

**UNIVERSIDADE DO ESTADO AMAZONAS  
ESCOLA NORMAL SUPERIOR  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DO  
COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* E GENOTIPAGEM DA LINHAGEM  
BEIJING EM CEPAS DE *M. tuberculosis* ISOLADAS EM MANAUS – AM**

**MANAUS – AM**

**2022**

**WESLEY ROBERTH LIMA VIANA**

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DO  
COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* E GENOTIPAGEM DA LINHAGEM  
BEIJING EM CEPAS DE *M. tuberculosis* ISOLADAS EM MANAUS – AM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade do Estado do Amazonas – UEA/ENS,  
como requisito para obtenção do título de  
Licenciado em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Larissa Kirsch Barbosa

**Coorientador:** Prof. Dr. Mauricio Morishi Ogusku

**MANAUS – AM**

**2022**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

V614aa Viana, Wesley Roberth Lima  
APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA  
IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO Mycobacterium  
tuberculosis E GENOTIPAGEM DA LINHAGEM  
BEIJING EM CEPAS DE M. tuberculosis ISOLADAS  
EM MANAUS – AM / Wesley Roberth Lima Viana.  
Manaus : [s.n], 2022.  
35 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura  
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.

Inclui bibliografia

Orientador: Larissa Kirsch Barbosa

Coorientador: Mauricio Morishi Ogusku

1. M. tuberculosis. 2. Identificação. 3. Molecular. 4.  
Genotipagem. 5. Beijing. I. Larissa Kirsch Barbosa  
(Orient.). II. Mauricio Morishi Ogusku (Coorient.). III.  
Universidade do Estado do Amazonas. IV. APLICAÇÃO  
DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA

IDENTIFICAÇÃO DO COMPLEXO Mycobacterium  
tuberculosis E GENOTIPAGEM DA LINHAGEM  
BEIJING EM CEPAS DE M. tuberculosis ISOLADAS  
EM MANAUS – AM

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**WESLEY ROBERTH LIMA VIANA**

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DO  
COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* E GENOTIPAGEM DA LINHAGEM  
BEIJING EM CEPAS DE *M. tuberculosis* ISOLADAS EM MANAUS – AM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Estado do Amazonas –  
UEA/ENS, como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

---

---

---

Dedico esse trabalho a minha família, por desde o início acreditarem e incentivarem de que eu seria capaz de realizar tal feito. Assim como meus orientadores, por serem exemplos de profissionais para mim e por todos os ensinamentos teórico-práticos que possibilitaram a compreensão de todo esse assunto.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria possível, agradeço a vida, ao universo, ao vôlei, a ciência e a tudo o que me move, pois só com muita persistência, resiliência e esforço tudo isso se tornou possível. Agradeço principalmente a minha mãe, sendo ela a principal responsável pela pessoa e profissional que me tornei. Não poderia esquecer do meu pai e do meu irmão também, mesmo eles não entendendo muito de toda essa minha caminhada. Não poderia não citar aos meus amigos, que desde o início desse trabalho me apoiaram em um momento extremamente difícil e triste da minha vida. Agradeço demais aos meus orientadores, pois eles foram meu suporte até aqui, por acreditarem, confiarem e ajudarem em meu trabalho, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Kirsch Barbosa (UEA) e Prof. Dr. Maurício Morishi Ogusku (INPA), minha eterna admiração por me ensinarem tanto em todos esses anos.

## RESUMO

As novas tecnologias que estão sendo desenvolvidas redefiniram o diagnóstico de tuberculose, fornecendo uma base para técnicas laboratoriais de diagnóstico. O diagnóstico molecular da tuberculose por Polymerase Chain Reaction (PCR, reação em cadeia da polimerase) que utiliza primers de alta especificidade (98%), com amplas variações de sensibilidade (20-100%), tem sido utilizado para a identificação de alvos genéticos no bacilo. O objetivo geral deste trabalho foi aplicar técnicas moleculares para identificação de bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e genotipagem da linhagem Beijing em cepas de *M. tuberculosis* isoladas em Manaus – AM. Para isso, as micobactérias foram preservadas em meio líquido de Sauton ou meio Middlebrook 7H9 contendo Tween 80 e glicerol, mantidas a -20oC ou -80oC no laboratório de micobacteriologia do INPA. Com isso, foi feito inicialmente uma extração de DNA para utilizá-lo na técnica de PCR, seguida pela Eletroforese em gel de agarose e ao final foi montado o perfil eletroforético de cada cepa com base em deleções genômicas para os primers 16SrRNA, Rv0577, IS1561', Rv1510, Rv1970, Rv3877/8, Rv3120 e Rv2073c. Por fim, ocorreu a genotipagem para verificar se havia presença da linhagem Beijing dentre essas cepas, através da técnica PCR Multiplex, onde utilizou-se os primers ON- 1002 (Fw), ON-1258 (R1) e ON-1127 (R2). Esse trabalho mostra que dentre as espécies do CMtb, somente a espécie *Mycobacterium tuberculosis* foi identificada dentre os isolados analisados (64,3%), assim como não foi observada a presença do genótipo Beijing dentre as cepas de *M. tuberculosis* isoladas em Manaus – AM e analisadas até o momento.

**Palavras-chave:** *M. tuberculosis*; Identificação; Molecular; Genotipagem; Beijing

## ABSTRACT

The new technologies being developed have redefined the diagnosis of tuberculosis, providing a foundation for laboratory diagnostic techniques. The molecular diagnosis of tuberculosis by Polymerase Chain Reaction (PCR, polymerase chain reaction) that uses primers of high specificity (98%), with wide sensitivity variations (20-100%), has been used to identify genetic targets in the bacillus. The general objective of this work was to apply molecular techniques for the identification of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex and genotyping of the Beijing strain in strains of *M. tuberculosis* isolated in Manaus - AM. For this, the mycobacteria were preserved in Sauton's liquid medium or Middlebrook 7H9 medium containing Tween 80 and glycerol, kept at -20oC or -80oC in the mycobacteriology laboratory at INPA. With this, a DNA extraction was initially performed to use it in the PCR technique, followed by agarose gel electrophoresis and, at the end, the electrophoretic profile of each strain was set up based on genomic deletions for the primers 16SrRNA, Rv0577, IS1561', Rv1510, Rv1970, Rv3877/8, Rv3120 and Rv2073c. Finally, genotyping was carried out to verify the presence of the Beijing lineage among these strains, through the Multiplex PCR technique, where the primers ON-1002 (Fw), ON-1258 (R1) and ON-1127 (R2) were used. This work shows that among the CMtb species, only the *Mycobacterium tuberculosis* species was identified among the analyzed isolates (64.3%), as well as the presence of the Beijing genotype was not observed among the *M. tuberculosis* strains isolated in Manaus – AM and analyzed so far.

**Key words:** *M. tuberculosis*; Identification; Molecular; Genotyping; Beijing

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 2 – Estrutura da membrana plasmática e parede celular micobacteriana.

Figura 3 – Aspectos do *M. tuberculosis* em esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, no aumento de 100x, mostrando o efeito corda.

Figura 4 – Eletroforese dos produtos de PCR multiplex.

Figura 5 – Perfil eletroforético referente a cepa 6 para identificação molecular da espécie *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 6 – Teste de especificidade da PCR multiplex com diversas linhagens de *M. tuberculosis*.

Figura 7 – PCR singleplex. Teste de anelamento dos primers, cepas 94/18 e *M. tuberculosis* H37Rv.

Figura 8 – PCR multiplex para amostras 1 – 10.

Figura 9 – PCR multiplex para amostras 11 – 20.

Figura 10 – PCR multiplex para amostras 21 – 30.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Espécies do CMtb e testes utilizados para suas identificações baseados em morfologias das colônias e testes específicos com diferentes fontes nutricionais.

Tabela 2 – Número de registro das Micobactérias analisadas na pesquisa.

Tabela 3 – Primers utilizados definidos por seus respectivos loci com suas sequências nucleotídicas e tamanhos representados por pares de bases.

Tabela 4 – Perfil eletroforético mostrando presença ou ausência de determinados loci no genoma micobacteriano.

Tabela 5 – Primers utilizados na PCR multiplex.

Tabela 6 – Resultado da PCR para os loci definidos neste estudo e identificação de espécies.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO  | 10 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO   | 11 |
| 2.1 Micobactérias  | 11 |
| 2.1.1 Estrutura celular  | 12 |
| 2.2 Diagnóstico bacteriológico                                   | 14 |
| 2.2.1 Baciloscopia   | 14 |
| 2.2.2 Cultivo  | 14 |
| 2.2.3 Identificação fenotípica                                   | 15 |
| 2.2.4 Identificação molecular                                    | 17 |
| 2.2.5 PCR com base em deleções genômicas                         | 17 |
| 2.2.6 Genotipagem da linhagem Beijing                            | 18 |
| 3. OBJETIVOS   | 19 |
| 3.1 Objetivo Geral   | 19 |
| 3.2 Objetivos Específicos  | 19 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS  | 20 |
| 4.1 Caracterização da Pesquisa                                   | 20 |
| 4.2 Cepas de micobactérias                                       | 20 |
| 4.3 Extração de DNA  | 21 |
| 4.4 Identificação de espécies do Complexo <i>M. tuberculosis</i> | 21 |
| 4.5 Genotipagem da linhagem Beijing                              | 23 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO  | 24 |
| 5.1 Identificação de espécies do CMtb                            | 24 |
| 5.2 Perfil Eletroforético  | 25 |
| 5.3 Genotipagem da linhagem Beijing                              | 26 |
| 6. CONCLUSÕES  | 30 |
| 7. REFERÊNCIAS   | 31 |

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é considerada uma doença infecciosa, transmissível de pessoa a pessoa. A forma pulmonar é a mais frequente e tem como principal agente causador o *Mycobacterium tuberculosis* (PAIVA, 2011). Vários fatores estão associados a esta patologia, dentre eles infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), diabetes, desnutrição, alcoolismo crônico, drogadição e uso de fármacos imunossupressores (ANDRADE *et al.*, 2015; WHO, 2017).

No entanto, a TB, apesar de conhecida e tratável há muitos anos, continua sendo um grande problema de saúde pública mundial exigindo complementação de estratégias para seu controle (KADIOGLU *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015). Um dos principais fatores que dificulta o controle da doença é a demora no diagnóstico, que por sua vez, aumenta o tempo de exposição das pessoas ao bacilo da tuberculose, com o agravamento de todo o processo de transmissão e adoecimento, além da elevação do número de casos novos da doença (ALAVI *et al.*, 2015).

Essas limitações diagnósticas têm estimulado o uso de ferramentas moleculares que apresentam maior sensibilidade, especificidade e rapidez com o objetivo de detectar micobactérias em todos os espécimes clínico (CHENG *et al.*, 2005; LAWN *et al.*, 2011; BARANI *et al.*, 2012). As novas tecnologias que estão sendo desenvolvidas redefiniram o diagnóstico de tuberculose, fornecendo uma base para técnicas laboratoriais de diagnóstico (CHENG *et al.*, 2005; LAWN *et al.*, 2011). O diagnóstico molecular da tuberculose por Polymerase Chain Reaction (PCR, reação em cadeia da polimerase) que utiliza primers de alta especificidade (98%), com amplas variações de sensibilidade (20- 100%), tem sido utilizado para a identificação de alvos genéticos no bacilo (EREQAT *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2009; SEKAR *et al.*, 2008).

Além disso, A PCR é um método considerado sensível e específico que vem sendo utilizado na detecção de material genético (DNA ou RNA) de micobactérias, diretamente de espécimes clínicos como escarro, lavado brônquico, líquido cefalorraquidiano, líquido ascítico, material de biópsia, entre outros (GOPINATH *et al.*, 2009). 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 (primers) bem como inibidores presentes na amostra clínica (BHATTACHARYA *et al.*, 2003).

Os mecanismos genômicos associados à multirresistência do *M. tuberculosis* geralmente envolvem mutações nos genes que codificam determinadas proteínas, que são

inibidas pelas drogas ou que as metabolizam. As mutações podem produzir trocas de aminoácidos, que geram uma proteína com menos atividade ou afinidade pela droga, ou modificar a ação dos promotores dos genes, alterando a expressão gênica. Cada droga apresenta, pelo menos, uma proteína envolvida em seu metabolismo, que pode ser modificada por mutações genéticas. Através de métodos moleculares, estas mutações podem ser detectadas com rapidez, alta sensibilidade e especificidade, entendendo ainda, mecanismos relacionados à resistência antimicrobiana (FREITAS, 2009).

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

Essa pesquisa foi realizada com base em uma bactéria específica denominada *Mycobacterium tuberculosis*, que faz parte de um grande grupo denominado Micobactérias, possuindo assim uma estrutura celular única. Por consequência disso, existem métodos de identificação bastante diferenciados, dentre eles a identificação bacteriológica, com base na morfologia, coloração das células micobacterianas e características macroscópicas das colônias em meios de cultivo. Além disso, são feitos testes bioquímicos específicos para esse grupo de micobactérias e por fim, testes moleculares, tanto para identificação quanto para verificação da linhagem dentre as cepas que serão estudadas. Em razão disso, esse trabalho se mostrou importante e necessário para maior conhecimento a respeito da biodiversidade amazônica de micobactérias, destacando a escassez de informações a respeito desses microrganismos que se desenvolvem de forma bastante significativa nessa região.

Segundo a Fundação de Vigilância em Saúde (FVS-RCP/AM), em 2021, entre os meses de janeiro a outubro de 2021, o estado do Amazonas registrou 2.427 casos de tuberculose. Do total de casos registrados neste período, cerca de 71,36% foram registrados na capital, totalizando 1.732 casos. Entre os municípios que mais registraram casos de tuberculose em 2021 estão Manacapuru (71), Tefé (54), Iranduba (48), Tabatinga (42), Parintins (41) e Itacoatiara (37) (FVS, 2021).

### **2.1 Micobactérias**

As micobactérias pertencem à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae, que possuía um único gênero, denominado *Mycobacterium*. Este nome por Lehmann e Neumann, em 1896, em referência à película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos, que é similar à produzida por alguns fungos. Atualmente, também fazem parte

da família Mycobacteriaceae os gêneros Mycobacteroides, Mycolicibacillus, Mycolicibacter e Mycolicibacterium (GUPTA *et al.*, 2019).

O gênero Mycobacterium possui mais de 200 espécies e subespécies (PARTE, 2020), com destaque para aquelas que formam o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb) (*Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* - BCG, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium tuberculosis*). Os membros do CMtb são micobactérias estreitamente relacionadas, com homogeneidade em nível de DNA, porém variam em patogenicidade, distribuição geográfica, características fisiológicas (como morfologia de colônia, perfis de resistência a antibióticos), epidemiologia e preferência do hospedeiro (HUARD *et al.*, 2003).

Essas bactérias podem ser referidas como Gram-positivas, no entanto, não são coradas uniformemente pela coloração de Gram, mas pelos métodos de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun que utilizam a carbolfucsina, que confere coloração vermelha às micobactérias. Por resistirem ao descoramento subsequente com solução álcool-ácido, receberam uma denominação de “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) (ROSEMBERG & TARANTINO, 2002). Esta característica tintorial deve-se ao alto teor de lipídios presentes na parede celular. Porém, não permitem a definição da espécie micobacteriana, assim, para a definição da espécie, é necessário que os bacilos sejam isolados em meio de cultivo e identificados por testes fenotípicos e/ou moleculares (BRASIL, 2008).

No Amazonas, a coleção de micobactérias do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), se destaca na área médica na qual se encontram depositadas aproximadamente 2.100 cepas, isoladas principalmente de humanos. O acervo inclui também culturas “tipo” de centros de referência como o American Type Culture Collection (ATCC) (BECKER, 2006).

### **2.1.1 Estrutura celular**

As micobactérias são microrganismos que apresentam forma bacilar (Figura 1), variando de tamanho de acordo com a espécie, em geral, 0,2 a 0,7  $\mu\text{m}$  de largura por 1  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de comprimento (BRASIL, 2008). A parede celular micobacteriana (Figura 2) consiste em uma camada interna e uma externa que envolve a membrana plasmática (BRENNAN, PJ 2003).

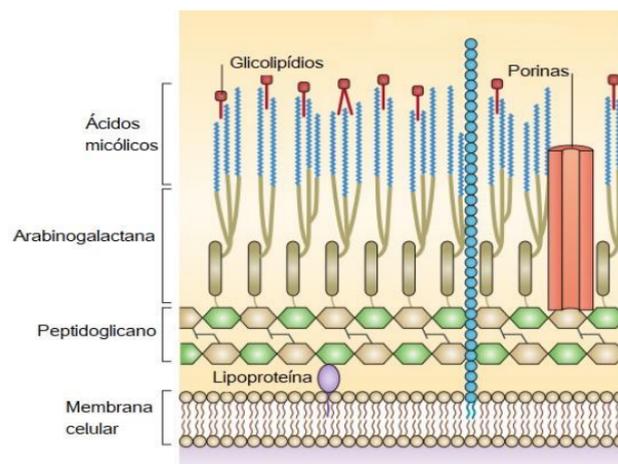
**Figura 1** – Microscopia eletrônica de varredura de *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: Profa Lucia Cangussu (Atlas – Microbiologia).

A parede celular é considerada singular pela constituição química de diversos lipídios, dentre eles os ácidos micólicos, que abrangem cerca da metade do peso da parede celular micobacteriana, tornando sua superfície hidrofóbica (Figura 2). Esses ácidos são ácidos graxos de cadeia longa, que contém cerca de 60 a 90 átomos de carbono na sua totalidade. Devido ao elevado conteúdo de ácidos micólicos, as micobactérias se beneficiam de uma parede celular espessa que lhes confere proteção tornando-as relativamente resistentes a uma grande parte dos antibióticos e outras drogas utilizadas no tratamento das doenças por elas causadas. A característica hidrofóbica faz com que a estrutura da parede celular seja impermeável a diversos compostos (MACIEIRA 2000; HONG & HOPFINGER 2004; HETT & RUBIN 2008).

**Figura 2** – Estrutura da membrana plasmática e parede celular micobacteriana.



Fonte: BROWN *et al.*, 2015

Além disso, a parede celular apresenta também um polímero rígido, insolúvel em água e quimicamente complexo, denominado de peptidoglicano. Entre o peptidoglicano e os ácidos micólicos existe uma camada única de polissacarídeos, o arabinogalactano. Os ácidos micólicos e o arabinogalactano encontram-se covalentemente ligados um ao outro, formando um complexo, que por sua vez, se ligam ao peptidoglicano. Deste modo, a complexidade da parede celular das micobactérias advém da sua constituição de ácidos micólicos e polissacarídeos (HONG & HOPFINGER 2004; HETT & RUBIN 2008).

Em relação a membrana plasmática, responsável por envolver o citoplasma, transportar e selecionar substâncias, além de participar do processo respiratório e da produção de energia. Nessa membrana também são sintetizados pigmentos carotenóides e niacina, utilizados nos testes de identificação fenotípica das espécies (BRASIL, 2008).

## **2.2 Diagnóstico bacteriológico**

### **2.2.1 Baciloscopia**

A microscopia direta ou baciloscopia é a pesquisa de BAAR em um esfregaço de amostra clínica, preparado e corado pela técnica de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun seguindo um método padronizado de observação ao microscópio. É uma técnica simples, rápida, de fácil execução e de baixo custo, por isso continua sendo importante no controle da TB, já que pode detectar casos bacilíferos, ou seja, os casos infecciosos da forma pulmonar (BRASIL, 2008). Porém, este método apresenta baixa sensibilidade e especificidade, sendo necessários de 5.000 a 10.000 bacilos por mL para que o teste seja positivo, sendo descrita numa faixa de sensibilidade de 25% a 65% quando comparada com o cultivo (WHO, 2015; MUWONGE *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2013).

### **2.2.2 Cultivo**

É um método de detecção de elevada especificidade e sensibilidade e considerado padrão ouro para o diagnóstico da TB. Por isso, é de grande importância destacar o limite de detecção de 100 bacilos por mL de escarro, vale ressaltar que para uma eficiência é necessário que a técnica seja realizada com alta qualidade (WHO, 2015).

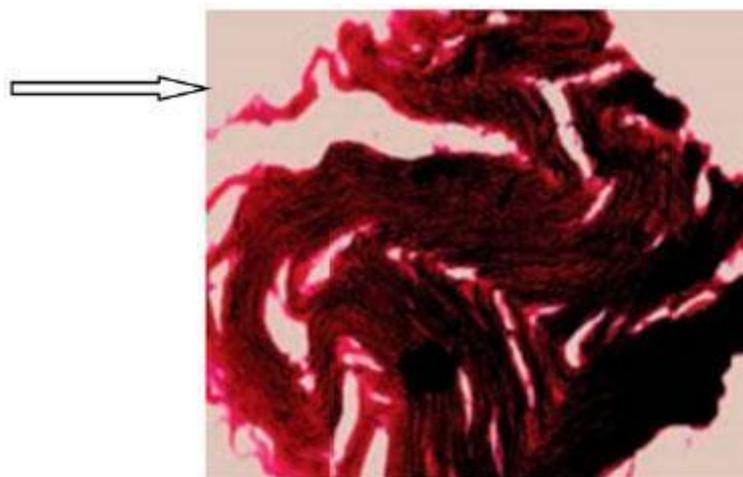
Os meios sólidos a base de ovos, Lowenstein-Jensen (LJ) e Ogawa, são os mais utilizados para o cultivo das micobactérias. As vantagens são o baixo custo e o menor índice

de contaminação. Porém, apresentam como desvantagem o tempo de crescimento que varia de 15 a 30 dias, podendo chegar até oito semanas (DROBNIEWSKI *et al.*, 2015). A cultura em meio líquido também pode ser utilizada, empregando sistemas automatizados não radiométricos e com monitoração contínua (LÓPEZ *et al.*, 2011)

As colônias crescidas, em meios sólidos, devem ser analisadas microscópicamente e macroscopicamente para confirmação. A análise macroscópica é realizada na cultura original onde são observadas colônias que apresentam diferentes morfologias e pigmentação, dentre elas lisas, rugosas, opacas ou transparentes. Já a análise microscópica, consiste na confecção de um esfregaço em lâmina a partir de uma colônia, corado pelo método de Ziehl-Neelsen. Assim é possível analisar a pureza da cultura e confirmar a presença de BAAR (KADIOGLU *et al.*, 2014).

Geralmente, as micobactérias apresentam-se na forma de bacilos curvos ou retos, enquanto as espécies do complexo *M. tuberculosis* apresentam um arranjo de bacilos em cadeias lineares paralelas (ou cordões de bacilos) denominado fator corda (Figura 3). A maioria das Micobactérias Não Causadoras de Tuberculose (MNT) não formam fator corda, apresentando aspecto microscópico de bacilos. A identificação da espécie é realizada por métodos bioquímicos e fenotípicos ou por técnicas moleculares (KADIOGLU *et al.*, 2014).

**Figura 3** – Aspectos do *M. tuberculosis* em esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, no aumento de 100x, mostrando o efeito corda.



Fonte: Gleize Villela. Revista Médica de Minas Gerais

### 2.2.3 Identificação fenotípica

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do Complexo *M. tuberculosis* (CMtb) e outras micobactérias denominadas não causadoras de tuberculose (MNT) (GRIFFITH *et al.*, 2007). Os laboratórios que realizam cultura para micobactérias devem ser capazes de separar espécies do CMtb das MNT. Para isso, um dos aspectos mais importantes do processo de isolamento e identificação das micobactérias é o tempo decorrido entre a coleta da amostra clínica e a emissão do laudo com a espécie identificada, para que esse dado seja utilizado pelo médico em benefício do tratamento do paciente.

A identificação das MNT é realizada pelo Laboratório de Referência Nacional (LRN) ou pelo Laboratório de Referência Regional (LRR) e pode ser feita por métodos fenotípicos, moleculares e ainda pela combinação de ambos. Na Tabela 1, seguem alguns exemplos de testes bioquímicos efetivos utilizados na identificação bacteriológica das espécies do gênero *Mycobacterium* (BRASIL, 2008).

Em relação aos principais testes fenotípicos empregados na identificação de micobactérias, destacam-se os testes úteis para a identificação das MNT de crescimento lento e os testes de crescimento rápido, onde são frequentemente isolados de material clínico. Ambos são baseados no tempo de crescimento e pigmentação das colônias, assim como, no crescimento em determinadas fontes nutricionais como niacina, nitrato e urease (BRASIL, 2008).

**Tabela 1** – Espécies do CMtb e testes utilizados para suas identificações baseados em morfologias das colônias e testes específicos com diferentes fontes nutricionais.

| Testes                  | <i>M. tuberculosis</i> |                 | <i>M. bovis</i> |                 | <i>M. africanum</i> |                 | <i>M. microti</i> | <i>M. canetti</i> | <i>M. caprae</i> | <i>M. pinnipedii</i> |
|-------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------------|
|                         | Clássico               | Asiática        | Clássico        | BCG             | Tipo I              | Tipo II         |                   |                   |                  |                      |
| Morfologia da colônia   | eugônica rugosa        | eugônica rugosa | disgônica lisa  | eugônica rugosa | digônica rugosa     | eugônica rugosa | eugônica lisa     | eugônica lisa     | disgônica lisa   | disgônica rugosa     |
| Niacina                 | +                      | +               | -               | -               | +/-                 | +/-             | +                 | -                 | -                | -*                   |
| Nitrato                 | +                      | +               | -               | -               | +/-                 | +               | -                 | +                 | -                | -                    |
| Urease                  | +                      | +               | -               | +               | +                   | +               | +/-               | +                 | ND               | ND                   |
| PAZase                  | +                      | +               | -               | -               | +                   | +               | +                 | -                 | +                | +                    |
| TCH                     | R                      | S               | S               | S               | S                   | R               | S                 | R                 | -                | -                    |
| SM                      | S                      | S               | S               | S               | S                   | S               | S                 | R                 | ND               | S                    |
| CS                      | S                      | S               | S               | R               | S                   | S               | SI                | S                 | ND               | ND                   |
| LI/OS                   | -                      | -               | +               | -               | +                   | -               | +                 | -                 | +                | +                    |
| Preferência de oxigênio | aeróbico               | aeróbico        | micro           | aeróbico        | Micro               | micro           | Micro             | ND                | micro            | ND                   |

Legenda: +/- = resultado variável, R = resistente à droga, S = sensível à droga, ND = Não há dados, micro = microaerofílico, LJ/PS = preferência por piruvato de sódio, PZase = pirazinamidase, TCH = hidrazida do ácido

tiofeno-2-carboxílico, SM = estreptomicina, CS = cicloserina, -\*= geralmente negativo. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2008.

## 2.2.4 Identificação molecular

O desenvolvimento de técnicas de amplificação do ácido nucléico (TAAN) representou um avanço nas pesquisas relacionadas ao diagnóstico de várias doenças, incluindo o da tuberculose. Métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para a identificação das micobactérias. As vantagens quando comparadas aos métodos tradicionais são: maior velocidade na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e possibilidade de melhorar o manejo do doente (BROCCOLO *et al.*, 2003; CAMPOS, 2006).

Testes moleculares baseados na amplificação de fragmentos de sequências genômicas do *M. tuberculosis* têm se mostrado uma importante ferramenta, capaz de detectar o bacilo em amostras biológicas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada um método eficaz para amplificação de segmentos específicos de DNA, e sensível, capaz de detectar menos de 10 bacilos por mL em diferentes espécimes clínicos, como sangue e urina (CRUZ *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2009). O funcionamento é baseado a partir da enzima DNA-polimerase, responsável pela síntese de DNA a partir de substratos de desoxinucleotídeos sobre um molde de DNA de fita simples. Dois oligonucleotídeos sintéticos (primers) são utilizados para que a reação ocorra (WATSON *et al.*, 2015).

Esse tipo de tecnologia favorece a identificação de bactérias do CMtb e se torna mais efetiva para o diagnóstico da doença em questão. Vale ainda ressaltar que essa metodologia é mais acessível para os laboratórios de menor infra-estrutura, como o Laboratório de Micobacteriologia do INPA, onde foi realizada a pesquisa. No contexto amazônico, se faz ausente a elaboração de um protocolo eficaz e seguro para essas técnicas que já estão consolidadas e que podem servir para a melhora e rapidez do diagnóstico para os pacientes acometidos pela Tuberculose.

## 2.2.5 PCR com base em deleções genômicas

Diversos métodos baseados na amplificação de ácidos nucléicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase Chain Reaction (PCR), a análise por enzimas de restrição, do inglês Restriction Enzyme Analysis (REA), ensaios comerciais de DNA,

tecnologias de sequenciamento de DNA, e, mais recentemente, ensaios de PCR em tempo real, foram desenvolvidos para a identificação de micobactérias. Embora o uso de sequenciamento de ácidos nucleicos seja altamente preciso, é trabalhoso e requer equipamentos e reagentes de alto custo. Por isso, vários laboratórios usam métodos in-house para a detecção/identificação de *M. tuberculosis*. Estes ensaios têm como alvo uma ampla variedade de sequências genéticas, tais como a sequência de inserção IS6110, genes que codificam o ácido ribonucléico ribossomal, e o gene *hsp65* da proteína de choque térmico. Alguns autores desenvolveram um método, baseado na PCR, para diferenciar as espécies do complexo *M. tuberculosis*, com base nas deleções genômicas. Normalmente, são usados sete pares de primers (cada primer representando uma sequência genética a fim de construir a tipagem do Complexo *M. tuberculosis* (HUARD *et al.*, 2003).

### 2.2.6 Genotipagem da linhagem Beijing

A linhagem Beijing foi definida por uma técnica molecular baseada na amplificação de uma região de repetições diretas polimórficas, que permite detectar e diferenciar o *Mycobacterium tuberculosis* (Spoligotyping). Dados baseados em marcadores moleculares concordam que essa linhagem se originou na Ásia central e a sua propagação mundial se deu em momentos diferentes, acompanhada por mudanças evolutivas específicas na população do patógeno e através da migração humana (MOKROUSOV, 2005; MERKER, 2014). Análises moleculares sugerem que a primeira diferenciação no genótipo Beijing ocorreu provavelmente em uma região denominada NTF, o que definiu duas linhagens conhecidas atualmente como ancestrais e modernas, em diferentes subpopulações humanas (MOKROUSOV *et al.*, 2005).

Em 2006, Mokrousov e colaboradores descreveram uma nova técnica baseada em PCR inverso de IS6110, com análise da presença e orientação de inserções de IS6110 em região particular do genoma denominada como NTF, capazes de diferenciar três ramificações de Mtb Beijing; sublinhagem Beijing ancestral (atípica), sublinhagem Beijing Moderna (típica) e cepas W Beijing (MOKROUSOV *et al.*, 2005; MOKROUSOV *et al.*, 2006).

O reconhecimento do genótipo Beijing foi iniciado na década de 90, através da análise por Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Essa família apresenta um grande número (> 20) de cópias de IS6110, com alta similaridade de fragmentos de DNA em seu perfil, o que causa dificuldade de análise. No entanto, esta mesma característica é utilizada para classificação destes isolados e, apesar da complexidade dos perfis obtidos por RFLP, é

observada uma homogeneidade dos mesmos em comparação aos perfis característicos de outras famílias (KAM *et al.*, 2005).

A sublinhagem Beijing ancestral possui a região Non-transmittedfactor (NTF), sendo esta a região cromossômica do genoma de *Mtb Intacta*, ou seja, com ausência da inserção IS6110 nesta região; a sublinhagem Beijing moderna apresenta uma simples inserção IS6110 na região NTF e as W Beijing, que são as variantes derivadas da sublinhagem moderna, possuem duas cópias de IS6110 inversa nesta região (WADA *et al.*, 2009). Outros marcadores baseados em Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) são capazes de diferenciar o genótipo Beijing ancestral do moderno.

Os Beijings modernos são conhecidos por apresentarem alterações missense (um tipo de mutação pontual, onde o aminoácido da proteína é alterado) em três genes putativos de reparo de mutações (Rv3908, mutT2 e ogt) e essas, a princípio, confeririam vantagens com relação a adaptação ao ambiente do hospedeiro, uma vez que podem aumentar as taxas mutacionais (LAN, 2003, MESTRE *et al.*, 2011). A análise de Regiões de Diferença (RDs) em *M. tuberculosis* Beijing confirmou que esta família pertence a um grupo monofilético (KONG, 2006, HANEKOM, 2007).

A deleção na região RD 105 foi exclusivamente encontrada na família Beijing, e apontada como um novo marcador para a linhagem W/Beijing. As regiões RD142, RD150 e RD181 possuem a capacidade de subdividir a W/Beijings em quatro subtipos (KONG, 2006). Estudos genômicos baseados em SNPs têm demonstrado grande eficácia em descrever rotas migratórias entre patógeno e hospedeiro, e ainda, reconhecer a existência de várias mutações importantes relacionadas com virulência numa mesma análise (MERKER, 2014).

Dessa forma, é relevante entender como os mecanismos evolutivos e moleculares estão envolvidos nas linhagens de micobactérias que estão presentes nessa região, em especial a linhagem Beijing, que foi analisada de forma inédita no contexto amazônico e poderá fornecer informações pertinentes a respeito da presença ou ausência dessa linhagem, e ainda, caso esteja presente, entender porque essa linhagem se adaptou tão bem à região, temperatura, clima, umidade e outros fatores que podem estar associados ou não em nível molecular.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Aplicar técnicas moleculares para identificação das bactérias do CMtb e genotipagem da linhagem Beijing em cepas de *M. tuberculosis* isoladas em Manaus – AM.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Identificar espécies do CMtb da Coleção de Microrganismos de interesse médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA);
- Determinar a frequência das diferentes espécies pertencentes ao CMtb;
- Verificar a presença do genótipo Beijing dentre as cepas de *M. tuberculosis* isoladas no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Caracterização da Pesquisa**

A caracterização desta pesquisa em relação à sua natureza se define como pesquisa aplicada, que tem como objetivo gerar conhecimentos para aplicação prática dirigidos à solução de problemas específicos (PRODANOV, 2013). Enquanto aos seus objetivos se consolida sendo uma pesquisa explicativa, por meio do registro, da análise, da classificação e da interpretação dos fenômenos observados, "aprofunda o conhecimento da realidade porque explica a razão, o porquê das coisas." (GIL, 2010, p. 28).

Em relação aos procedimentos técnicos se caracteriza como uma pesquisa experimental, determinando um objeto de estudo (neste caso sendo as micobactérias) e selecionando variáveis genéticas que podem estar influenciadas ou não com sua capacidade de virulência. E por fim, quanto à abordagem do problema, a pesquisa em questão é qualitativa, pois busca explicar a complexidade da diferenciação molecular de espécies de micobactérias que causam a doença tuberculose.

### **4.2 Cepas de micobactérias**

Vinte e nove cepas de micobactérias e identificadas genericamente como do Complexo *M. tuberculosis*, representando 1,38% da quantidade total de cepas depositadas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) foram avaliadas nesta pesquisa (Tabela 2). As micobactérias estavam preservadas em meio

líquido de Sauton ou meio Middlebrook 7H9 contendo Tween 80 e glicerol, mantidas a -20°C ou -80°C.

**Tabela 2** – Número de registro das Micobactérias analisadas na pesquisa.

| Identificação | Nº de registro | Identificação | Nº de registro | Identificação | Nº de registro |
|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| 1             | 06/18          | 11            | 79/18          | 21            | 124/18         |
| 2             | 16/18          | 12            | 92/18          | 22            | 128/18         |
| 3             | 18/18          | 13            | 94/18          | 23            | 130/18         |
| 4             | 21/18          | 14            | 105/18         | 24            | 140/18         |
| 5             | 36/18          | 15            | 106/18         | 25            | 149/18         |
| 6             | 43/18          | 16            | 111/18         | 26            | 150/18         |
| 7             | 45/18 (1)      | 17            | 113/18         | 27            | 151/18         |
| 8             | 45/18 (2)      | 18            | 116/18         | 28            | 156/18         |
| 9             | 68/18          | 19            | 121/18         | 29            | H37Rv          |
| 10            | 73/18          | 20            | 122/18         |               |                |

#### 4.3 Extração de DNA

O DNA das micobactérias foi extraído de acordo com protocolo proposto por Leão *et al.* (2004). Uma alíquota de 100 µL da suspensão de bacilos preservada em meio de Sauton juntamente com 100 µL de água ultrapura, foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, e inativado por 60' a 95°C. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 10" e armazenada a -20° C por um pernoite. Uma alíquota de cinco microlitros do sobrenadante foi usada na PCR.

#### 4.4 Identificação de espécies do Complexo *M. tuberculosis*

A PCR para os loci 16SrRNA, Rv0577, IS1561', Rv1510, Rv1970, Rv3877/8, Rv3120 e Rv2073c indicados na Tabela 3, foram realizadas em 8 reações independentes, seguindo protocolo de (HUARD *et al.*, 2003). Para cada locus, a PCR ocorreu em um volume de 25 µL, contendo tampão de reação 1X; 0,2µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,8µM de cada primer senso e antisenso; 1U de Taq DNA Polimerase, 5% de DMSO e 5 uL da amostra de DNA. Os

parâmetros da PCR foram: 1 ciclo a 95°C/1', 35 ciclos a 95°C/1', x°C/1' e 72°C/1', e 5 ciclos finais de 72°C/10'.

**Tabela 3** – Primers utilizados definidos por seus respectivos loci com suas sequências nucleotídicas e tamanhos representados por pares de bases.

| Locus alvo       | Primer    | Sequência nucleotídica                        | Tamanho(pb) |
|------------------|-----------|---|-------------|
| 16SrRNA          | 16SRNAF   | 5' ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C 3'       | 543         |
|                  | 16SRNAR   | 5' TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A 3'   |             |
| Rv0577           | Rv0577F   | 5' ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA 3'     | 786         |
|                  | Rv0577R   | 5' CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA 3'         |             |
| IS1561 (Rv3349c) | IS1561F   | 5' GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC TCT 3' | 943         |
|                  | IS1561R   | 5' AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCACCA TTG ACT 3'  |             |
| Rv1510 (RD4)     | Rv1510F   | 5' GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC 3'          | 1,033       |
|                  | Rv1510R   | 5' TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C 3'       |             |
| Rv1970 (RD7)     | Rv1970F   | 5' GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC 3'             | 1,116       |
|                  | Rv1970R   | 5' CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG 3'             |             |
| Rv3877/8 (RD1)   | Rv3877/8F | 5' CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC 3'      | 999         |
|                  | Rv3877/8R | 5' CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C 3'       |             |
| Rv3120 (RD12)    | Rv3120F   | 5' GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT 3' | 404         |
|                  | Rv3120R   | 5' GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA GAA TAG T 3'   |             |
| Rv2073c (RD9)    | Rv2073cF  | 5' TCG CCG CTG CCA GAT GAG TC 3'              | 600         |
|                  | Rv2073cR  | 5' TTT GGG AGC CGC CGG TGG TGA TGA 3'         |             |

Fonte: HUARD *et al.*, 2003

Os produtos da PCR, foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Safe DNA. A separação eletroforética foi realizada em tampão TBE a 110 Volts e 90 miliamperes por 50 minutos. Posteriormente, o gel de agarose foi visualizado em transiluminador de luz azul e fotografado.

Para a identificação das subespécies de CMtb, os perfis eletroforéticos obtidos foram analisados de acordo com a presença ou ausência dos respectivos loci, conforme Huard *et al.*, (2003), indicados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Perfil eletroforético mostrando presença ou ausência de determinados loci no genoma micobacteriano.

| Organismo(s)                      | 16SrRNA<br>(1) | Rv057<br>7 (2) | IS1561'<br>(3) | Rv1510<br>(4) | Rv1970<br>(5) | Rv3877/8<br>(6) | Rv3120<br>(7) | Perfil  |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|---------|
| <i>M. tuberculosis</i>            | +              | +              | +              | +             | +             | +               | +             | 1234567 |
| <i>M. africanum</i><br>subtype II | +              | +              | +              | +             | +             | +               | +             | 1234567 |
| <i>M. canettii</i>                | +              | +              | +              | +             | +             | +               | -             | 123456  |

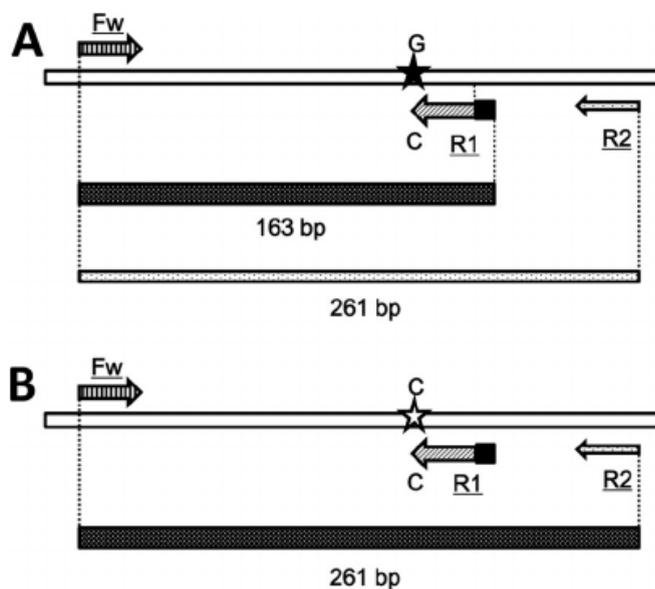
|   |   |   |   |   |   |   |   |        |
|---|---|---|---|---|---|---|---|--------|
| <i>M. africanum</i><br><i>subtype I</i> | + | + | + | + | - | + | + | 123467 |
| <i>M. caprae</i>                        | + | + | + | + | - | + | - | 12346  |
| <i>M. bovis</i>                         | + | + | + | - | - | + | - | 1236   |
| <i>M. bovis</i> BCG                     | + | + | + | - | - | - | - | 123    |
| <i>M. microti</i>                       | + | + | - | + | - | + | + | 12467  |
| <i>MNT</i>                              | + | - | - | - | - | - | - | 1      |

Legenda: *MNT*= Micobactéria não causadora de Tuberculose não faz parte do CMtb.

#### 4.5 Genotipagem da linhagem Beijing

A identificação da linhagem de Beijing foi realizada por PCR multiplex (Figura 4). A mistura de PCR, em um volume final de 25µl, deverá conter Tampão de PCR 1X, 200µM de dNTP, 2,2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2µM de cada um dos primers (Tabela 5) Fw e R1, 0,08µM do primer R2 (soluções de primer em 10µM), 0,5 M de betaína, 1U de Taq DNA Polimerase e 2 uL da amostra de DNA.

Figura 4 – Eletroforese dos produtos de PCR multiplex.



Fonte: Nakajima, 2013

Tabela 5 – Primers utilizados na PCR multiplex.

| Sequência alvo | Primer       | Sequência do primer   |
|----------------|--------------|-----------------------|
| <i>Rv0679c</i> | ON-1002 (Fw) | GTCAGTGAACGTGGCCGGCTC |

|                |                       |                                  |
|----------------|-----------------------|----------------------------------|
| <i>Rv0679c</i> | ON-1258 (R1) <i>a</i> | TCGGTCACCGTTTTTGTAGGTGACCGT<br>C |
| <i>Rv0679c</i> | ON-1127 (R2)          | AGCAACCTCGCAATCTGACC             |

Fonte: Nakajima *et al.*, 2013.

A visualização dos produtos da PCR foi feita após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Safe DNA. A separação eletroforética foi realizada em tampão TBE a 110 Volts e 90 miliamperes por 50 minutos. Posteriormente, o gel de agarose foi visualizado em transiluminador de luz azul e fotografado. Fez-se necessário um teste de especificidade dos primers da PCR multiplex, de um estudo preliminar anterior por Garcez (2020, comunicação pessoal). Foram utilizadas as seguintes cepas/linhagens de *M. tuberculosis*: 94/18 – Beijing (1); 16/18 – LAM (2); 21/18 – EAI (3); 45/18 – Haarlem (4); 111/18 – Cameroon (5); H37Rv (6) e Branco (7). Para este ensaio de PCR multiplex as cepas de *M. tuberculosis* Beijing possuem 163 pares de bases (pb), enquanto as não-Beijing, 261pb.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação de espécies do CMtb

A Tabela 6 indica as cepas de micobactérias analisadas nesta pesquisa. As cepas 3 (18/18), 9 (68/18), 10 (73/18), 13 (94/18), 15 (106/18), 16 (111/18), 20 (122/18), 22 (128/18), 27 (151/18) e 28 (156/18) ; (n=10; 35,7%) não foram identificadas, pois não apresentaram o perfil eletroforético padrão de *M. tuberculosis* esperado, que será mostrado a seguir. Estes resultados são passíveis de revisão, já que as ausências de amplificação de algumas regiões genômicas não levaram à identificação de uma espécie diferente de *M. tuberculosis*. Provavelmente, houve inibição da PCR para essas regiões genômicas.

**Tabela 6** – Resultado da PCR para os *loci* definidos neste estudo e identificação de espécies.

| Cepas | Amplificação do <i>locus alvo</i> |        |        |        |        |          |        |        | Resultado              |
|-------|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|------------------------|
|       | 16SrRNA                           | Rv0577 | IS1561 | Rv1510 | Rv1970 | Rv3877/8 | Rv2073 | Rv3120 |                        |
| 1     | +                                 | +      | +      | +      | +      | +        | +      | +      | <i>M. tuberculosis</i> |
| 2     | +                                 | +      | +      | +      | +      | +        | +      | +      | <i>M. tuberculosis</i> |
| 3     | +                                 | +      | -      | +      | +      | +        | +      | +      | N<br>I                 |
| 4     | +                                 | +      | +      | +      | +      | +        | +      | +      | <i>M. tuberculosis</i> |
| 5     | +                                 | +      | +      | +      | +      | +        | +      | +      | <i>M. tuberculosis</i> |
| 6     | +                                 | +      | +      | +      | +      | +        | +      | +      | <i>M. tuberculosis</i> |
| 7     | +                                 | +      | +      | +      | +      | +        | -      | +      | <i>M. tuberculosis</i> |
| 8     | +                                 | +      | +      | +      | +      | +        | +      | +      | <i>M. tuberculosis</i> |

|     |   |   |   |   |   |   |   |   |                        |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|------------------------|
| 9   | + | + | - | - | - | - | + | + | N<br>I                 |
| 10  | + | + | - | - | - | - | + | + | N<br>I                 |
| 11  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 12  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 13  | + | - | - | - | - | - | + | + | N<br>I                 |
| 14  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 15  | + | + | + | - | + | + | + | + | N<br>I                 |
| 16  | + | + | + | - | + | - | - | + | N<br>I                 |
| 17  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 18  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 19  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 20  | + | + | + | - | + | + | + | + | N<br>I                 |
| 21  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 22  | + | + | - | - | - | - | + | + | N<br>I                 |
| 23  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 24  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 25  | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 26  | + | + | - | + | + | + | + | + | N<br>I                 |
| 27  | + | + | + | - | - | - | + | + | N<br>I                 |
| 28  | + | + | + | - | - | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |
| 29* | + | + | + | + | + | + | + | + | <i>M. tuberculosis</i> |

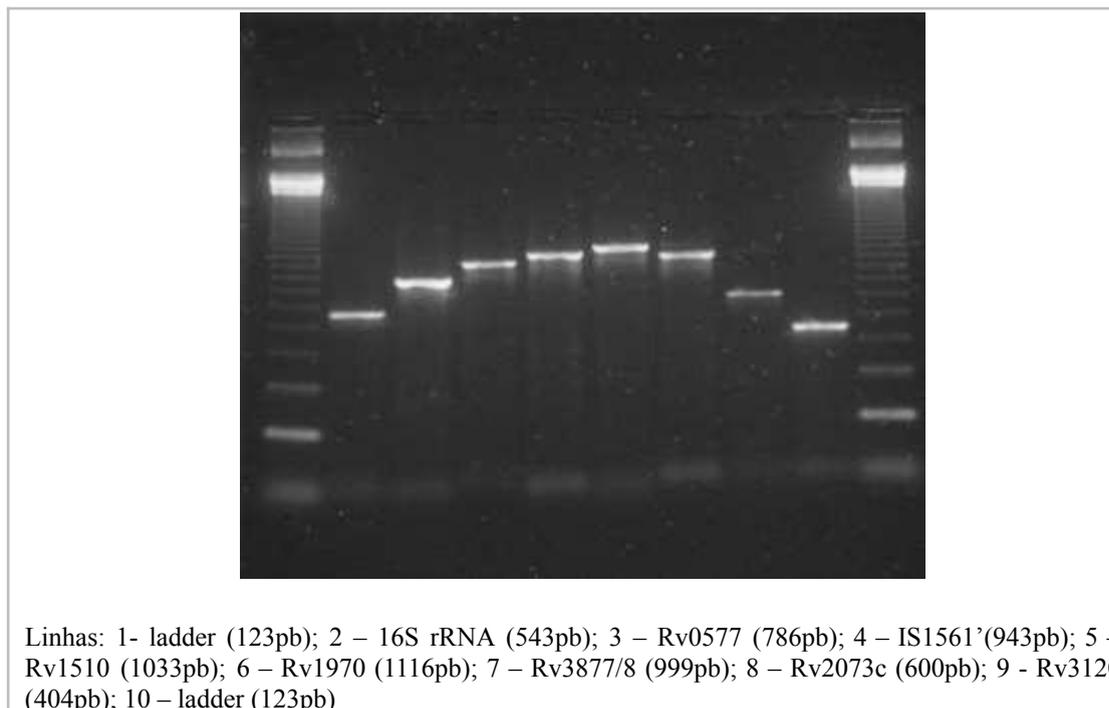
29\* = Cepa referência **H37Rv** utilizada como **padrão** de controle do método. NI = não identificada.

## 5.2 Perfil Eletroforético

Foi elaborado um perfil eletroforético da amostra 6 (43/18), adicionalmente, 19 cepas apresentaram o mesmo perfil sendo amplificadas por todos os pares de primers utilizados (16S rRNA, Rv0577, IS1561', Rv1510, Rv1970, Rv3877/8, Rv2073c e Rv3120), dispostos como na Figura 5.

**Figura 5** – Perfil eletroforético referente a cepa 6 para identificação molecular da espécie *Mycobacterium tuberculosis*.

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|



Neste estudo, apesar de não ser possível identificar todas as cepas de *M. tuberculosis*, esta técnica se mostra reprodutível, de fácil execução, de menor custo e que pode ser implantada em laboratórios com os equipamentos/infraestrutura básicos de biologia molecular (termociclador, sistemas de eletroforese em gel de agarose e foto documentação).

### 5.3 Genotipagem da linhagem Beijing

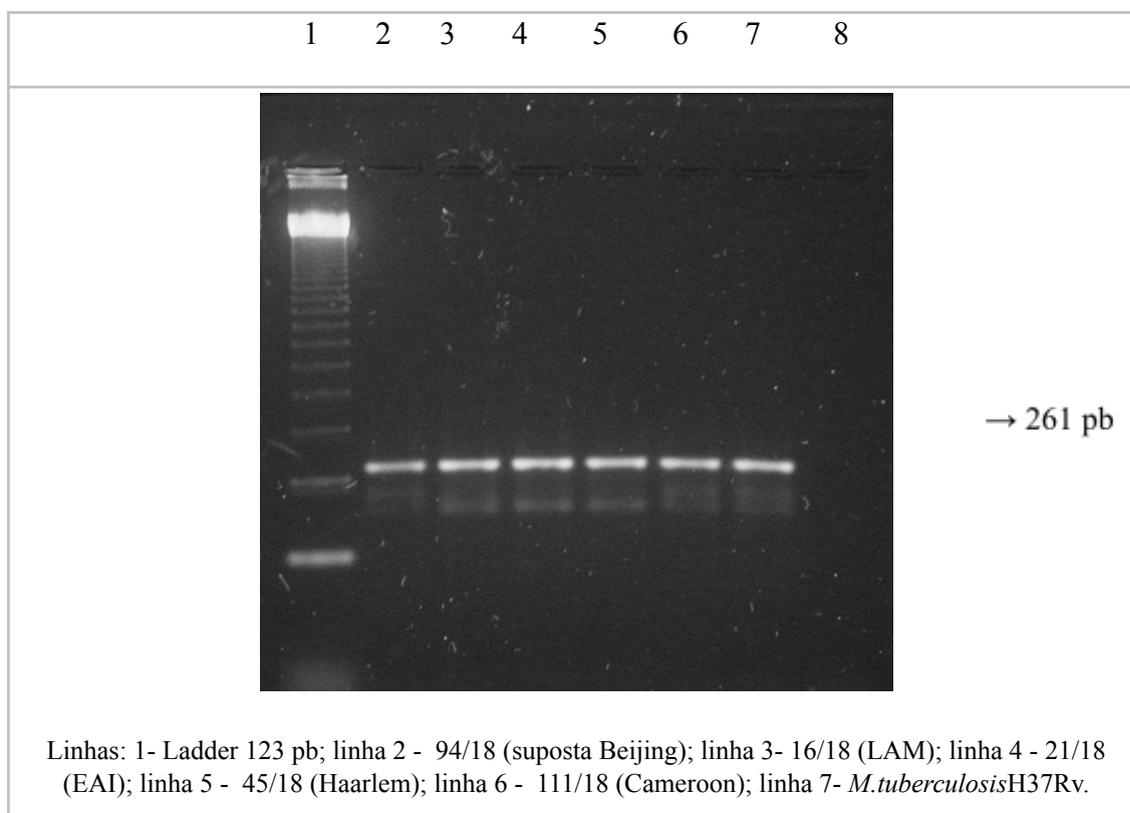
Inicialmente, um teste de especificidade da PCR multiplex para identificação da linhagem Beijing foi realizado com cepas de *M. tuberculosis* de diversas linhagens, essas cepas também eram da coleção e as mesmas (n=29) foram genotipadas no estudo de Garcez (2020, comunicação pessoal), no entanto, a técnica utilizada foi MIRU-VNTR, sendo esta baseada em PCR convencional, que pesquisou a presença de regiões genômicas repetitivas. Pode ser feita a partir de um painel de 12 pares de primers (mínimo), 15 pares ou 24 pares de primers. Esta técnica pode ser feita também a partir de sequenciamento de Sanger. No trabalho de Garcez (2020, comunicação pessoal), foram usados 12 pares de primers, sendo possível detectar várias linhagens de Mtb.

Os resultados daquele estudo indicavam a presença das seguintes linhagens de *M. tuberculosis*: Latin American-Mediterranean (LAM), East-African-Indian (EAI), Haarlem,

Cameroon e, de apenas uma cepa, Beijing. Nos trabalhos de genotipagens realizados anteriormente no Brasil, não há menção da presença do genótipo Beijing no Amazonas, logo, o presente trabalho assim como Garcez (2020, comunicação pessoal) são pioneiros no Amazonas.

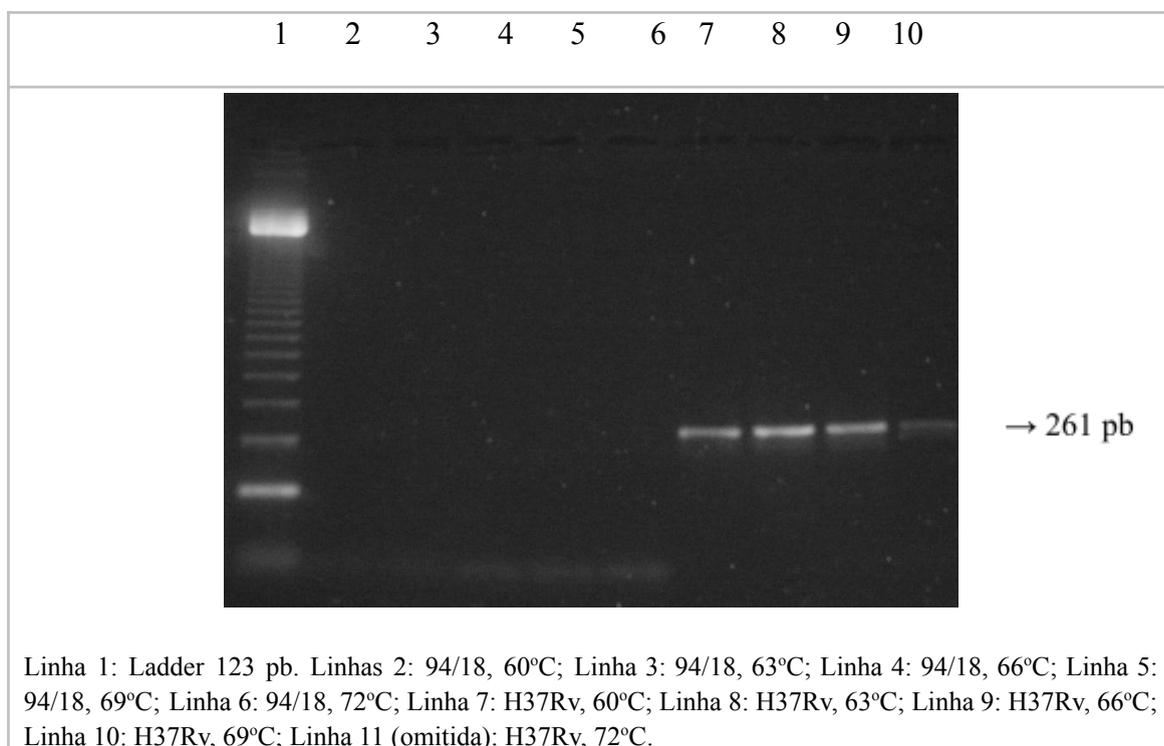
Dessa forma, esperava-se que a cepa 13 (94/18) fosse Beijing, conforme demonstrado em Garcez (2020, comunicação pessoal), e que apresentasse positividade na PCR multiplex para a linhagem Beijing (163 pb). Assim, a cepa 13 (94/18) poderia ser considerada como uma cepa controle positivo para Beijing, para os demais ensaios de PCR multiplex. No entanto, isto não foi evidenciado neste trabalho (Figura 6), já que, todas as linhagens testadas apresentaram o fragmento de 261 pb, caracterizando-as como “não-Beijing”, inclusive a 94/18.

**Figura 6** – Teste de especificidade da PCR Multiplex com diversas linhagens de *M. tuberculosis*.



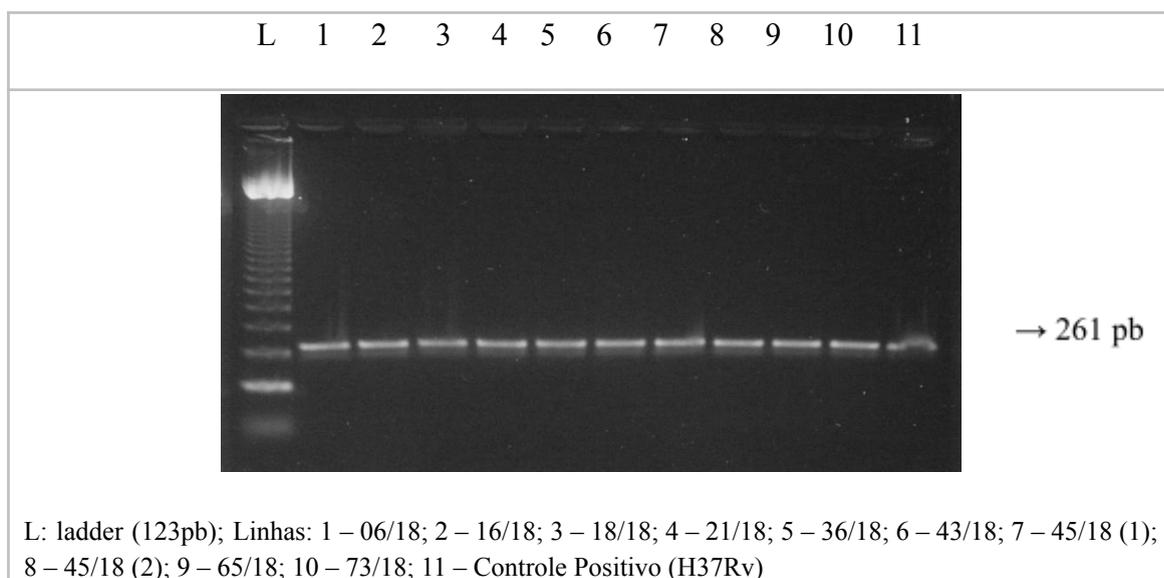
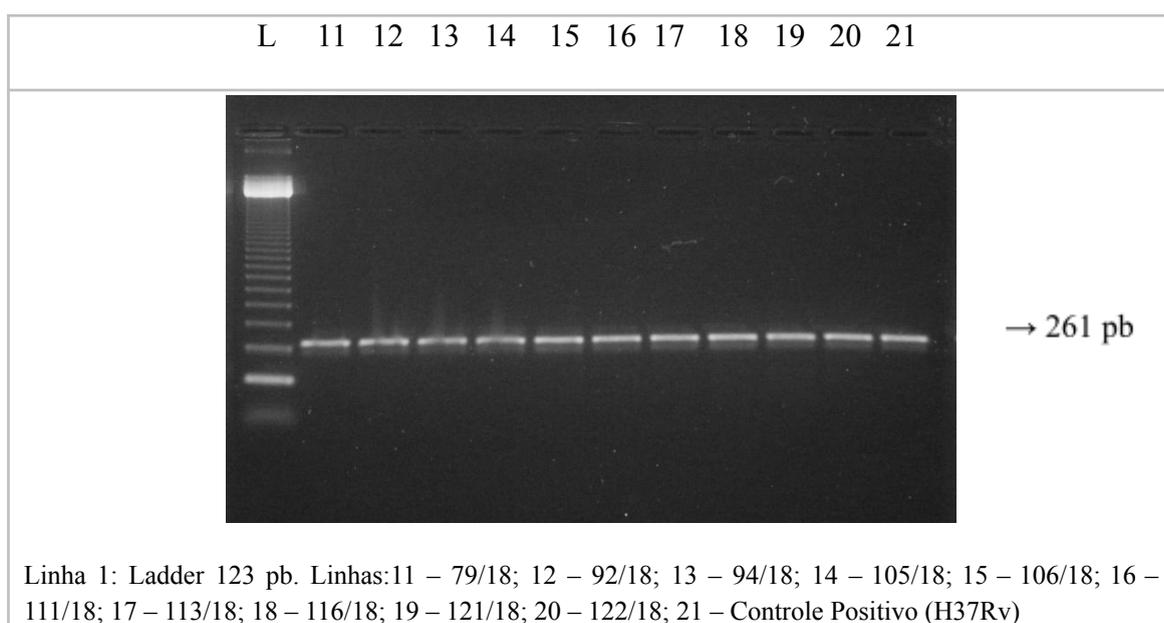
Diante desse resultado, um teste de temperatura de anelamento dos primers foi realizado, com os pares de primers Fw/R1 (Beijing, 163 pb) e Fw/R2 (não-Beijing, 261 pb), em ensaios de PCR independentes (Singleplex) (Figura 7), com as cepas 94/18 (suposta Beijing) e *M. tuberculosis* H37Rv, respectivamente.

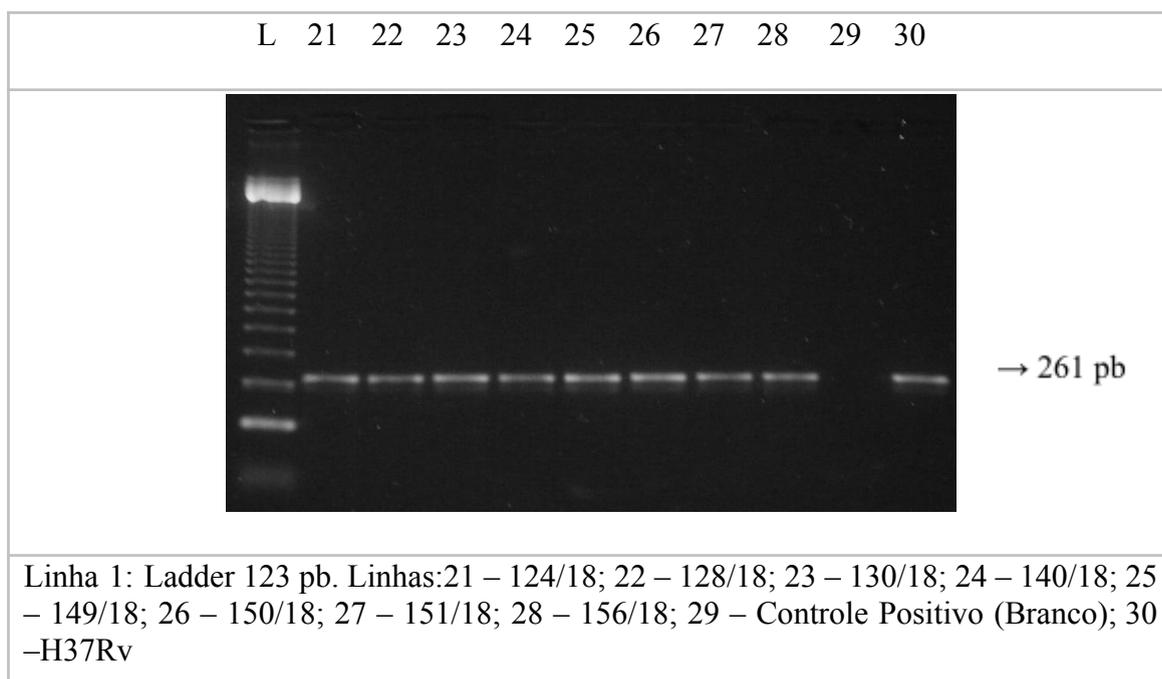
**Figura 7** – PCR singleplex. Teste de anelamento dos primers, cepas 94/18 e *M. tuberculosis* H37Rv.



Este resultado confirma a não amplificação do fragmento de 163 pb, referente a linhagem Beijing. E leva à formulação de duas hipóteses: 1) a cepa 94/18 trata-se de um isolado não- Beijing, cuja tipagem realizada por Garcez (2020) merece ser revisada; 2) a Taq DNA Polimerase utilizada na PCR tem atividade 3' – 5' exonucleásica, que pode retirar o primer R1 hibridizado/anelado da sequência genética (NAKAJIMA *et al.*, 2013). Nesta situação uma cepa Beijing não poderia ser detectada.

Diante da possibilidade de não haver a linhagem Beijing entre as cepas de *M. tuberculosis* analisadas, todas as amostras de DNA foram submetidas à PCR singleplex com os primers Fw/R2 (Figuras 8, 9 e 10).

**Figura 8** – PCR singleplex para amostras 1 - 10**Figura 9** – PCR singleplex para amostras 11 - 20

**Figura 10** – PCR singleplex para amostras 21- 30

Estes resultados indicam que todas as cepas de *M. tuberculosis* analisadas por esta técnica foram caracterizadas como não-Beijing. As genotipagens poderão ser estendidas futuramente para um painel maior de isolados de *M. tuberculosis*, após a observação de particularidades das enzimas Taq DNA Polimerases, de diversos fabricantes, como mencionado por Nakajima *et al.* (2013).

Alguns estudos já relataram a baixa frequência da linhagem Beijing entre os isolados de *M. tuberculosis* circulantes no Brasil, ou seja, menor que 1% (GOMES *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2015). Porém, há relatos da presença do genótipo Beijing em países sul-americanos como Argentina, Paraguai, Chile, Equador, Peru e Colômbia (RITACCO *et al.*, 2008; JIMÉNEZ *et al.*, 2017).

Desta forma, há necessidade de que os estudos epidemiológicos moleculares sejam ampliados a fim de que seja possível observar a real influência da circulação dos vários genótipos de *M. tuberculosis* sobre a endemia da Tuberculose no Brasil.

## 6. CONCLUSÕES

Dentre as espécies do CMtb, somente a espécie *Mycobacterium tuberculosis* foi identificada dentre os isolados analisados (64,3%). A identificação das demais está passível de revisão, porém, com indícios de que sejam *M. tuberculosis*. Este trabalho evidenciou que

não foi observada a presença do genótipo Beijing dentre as cepas de *M. tuberculosis* isoladas no Laboratório de Micobacteriologia do INPA em Manaus – AM e analisadas até o momento, precisa-se de mais estudos relacionados a genotipagem das cepas que estão presentes nessa coleção.

Através da técnica de PCR multiplex na presente pesquisa era possível apenas detectar a linhagem Beijing, e mesmo não havendo detecção, ela pode ser usada para uma triagem inicial por ser mais simples que MIRU-VNTR.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALAVI, Seyed Mohammad; BAKHTIYARINIYA, Pejman; ALBAGI, Ali. Fatores associados ao atraso no diagnóstico e tratamento da tuberculose pulmonar. **Jundishapur Journal Of Microbiology**, v. 8, n. 3, 2015.
- ANDRADE, Elizabeth da Trindade de *et al.* Perspectives of Patients, doctors and medical students at a public University Hospital in Rio de Janeiro **regarding tuberculosis and therapeutic adherence**. 2015.
- BECKER, Bertha. Rede de Inovação da Biodiversidade da Amazônia: 2006. **Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, 2006.
- BHATTACHARYA, Basudev *et al.* Desenvolvimento de uma nova reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, sensível e eficiente, para identificação e diferenciação de diferentes espécies de micobactérias. **Medicina Tropical e Saúde Internacional**, v. 8, n. 2, pág. 150-157, 2003.
- BRASIL, MrdSd. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. **Brasília, DF, Brasil.: Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica**, 2008.
- BRENNAN, Patrick J. Estrutura, função e biogênese da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculose**, v. 83, n. 1-3, pág. 91-97, 2003.
- BROCCOLO, Francesco *et al.* Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4565-4572, 2003.
- CAMPOS, Hisbello S. *et al.* Diagnóstico da tuberculose. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 2, p. 92-99, 2006.
- CRUZ, Heidi Lacerda Alves da *et al.* Evaluation of a nested-PCR for *Mycobacterium tuberculosis* detection in blood and urine samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 321-329, 2011.
- CHENG, Vincent Chi-Chung; YEW, WingWai; YUEN, KwokYung. Molecular diagnostics in tuberculosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 11, p. 711-720, 2005.
- DROBNIEWSKI, Francis *et al.* Revisão sistemática, meta-análise e modelagem econômica de testes de diagnóstico molecular para resistência a antibióticos na tuberculose. **Health Technology Assessment (Winchester, England)**, v. 19, n. 34, pág. 1-viii, 2015.
- DSMZ, (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.
- EREQAT, Suheir *et al.* Pulmonary tuberculosis in the West Bank, Palestinian Authority: molecular diagnostic approach. **Tropical Medicine & International Health**, v. 16, n. 3, p. 360-367, 2011.
- FREITAS, Flávia AD; SIQUEIRA, Hélio R. de. Métodos moleculares no diagnóstico da tuberculose e na resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas. **Pulmão RJ**, p. 96-101, 2009.

- GOMES, Harrison Magdinier *et al.* Espoligotipos de isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes residentes em 11 estados do Brasil. **Infeção, Genética e Evolução**, v. 12, n. 4, pág. 649-656, 2012.
- GOMES, Lia Lima *et al.* Diversidade genética da família *Mycobacterium tuberculosis* Beijing no Brasil e Moçambique e relação com infectividade e indução de necrose em células THP-1. **Tuberculose**, v. 95, p. S190-S196, 2015.
- GOPINATH, K.; SINGH, S. Ensaio de PCR Multiplex para detecção e diferenciação simultâneas de *Mycobacterium tuberculosis*, complexos de *Mycobacterium avium* e outras espécies de *Mycobacterium* diretamente de amostras clínicas. **Jornal de microbiologia aplicada**, v. 107, n. 2, pág. 425-435, 2009.
- GRIFFITH, David E. *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.
- GUPTA, Radhey S.; LO, Brian; FILHO, Jeen. Corrigendum: Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* em um Gênero Emended *Mycobacterium* e Quatro Novos Gêneros. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 714, 2019.
- HANEKOM, M. *et al.* Uma sublinhagem recentemente evoluída da família de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Beijing está associada a uma maior capacidade de se espalhar e causar doenças. **Jornal de microbiologia clínica**, v. 45, n. 5, pág. 1483-1490, 2007.
- HETT, Erik C.; RUBIN, Eric J. Crescimento bacteriano e divisão celular: uma perspectiva micobacteriana. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 1, pág. 126-156, 2008.
- HONG, Xuan; HOPFINGER, A. J. Construction, molecular modeling, and simulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell walls. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 1052-1065, 2004.
- HUARD, Richard C. *et al.* Método baseado em PCR para diferenciar as subespécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* com base em deleções genômicas. **Jornal de microbiologia clínica**, v. 41, n. 4, pág. 1637-1650, 2003.
- JIMÉNEZ, Patricia *et al.* Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage in Ecuador. **Biomedica**, v. 37, n. 2, p. 233-237, 2017.
- KAM, Kai Man *et al.* Utilidade da tipagem de unidade repetitiva intercalada por micobactérias para diferenciar isolados de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes da família Beijing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, pág. 306-313, 2005.
- KADIOGLU, Esra Ekbiç *et al.* Uma comparação de dois métodos de cultura diferentes para uso no diagnóstico de tuberculose pulmonar. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 46, n. 2, pág. 74, 2014.
- KONG, Y. *et al.* Population-based study of deletions in Five different genomic regions of *Mycobacterium tuberculosis* and possible clinical relevance of the deletions. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3940-3946, 2006.
- LAN, Nguyen ThiNgoc *et al.* Genótipo do *Mycobacterium tuberculosis* Beijing e risco de falha e recaída do tratamento, Vietnã. **Doenças infecciosas emergentes**, v. 9, n. 12, pág. 1633, 2003.
- LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Seminar Tuberculosis. **Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57-72, 2011.
- LIMA, Juliana Figueirêdo da Costa *et al.* Desempenho da técnica nested PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 7, p. 690-697, 2009.
- LÓPEZ, Lina María *et al.* Evaluación de medios de cultivo alternativos para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. **Infectio**, v. 5, n. 4, 2011.

MACEDO, Jefferson Soares de; HENRIQUES, Cláudio Maierovitch Pessanha. Infecções pós-operatórias por micobactérias de crescimento rápido no Brasil. **Rev. bras. cir. plást.**, p. 544-551, 2009.

MACIEIRA, Suzana. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. **Noções de Hansenologia. Centro de Estudos “Dr. Reynaldo Quagliato”:** Bauru, 2000.

MERKER, Matthias *et al.* História evolutiva e disseminação global da linhagem do *Mycobacterium tuberculosis* Beijing. **Nature Genetics**, v. 47, n. 3, pág. 242-249, 2015.

MESTRE, Olga *et al.* Filogenia de cepas de Beijing de *Mycobacterium tuberculosis* construídas a partir de polimorfismos em genes envolvidos na replicação, recombinação e reparo do DNA. **PLoSOne**, v. 6, n. 1, pág. e16020, 2011.

MOKROUSOV, Igor *et al.* Origem e dispersão primária do genótipo de Beijing do *Mycobacterium tuberculosis*: pistas da filogeografia humana. **Genome Research**, v. 15, n. 10, pág. 1357-1364, 2005.

MOKROUSOV, Igor *et al.* Detecção rápida do genótipo de Beijing do *Mycobacterium tuberculosis* e suas sub-linhagens antigas e modernas por PCR inverso baseado em IS6110. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, pág. 2851-2856, 2006.

MUWONGE, Adrian *et al.* Uma comparação de ferramentas usadas para diagnóstico de tuberculose em ambientes com recursos limitados: um estudo de caso no hospital de referência de Mubende, Uganda. **PloSone**, v. 9, n. 6, pág. e100720, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE *et al.* **A estratégia para acabar com a TB**. Organização Mundial da Saúde, 2015.

PAIVA, Veronica da Silva; PEREIRA, Marisa; MOREIRA, José da Silva. Perfil epidemiológico da tuberculose pulmonar em Unidade Sanitária de referência em Porto Alegre, RS. **Rev. AMRIGS**, v. 55, n. 2, p. 113-117, 2011.

PEREIRA, Jisleny da Cruz *et al.* Profile and follow-up of patients with tuberculosis in a priority city in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, p. 6, 2015.

PITOMBO, Marcos Bettini; LUPI, Otilia; DUARTE, Rafael Silva. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional?. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 11, p. 529-533, 2009.

PRODANOV, Cleber Cristiano. Metodologia do trabalho científico [recurso eletrônico]: métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico / Cleber Cristiano Prodanov, Ernani Cesar de Freitas. – 2. ed. – Novo Hamburgo: Feevale, 2013.

RITACCO, Viviana *et al.* Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* do genótipo Beijing são raramente observadas em pacientes com tuberculose na América do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, pág. 489-492, 2008.

ROSEMBERG, José; SOBREIRO, M. C. Tabagismo e doenças pulmonares. **TARANTINO, AB; SOBREIRO, MC Doenças pulmonares**, v. 4, p. 189-197, 2002.

SEKAR, B. *et al.* A utilidade da reação em cadeia da polimerase baseada na sequência IS6110 em comparação com os métodos convencionais no diagnóstico da tuberculose extrapulmonar. **Indian Journal Of Medical Microbiology**, v. 26, n. 4, pág. 352-355, 2008.

SILVA, Carla Carolina Alexandrino Vicente da; ANDRADE, Maria Sandra; CARDOSO, Mirian Domingos. Fatores associados ao abandono do tratamento de tuberculose em indivíduos acompanhados em unidades de saúde de referência na cidade do Recife, Estado de Pernambuco, Brasil, entre 2005 e 2010. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 1, p. 77-85, 2013.

WADA, Takayuki; IWAMOTO, Tomotada; MAEDA, Shinji. Diversidade genética da família *Mycobacterium tuberculosis* Beijing no leste da Ásia revelada através de uma análise refinada da estrutura populacional. **Cartas de microbiologia FEMS**, v. 291, n. 1, pág. 35-43, 2009.

WATSON, James D. *et al.* **Biologia molecular do gene**. Artmed Editora, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global diffusion of Health: making universal health coverage achievable: report of the third global survey one Health**. World Health Organization, 2017.