Nota Técnica, a notificação compulsória das infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido, decorrentes de procedimentos invasivos (cirúrgicos ou cosméticos) realizados em serviços de saúde do Brasil, públicos ou privados (BRASIL, 2009).

A identificação das micobactérias é rotineiramente realizada através de métodos baseados na avaliação das características das culturas e na realização de testes bioquímicos, que são considerados trabalhosos e muito demorados. O sequenciamento de DNA é considerado o método padrão ouro para a identificação das espécies de micobactérias (TORTOLI, 2003; NEONAKIS *et al.*, 2008). O sequenciamento de DNA é considerado o método padrão ouro para a identificação das espécies de micobactérias (TORTOLI, 2003; NEONAKIS *et al.*, 2008). Principalmente o sequenciamento do gene *rpoB*, que é um gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase bacteriana, onde forma a subunidade beta da polimerase de RNA codificada por plastídio (PEP). As regiões do gene *rpoB* que são suscetíveis a mutações são tipicamente bem conservadas, indicando que são importantes para a vida (KOCH, A., MIZRAHI, V., WARNER, D. F, 2014; YUE *et al.*, 2003).

No entanto, tem várias limitações e o seu custo ainda é muito alto (JOAO *et al.*, 2014). Metodologias baseadas em hibridização reversa disponíveis comercialmente, como o GenoType NTM-DR (Hain Diagnostika, Nehren, Alemanha) também são métodos rápidos e confiáveis para a identificação de espécies de micobactérias. No entanto, os preços destes kits são ainda muito caros para uso na rotina laboratorial (IOANNIS *et al.*, 2008; RAMIS *et al.*, 2015).

A técnica PRA (*hsp65*), é um método diagnóstico capaz de diferenciar as micobactérias e baseia-se na amplificação do fragmento de 440 pb do gene *hsp65*, que codifica uma proteína que é sintetizada em situações de stress térmico (do inglês heat shock protein), seguida da análise de restrição enzimática do produto amplificado com as enzimas BstII e HAE III. Esta técnica possui um custo mais baixo, porém é demorada e não é capaz de diferenciar as subespécies do Grupo *M. abscessus* II (TELENTI *et al.*, 1993; CHIMARA *et al.*, 2008). O gene *hsp65* é encontrado em todas as espécies de micobactérias com sequências de nucleotídeos específicas para cada uma delas (MOTTA *et al.*, 2011).

A rápida identificação é um fator importante para se fornecer ao doente o tratamento adequado, uma vez que as diferentes espécies de micobactérias envolvem diferentes riscos e regimes terapêuticos específicos. (LEÃO *et al.*,

2005; KATOCH *et al.*, 2007; BROWN-ELLIOTT; WASER; WALLACE,2012; HERNÁNDEZ-TOLOZA *et al.*, 2016).

Considerando que a espécie *M. abscessus subsp. massiliense* figura como patógeno humano em potencial, torna-se imprescindível a sua identificação. O desenvolvimento de métodos de identificação rápidos, fáceis de executar, com uma boa relação custo-eficácia para serem aplicados na rotina da identificação de micobactérias, em laboratórios, como alternativa aos métodos convencionais e comerciais são necessários.

A PCR proposta neste estudo foi uma ferramenta rápida, de baixo custo que possibilitou a amplificação de uma sequência de DNA alvo em uma única reação, resultando em economia de tempo e de reagentes, além do que permitiu a distinção entre o *Mycobacterium abscessus subsp. boletii* e o *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar uma metodologia baseada no sistema da PCR, utilizando primers específicos, para diferenciar o *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* do *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense*, previamente identificados como *M. abscessus* tipo II através da metodologia do PRA-hsp65 e posteriormente discriminados pelo sequenciamento do gene *rpoB*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo analítico experimental que teve por base a utilização de cepas de micobactérias do Grupo *M. abscessus*, armazenadas no Laboratório de Referência Nacional (LRN) de Tuberculose e de Micobacteriose Ângela Maria Werneck do Centro de Referência Professor Hélio Fraga, da Escola Nacional de Saúde Pública da Fiocruz e cepas de referência de micobactérias *M. abscessus subsp. massiliense* CIP108297 e *M. abscessus subsp. bolletii* CIP108541.

Foram utilizadas 100 amostras, onde 50 foram previamente identificadas como *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* e 50 identificadas como *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense*, através do método Sequenciamento do gene *rpoB*.

Para a extração de DNA, foi utilizado o protocolo desenvolvido no Laboratório de Referência Nacional (LRN) de Tuberculose e de Micobacteriose Ângela Maria Werneck do Centro de Referência Professor Hélio Fraga, da Escola Nacional de Saúde Pública da Fiocruz (CAMPOS *et al.*, 2012).

A extração de DNA dos isolados para todas as reações de PCR foi realizada adicionando uma alçada de crescimento bacteriano, cultivadas em meio sólido LJ (Löwenstein-Jensen) a uma mistura de 300 µL de TE (em TE - 10 mM Tris e 1 mM EDTA pH 8.0) - TRITON X-100 a 1% e 100 µL de microesferas lavadas com ácido com um diâmetro de 106µm (Glass beads, acid-washed). As células foram agitadas vigorosamente em um agitador tipo vórtex por 1min e incubadas em temperatura ambiente por 8 min. Em seguida, 50 µL do sobrenadante da mistura foram colocadas em um tubo de polipropileno para microcentrífuga tipo Eppendorf contendo 100 µL de uma mistura de soluções de Chelex 100 a 15% (BIO-RAD LABORATORIES, INC.), Tween 20 a 0,5% (SIGMA-ALDRICH) e TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) v/v. A mistura foi agitada vigorosamente em um agitador tipo vórtex por 1min, depois aquecida a 100°C por 20 min, em um termobloco, e, seguido por uma centrifugação de 13.000 rpm por 8min. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo tipo Eppendorf de polipropileno e armazenado a 4°C até o momento da realização dos testes.

O PCR-PRA(*hsp65*), foi realizado através da amplificação do fragmento de 440 pb do gene *hsp65*, seguida da análise de restrição enzimática do produto amplificado com as enzimas BstEII e HAE III. São subsequentemente analisados por electroforese em gel e comparados com padrões conhecidos disponíveis, com a ajuda de algoritmos publicados (CHIMARA *et al.*, 2008) ou através de sites próprios na internet: PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>) (TELENTI *et al.*, 1993; BROWN-ELLIOTT *et al.*, 2012; VERMA *et al.*, 2015).

O Sequenciamento do gene *rpoB*, foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Adekambiet *al.* (2003). Nesta técnica os produtos amplificados por PCR com iniciadores específicos para um fragmento de 711bp do gene *rpoB*, que caracteriza as micobactérias de crescimento rápido, foram purificados e submetidos a uma segunda reação de PCR, seguida de precipitação e desnaturação do DNA. Após este processo, foram submetidos à

corrida de sequenciamento em equipamento apropriado. As sequências obtidas foram editadas com auxílio do programa SeqMan de alinhamento, BLAST-Basic Local Alingment Search Tool disponível na internet (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que permitiu a comparação das sequências obtidas com as sequências de cepas tipo do GenBank.

A PCR do gene *erm(41)*, consistiu na amplificação do fragmento do gene *erm(41)* de 670 pb, realizada através do preparo de uma mistura (Mix) com 36,9 µL de água MiliQ estéril; 5 µL de tampão de reação 10x, 1,5 µL MgCl₂ (50mM), 0,4 µL de dNTPs (25mM), 0,2 µL da enzima *Taq* DNA Polimerase (5U/ml) (LUDWIG BIOTEC) e 1 µL de cada iniciador -primer- (25 pmoles/ µL) *erm41f* (5'-GACCGGGGCCTTCTTCGTGAT-3') e *erm41r* (5'-GACTTCCCCGCACCGATTCC-3'). A seguir foram adicionados 4 µL do DNA das amostras de micobactérias, obtendo assim um volume de 50 µL.

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador Veriti Thermal Cycler (APPLIED BIOSYSTEMS – LIFE TECHNOLOGIES), nas seguintes condições: 5 minutos a 95 ° C, seguidos de 35 ciclos a 95 ° C por 60 segundos, 62 ° C por 60 segundos, 72 ° C por 90 segundos e extensão final a 72 ° C por 10 min. A amplificação do DNA foi evidenciada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com GelRed e visualizada em um transiluminador MiniBIS Pro (DNR BIO-IMAGING SYSTEMS) sob luz UV no comprimento de onda de 310 nm. Foi utilizado também na reação um controle negativo (água ultra pura) e como controle positivo, cepas de referência de micobactérias *M. abscessus subsp. massiliense* CIP108297 e *M. abscessus subsp. bolletii* CIP108541.

A análise foi realizada comparando-se os resultados obtidos com o tamanho dos fragmentos dos produtos de amplificação das cepas de referência, tendo como base um marcador de peso molecular (Ladder) de 100 pb.

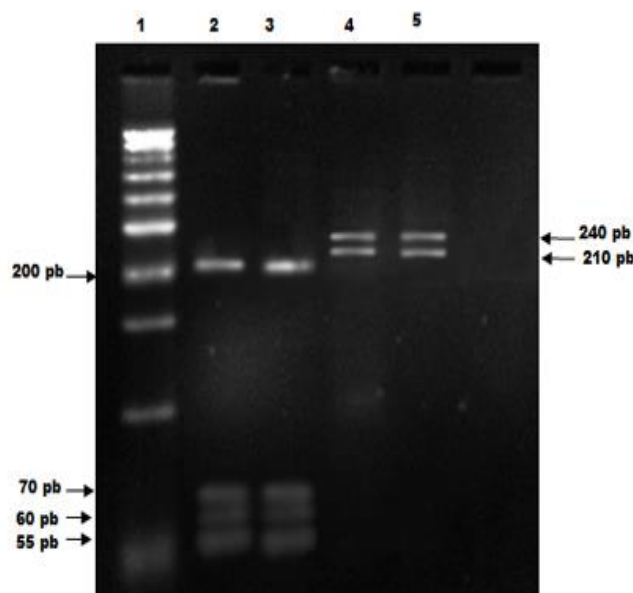
Após todos os resultados, os dados foram analisados utilizando o aplicativo WinEpiscope 2.0. (THRUSFIELD *et al.*, 2001), para avaliar grau de concordância entre os diferentes testes, utilizando a medida Kappa que é baseada no número de resultados concordantes entre os testes. Esta medida de concordância tem como valor máximo o 1, onde este valor representa total

concordância e os valores próximos e até abaixo de 0, indicam nenhuma concordância.

3. RESULTADOS

Resultado do *PRA-hsp65* foi através da análise dos produtos da digestão (amplicons) produzidos pelas duas enzimas de Restrição (por eletroforese em gel de agarose), as micobactérias testadas apresentaram perfil de bandas de 240 e 210 pb, para a enzima *BstEII* e 200,70 e 60 pb, paraa enzima *HaeIII*, utilizando como base um marcador de peso molecular (Ladder) de 50 pb (Figura 1). A combinação do resultado da digestão por estas enzimas, ao ser comparado com padrões conhecidos através do site PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>), foram então classificadas como *M.abscessus* tipo II.

Figura 1- Perfil das amostras analisadas através do método PRA-hsp65



Legenda: 1) Marcador de peso molecular 50 pares de base. 2) e 3) Perfil de *HaeIII* do Grupo *Mycobacterium abscessus*. 4) e 5) Perfil de *BstEII* do Grupo *Mycobacterium abscessus* (ELABORADO PELO AUTOR, 2020).

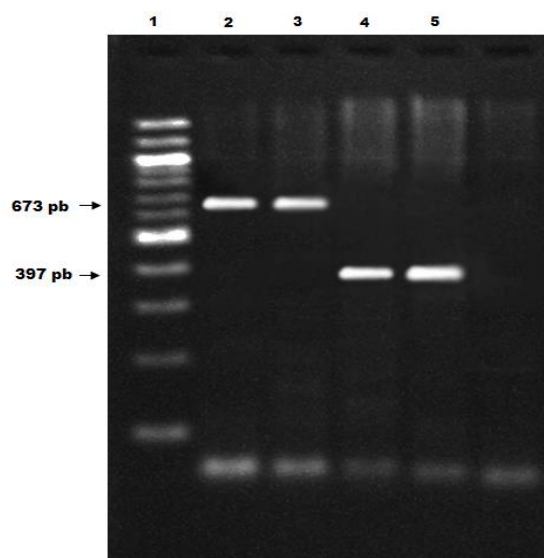
Resultado do sequenciamento do gene *rpoB* se deu a partir da determinação da ordem das bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina e

Guanina), 50 amostras apresentaram similaridade de 98% à 100% com a sequência de *M. abscessus subsp. bolletii* (CIP108541) e 50 amostras apresentaram similaridade de 98% à 100% com a sequência de *M. abscessus subsp. massiliense* (CIP108297), através da análise do GenBank.

Resultado PCR do gene *erm* (41) seguiu o protocolo de amplificação em que foram executadas as reações de PCR, bem como as condições de ciclagem, foram testados, para verificar se houve a correta amplificação dos fragmentos. As misturas de reação foram preparadas num local separado, onde não ocorreu manipulação de DNA, para evitar possíveis contaminações. Para o controle de qualidade do experimento, cada PCR foi testada com um controle positivo (DNA de micobactérias de Referência) e um controle negativo (água ultrapura). A padronização foi realizada com DNA genômico das micobactérias de Referência *M. abscessus subsp. massiliense* CIP108297 e *M. abscessus subsp. bolletii* CIP108541 e das cepas de micobactérias do estudo, através do sistema da PCR, onde todas apresentaram padrão de bandas esperado com a amplificação dos seus respectivos alvos. O sistema da PCR utilizado neste estudo, através da combinação dos “primers”, permitiu uma rápida detecção e diferenciação das 50 cepas de *M. abscessus subsp. bolletii* das 50 do *M. abscessus subsp. massiliense*. As amostras contendo aproximadamente 673pb no gel de agarose, foram identificadas como *M. abscessus subsp. bolletii* e as contendo aproximadamente 397pb como *M. abscessus subsp. massiliense*, comparando-se os resultados obtidos tendo como base o Ladder utilizado com 100 pbe o tamanho dos fragmentos dos produtos de amplificação das cepas de referência (Figura 2).

Os resultados deste estudo apresentaram 100% de concordância para todas as espécies utilizadas, quando comparado com os resultados previamente obtidos pela técnica do sequenciamento do gene *rpoB*, considerado o padrão ouro na identificação de micobactérias.

Figura 2- Resultado da PCR do gene erm (41)



Legenda: 1) Marcador de peso molecular 100 pares de base. 2) e 3) *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* 4) e 5) *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* (ELABORADO PELO AUTOR, 2020).

O resultado do estudo da análise de concordância (Kappa), apresentou um grau de concordância igual a 1.

4. DISCUSSÃO

A posição taxonômica dos membros do Grupo *M. abscessus* tem sido objeto de intensa investigação, resultado em diferentes abordagens à interpretação dos dados genéticos (TORTOLI *et al.*, 2016). Diversos estudos mostram que 90% das infecções em todo o mundo nas últimas décadas são causadas pelas espécies deste Grupo (MEDJAHED *et al.*, 2010). As infecções causadas pelo Grupo *M. abscessus* são de difícil tratamento, principalmente devido à resistência intrínseca desses organismos (BASTIAN *et al.*, 2011). Macrolídeos, como a Claritromicina e a Azitromicina, são os principais fármacos utilizados no tratamento, podendo influenciar no desenvolvimento de resistência induzida devido ao gene *erm(41)* (STOUT & FLOTO, 2012).

O estudo avaliou uma PCR, para diferenciar o *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* do *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*, identificados como *M. abscessus* tipo II através do método PRA-hsp65 e posteriormente discriminados através do sequenciamento do gene *rpoB*,

utilizando 50 amostras de cada subespécie. Estudos conduzidos por CARVALHO *et al.*(2017) mostraram que 30 amostras identificadas por uma PCR semelhante a do nosso estudo, foram confirmadas por sequenciamento. No Japão, MASE *et al.*(2020) estudando 14 cepas do Grupo *M. abscessus* encontrou 57% de *M. abscessus subsp. abscessus*, 43% de *M. abscessus subsp. massiliense*, e nenhum *M. abscessus subsp. bolletii* (Raro no Japão). As identificações foram baseadas no tamanho dos produtos da PCR do gene *erm* (41) e foram consistentes com os resultados do sequenciamento do gene *rpoB*. Este estudo mostrou que a PCR utilizada foi capaz de diferenciar os membros do Grupo *M. abscessus*, a que se propôs, com 100% de concordância com o padrão ouro. Apesar do número de amostras testadas por estes pesquisadores terem sido baixo, os resultados foram bastante semelhantes com o presente trabalho.

5. CONCLUSÃO

A PCR *erm*(41) proposta neste estudo mostrou ser uma ferramenta de rápida realização, que possibilitou a amplificação de uma sequência de DNA alvo em uma única reação, resultando em economia de tempo e de reagentes, que permitiu a distinção entre *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* e *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense*. Na comparação entre os seus resultados com os do sequenciamento do gene *rpoB* (padrão ouro), teve uma concordância de 100% e um Kappa = 1 (valor máximo). Assim com base nestes resultados esta metodologia, poderia ser usada de forma fácil e eficiente para a identificação diferencial destas micobactérias, na rotina laboratorial, como sugerem alguns autores.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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

BASTIAN, S., VEZIRIS, N., ROUX, A., BROSSIER, F., GAILLARD, JL., JARLIER, V., CAMBAU, E. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41) and *rrl* sequencing. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Feb;55 (2):775-81,2011.

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

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

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

CARVALHO, NATALIA FERNANDES GARCIA De *et al.*, Caracterização dos surtos causados pelo grupo *Mycobacterium abscessus*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 71, n. 2, 2012.

CARVALHO, N. F. G., PAVAN, F., SATO, D. N., LEITE, C. Q. F., ARBEIT, R. D., & CHIMARA, E. Genetic correlates of clarithromycin susceptibility among isolates of the *Mycobacterium abscessus* group and the potential clinical applicability of a PCR-based analysis of *erm*(41). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 73(4), 862–866, 2017.

CAMPOS C.E.D., CALDAS P.C.S., OHNISHI H., WATANABE T., OHTSUKA K., MATSUSHIMA S. First isolation of *Mycobacterium kyorinense* from clinical specimens in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**;50:2477–2478, 2012.

CHIMARA, E., FERRAZOLI, L., UEKY, SY., MARTINS, MC., DURHAM, AM., ARBEIT, RD., et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. **BioMed Central Microbiology**; 8: 48-54,2008.

DRAGE, LA., ECKER, PM., ORENSTEIN, R., et al. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infections in tattoos. **Journal of the American Academy of Dermatology**; 62:501,2009.

FALKINHAM, J. O. Environmental sources of nontuberculous *Mycobacteria*. **Clinics in Chest Medicine** .36 35–41,2015.

FEDRIZZI, T., MEEHAN,CJ., GROTTOLA, A., et al. Genomic characterization of Nontuberculous *Mycobacteria*. **ScientificReports**.;7:45258, 2017.

FREITAS, D., L. ALVARENGA, J. SAMPAIO, M. MANNIS, E. SATO, L. SOUSA, L. VIEIRA, M. C. YU, M. C. MARTINS, A. HOFFLING-LIMA, AND R. BELFORT, Jr. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. **Ophthalmology** 110:276-285, 2003.

GRIFFITH, D. E., T. AKSAMIT, B. A. BROWN-ELLIOTT, A. CATANZARO, C. DALEY, F. GORDIN, S. M. HOLLAND, R. HORSBURGH, G. HUITT, M. F. IADEMARCO, M. ISEMAN, K. OLIVIER, S. RUOSS, C. F. VON REYN, R. J. WALLACE, Jr., K. WINTHROP. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**.;175:367-416, 2007.

HERNÁNDEZ-TOLOZA, J. E. et al. Identificación de *Mycobacterium* spp a través de métodos moleculares- Laboratorio de Salud Pública de Bogotá, Colombia. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.34,n.1,p.17-22, 2016.

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

JOÃO, I. C. P., ANTUNES, L., NUNES, B., JORDAO, L. Identification of nontuberculosis mycobacteria by partial gene sequencing and public databases. **International Journal of Mycobacteriology**. v.3, p.144–152, 2014.

KOCH A, MIZRAHI V, WARNER DF (March 2014). "The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin?". **Emerging Microbes & Infections**. **3** (3): e17

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

KIM, H., KIM, B.J., KOOK, Y., YUN, Y., SHIN, J.H., KIM, B., KOOK, Y. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. **Microbiology and Immunology**. 54(6): 347-353, 2010.

KOH, W., JEON, K., LEE, N.Y., KIM, B., KOOK, Y., LEE, S., PARK, Y.K., KIM, C.K., SHIN, S.J., HUITT, G.A., DALEY, C.L., KWON, O.J. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 183:405-410, 2011.

KUSUKI M, OSAWA K, ARIKAWA K, TAMURA M, SHIGEMURA K, SHIRAKAWA T, NAKAMURA T, NAKAMACHI Y, FUJISAWA M, SAEGUSA J, TOKIMATSU I. Determination of the antimicrobial susceptibility and molecular

profile of clarithromycin resistance in the *Mycobacterium abscessus* complex in Japan by variable number tandem repeat analysis. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**.91:256–259, 2018.

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

LEÃO, S.C., TORTOLI, E., VIANNA - NIERO, C., UEKI, S.Y.M., LIMA, K.V.B., LOPES, M.L., YUBERO, J., MENENDEZ, M.C., GARCIA, M.J. Characterization of mycobacteria from a major brazilian outbreak suggest that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae*– *M. abscessus* group is needed. **Journal of Clinical Microbiology**.47990:2691-98,2009.

LEÃO, S.C., TORTOLI, E., EUZÉBY, J.P., GARCIA, M.J. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *Bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *Abscessus* nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**.61:2311-2313, 2011.

LIPWORTH S, HOUGH N, LEACH L, et al. Whole-Genome Sequencing for Predicting Clarithromycin Resistance in *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 63(1), 2019.

LORENA, NÁDIA SUELY de OLIVEIRA; DUARTE, RAFAEL SILVA; PITOMBO, MARCOS BETTINI. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos videocirúrgicos - a hipótese do glutaraldeído. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro. v. 36, n. 3, p. 266-267, July, 2009.

MASE, A., YAMAGUCHI, F., FUNAKI, T., YAMAZAKI, Y., SHIKAMA, Y., UKUCHI, K."PCR amplification of the erm(41) gene can be used to predict the sensitivity of *Mycobacterium abscessus* complex strains to clarithromycin".**Experimental and Therapeutic Medicine**, 19.2: 945-955), 2020.

MEDJAHED, H., GAILLARD, J. L., REYRAT, J. M. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field.**Trends in Microbiology**18: 117–123, 2010.

MOTTA, M. G., LEAL, M. J. S., MARTINS, L. M. S., SILVA, R. N., CASTRO, J. A. F., MONTE, S. J. H. Análise de restrição enzimática do gene hsp65 de isolados clínicos de pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar em Teresina Piauí. **Jornal brasileiro de pneumologia**. vol.37 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2011.

MOUGARI, F., GUGLIELMETTI, L., RASKINE, L., SERMET-GAUDELUS, I., VEZIRIS, N., CAMBAU, E.Infections caused by *Mycobacterium abscessus*: epidemiology, diagnostic tools and treatment. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 14:12, 1139-1154,2016.

NEONAKIS, I. K., GITTI, Z., KRAMBOVITIS, E., SPANDIDOS, D. A. Molecular Diagnostic Tools in Mycobacteriology. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, p.1–11, 2008.

NESSAR, R., CAMBAU, E., REYRAT, J. M., *et al.* *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare.**Journal of antimicrobial chemotherapy**. 67:810-818, 2012.

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

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

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

RUNYON, E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Medical Clinics of North America**.43(1):273-90, 1959.

SAMPAIO, J. L., VIANA-NIERO, C., FREITAS, D., HÖFLING-LIMA, A. L., LEÃO, S. C. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infection**.55(2):107-18, 2006.

SAMPAIO, J. L., LORENA, D. N. JUNIOR, D. DE FREITAS, A. L. HOFLING-LIMA, K. MIYASHIRO, F. L. ALBERTO, E. S. C. LEAO. An Outbreak of Keratitis Caused by *Mycobacterium immunogenum*. **Journal of Clinical Microbiology**. 44:3201-3207, 2006.

STOUT, J.E., FLOTO, R.A. Treatment of *Mycobacterium abscessus*. All macrolides are equal, but perhaps some are more equal than others. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**.186:822-823, 2012.

TELENTI, A., MARCHESI, F., BALZ, M., BALLY, F., BÖTTGER, E. C., BODMER, V. Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n. 2, p.175-178, 1993.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p. 319-354, 2003.

TORTOLI, E., KOHL, T.A., BROWN-ELLIOTT, B.A., TROVATO, A., LEAO, S.C., GARCIA, M.J. Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 66(11):4471–4479, 2016.

THRUSFIELD, M. V., BLAS, O. I., BLAS, C. I., NOORDHUIZEN, J. O. S., FRANKENA, K. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. **The Veterinary record**. 148. 567-72. 10.1136/vr.148.18.567, 2001.

VERMA, A. K., KUMAR, G., ARORA, J., SINGH, P., ARORA, V. K., MYNEEDU, V. P., SARIN, R. Identification of mycobacterial species by PCR restriction enzyme analysis of the *hsp65* gene an Indian experience. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 4 ,p. 293-296, 2015.

VIANA-NIERO, C., K. V. B. LIMA, M. L. LOPES, M. C. DA S. RABELLO, L. R. MARSOLA, V. C. R. BRILHANTE, A. M. DURHAM, E S. C. LEÃO. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, 46:850-855, 2008.

WALLACE, R.J. Jr, MEIER, A., BROWN, B.A., ZHANG, Y., SANDER, P., ONVI, G.O., BOTTGER, E.C. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 40(7):1676-81, 1996.

YUE, J., SHI. W., XIE, J., LI, Y., ZENG, E., WANG, H. Mutations in the *rpoB* Gene of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China. **Journal of Clinical Microbiology** DOI: 10.1128 / JCM.41.5.2209-2212.2003.