



DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GRUPO *Mycobacterium abscessus* PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DO GENE *erm(41)*

CAMILA DA SILVA MOURA

RESUMO

Atualmente, o Grupo *Mycobacterium abscessus* é dividido em três subespécies: *Mycobacterium abscessus subespécie abscessus*, *Mycobacterium abscessus subespécie massiliense* e *Mycobacterium abscessus subespécie bolletii*. Essas subespécies causam doenças semelhantes e possuem diferenças quanto ao padrão de suscetibilidade aos fármacos e ao tratamento. Surtos de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido têm sido relatados em todo o mundo, geralmente associados a procedimentos médicos. No Brasil, surtos pós-cirurgias foram descritos, a maioria deles associados a espécies do Grupo *Mycobacterium abscessus*. Os macrolídeos, como a claritromicina e a azitromicina, são frequentemente os únicos antibióticos orais ativos contra essas subespécies, entretanto, foram relatados casos de resistência ao tratamento. Dentre os múltiplos mecanismos de resistência, o mais importante é a presença de um gene indutor do metilato de eritromicina (*erm*), em particular o *erm(41)* e o *rrl* no gene 23S rRNA, que conferem à resistência à claritromicina em alto nível. A identificação laboratorial destas micobactérias é rotineiramente realizada por métodos fenotípicos trabalhosos e demorados. Metodologias utilizando ferramentas Moleculares como sequenciamento e hibridização reversa disponíveis comercialmente, são métodos rápidos, no entanto, tem várias limitações e o seu custo ainda é muito alto para serem usadas. Como alternativa aos métodos convencionais e comerciais novas ferramentas rápidas, fáceis de executar e de baixo custo são necessárias. Neste estudo foi utilizada uma ferramenta rápida, a PCR do gene *erm(41)*, 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 diferenciação entre o *Mycobacterium abscessus subsp. boletii* e o *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense*. Os resultados desta metodologia foram comparados com os do sequenciamento do gene *rpoB*, apresentando uma concordância de 100% entre as amostras testadas.

Palavras-chave: MNT; eritromicina metilase ribossômica; PCR.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* é composto por um grupo de patógenos que apresentam características fenotípicas e genotípicas em comum, como *Mycobacterium tuberculosis (TB)*, agente etiológico da tuberculose, *Mycobacterium leprae*, agente causador da lepra ou hanseníase, e, outras espécies de micobactérias são encontradas na natureza, principalmente no solo e na água, são as denominadas micobactérias não causadoras de tuberculosas (MNT) (Raju *et al.*, 2016). As MNT podem ser espécies de crescimento lento (SGM) ou de crescimento rápido (RGM) (Brasil, 2005), ambientais, podendo 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 (Fedrizzi *et al.*, 2017).

Dentre as MNT de crescimento rápido, pode-se destacar o Grupo *Mycobacterium abscessus*, constituído de 3 subespécies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Estudos mostram que 90% das infecções em todo o mundo nas últimas décadas são causadas pelas espécies deste Grupo (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 (Lipworth *et al.*, 2019). Além de surtos causados pelo Grupo *M. abscessus*, no Brasil e no mundo, relacionados principalmente com procedimentos invasivos (Nunes-Costa *et al.*, 2016). Estes, tendo que ser notificados a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), decorrentes de procedimentos invasivos (cirúrgicos ou cosméticos) realizados em serviços de saúde do Brasil, públicos ou privados (Brasil, 2009).

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 medicamento de escolha para infecções pelo Grupo *M. abscessus* e sucessos terapêuticos foram relatados (Griffith *et al.*, 2007).

A suscetibilidade dessas subespécies aos agentes antimicrobianos depende de múltiplos mecanismos de resistência, onde o mais importante é a presença de um gene: eritromicina metilase ribossômica (*erm41*) e o *rrl* no gene 23S rRNA, que estão potencialmente relacionados à resistência à claritromicina (Kusuki *et al.*, 2018).

A identificação das micobactérias é rotineiramente realizada através de métodos baseados na avaliação das características das culturas e realização de testes bioquímicos, que demandam tempo (Rocchetti *et al.*, 2017). Metodologias baseadas em hibridização reversa disponíveis comercialmente, como o GenoType NTM-DR (Hain Diagnostika), possui algumas limitações e seus kits com valores muito elevados para uso na rotina laboratorial (Ramis *et al.*, 2015). O sequenciamento de DNA é considerado o método padrão ouro para a identificação das espécies de micobactérias (Neonakis *et al.*, 2008). No entanto, seu custo ainda é muito alto (João *et al.*, 2014).

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 (Hernandez-Tolosa *et al.*, 2016). A PCR proposta neste estudo foi uma ferramenta rápida, de fácil execução, 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*, podendo ser aplicada nas rotinas laboratoriais de identificação de micobactérias.

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 Grupo *M. abscessus* tipo II pelo PRA-*hsp65* e posteriormente discriminados pelo sequenciamento do gene *rpoB*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo analítico experimental que teve por base a utilização de 100 amostras 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. A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo (Campos *et al.*, 2012).

O PCR-PRA (*hsp65*) baseia-se na amplificação do fragmento de 440 pares de base (pb), do gene *hsp65*, que codifica uma proteína que é sintetizada em situações de stress térmico (do

inglês *heat shock protein*) (Chimara *et al.*, 2008), seguida da análise de restrição enzimática do produto amplificado com as enzimas *BstEII* e *HAE III*. Os produtos da digestão (amplicons) pelas duas enzimas, são subseqüentemente analisados por electroforese em gel e comparados com padrões conhecidos disponíveis na internet: PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>) (Verma *et al.*, 2015).

O Sequenciamento do gene *rpoB*, foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Adekambi *et 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 seqüências 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 seqüências obtidas com as seqüências 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 $MgCl_2$ (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) *erm41 f* (5'-GACCGGGGCCTTCTTCGTGAT-3') e *erm41 r* (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 ThermalCycler), 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, 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 (cepa de *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.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

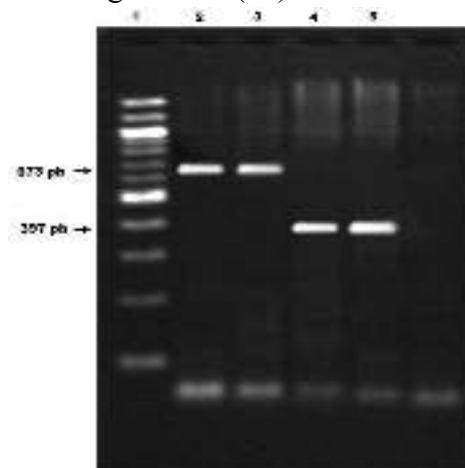
Resultado do *PRA-hsp65* – as micobactérias testadas apresentaram perfil de bandas de 240 e 210 pb, para a enzima *BstEII* e 200, 70 e 60 pb, para a enzima *HaellI*, utilizando como base um marcador de peso molecular (Ladder) de 50 pb. A combinação do resultado da digestão por estas enzimas, ao ser comparado com padrões conhecidos através do site PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>), foram então classificadas como Grupo *M. abscessus* tipo 2.

Resultado do sequenciamento do gene *rpoB*- a partir da determinação da ordem das bases nitrogena, 50 amostras apresentaram similaridade de 98% à 100% com a seqüência de *M. abscessus subsp. bolletii* (CIP108541) e 50 amostras apresentaram similaridade de 98% à 100% com a seqüência de *M. abscessus subsp. massiliense* (CIP108297), através da análise do GenBank.

Resultado da PCR do gene *erm (41)* - Todas apresentaram padrão de bandas esperado com a amplificação dos seus respectivos alvos. As amostras contendo aproximadamente 673 pb no gel de agarose, foram identificadas como *M. abscessus subsp. bolletii* e as contendo aproximadamente 397 pb como *M. abscessus subsp. massiliense*, comparando-se os resultados obtidos, tendo como base o Ladder utilizado com 100 pb e o tamanho dos fragmentos dos produtos de amplificação das cepas de referência como (controle positivo), e um controle negativo (água ultrapura), que não há aparecimento de banda (Figura 01).

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* (padrão ouro).

Figura 01- Resultado da PCR do gene *erm* (41)



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 1, este, representa total concordância e os valores próximos e/ou abaixo de 0, indicam nenhuma concordância. O resultado deste estudo apresentou um grau de concordância igual a 1.

Estudos conduzidos por Carvalho *et al.* (2017) avaliaram uma PCR semelhante a do presente estudo e os resultados foram confirmados também pela técnica padrão-ouro, porém foi utilizado um número pequeno de amostras (30 amostras). 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* (subespécie rara 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*, utilizadas como base para esta pesquisa, visando que no Brasil existem poucos estudos experimentais sobre este grupo de micobactérias. O presente estudo mostrou que a PCR utilizada foi capaz de diferenciar os membros do Grupo *M. abscessus*, a que se propôs, com uma boa concordância estatisticamente.

4 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 o *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* e o *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.

REFERÊNCIAS

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.

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.

CARVALHO, *et al.* 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., *et al.* MATSUSHIMA S. First isolation of *Mycobacterium kyorinense* from clinical specimens in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**; 50:2477–2478, 2012.

CHIMARA, E., *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.

FEDRIZZI, T., *et al.* Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. **Scientific Reports**.;7: 45258, 2017.

GRIFFITH, D. E., *et al.* 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.

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.

KUSUKI. M., *et al.* 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.

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

MASE, A., *et al.* "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.

NEONAKIS, I. K., *et al.* Molecular Diagnostic Tools in Mycobacteriology. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, p.1–11, 2008.

NESSAR, R., *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.

ROCCHETTI, T. T., *et al.* Detection of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* Group, and *Mycobacterium fortuitum* Complex by a Multiplex Real-Time PCR Directly from Clinical Samples Using the BD MAX System. **Journal of Molecular Diagnostics**; 19 (2); 295-302, 2017.

TORTOLI, E., *et al.* 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., *et al.* 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., *et al.* 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.