

## Análise de custo da identificação molecular de micobactérias pela técnica de PCR – Restriction Enzyme Analysis (PRA)

Lucas Hidenori OKAMURA<sup>1</sup>; Julia Ignez SALEM<sup>2</sup>; Mauricio Morishi OGUSKU<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC INPA/FAPEAM; <sup>2</sup>Colaboradora INPA/CPCS; <sup>3</sup>Orientador INPA/CPCS.

O gênero *Mycobacterium* é constituído por 137 espécies e subespécies oficialmente reconhecidas (DSMZ, 2007). As principais espécies são o *M. tuberculosis*, o *M. africanum* (agentes etiológicos da Tuberculose, identificados após o isolamento em meio de cultivo) e o *M. leprae*, apenas visualizado em amostras clínicas de pacientes com Hanseníase. As demais espécies do gênero são isoladas tanto do homem (Salem *et al.*, 1989a; Salem *et al.*, 1989b) como do meio ambiente (águas, solos, poeiras e materiais vegetais) e/ou de animais. Estes conhecimentos induziram a proposta de Collins *et al.* (1997) em denominar essas micobactérias de "Micobactérias Ambientais" (Environmental Mycobacteria – EM). Entretanto, no Brasil, predomina o uso da denominação "Micobactérias não Tuberculosas" (MNT). Quando a MNT é responsável por doença no homem, esta é denominada de Micobacteriose, independente da espécie micobacteriana (David, 1976). A Micobacteriose por não ser transmissível, não é de notificação obrigatória perante o Ministério da Saúde, o que faz com que não se conheça a real incidência dessa patologia no Brasil. Entretanto, acredita-se que tendem a aumentar proporcionalmente ao incremento dos processos e patologias imunossupressoras, associadas ou não a Aids. Para esse grupo de pacientes é fundamental que a espécie micobacteriana seja identificada devido à heterogeneidade de resistência aos medicamentos. Atualmente as MNT podem ser identificadas por técnicas tradicionais de fenotipagem e/ou por técnicas moleculares. Em um laboratório de referência em micobactérias, para fenotipagem, são realizadas em torno de 25 diferentes provas bioquímicas, incluindo seis testes de características de crescimento e produção de pigmentos. A execução desses testes requer um tempo médio de 30 dias. Além disso, é necessário que o laboratório possua grande área física, suporte econômico e equipe técnica de pelo menos oito profissionais. Isso torna inviável a identificação fenotípica por laboratórios de pequeno e médio porte (Vega, 2005), tais como o Laboratório de Micobacteriologia do INPA. Na identificação molecular destaca-se a técnica de PRA (PCR - Restriction Enzyme Analysis) (Silva *et al.*, 2001). Este método consiste na amplificação de DNA com iniciadores específicos para uma seqüência de 441 pares de bases do gene *hsp65*. Posteriormente, o produto da PCR é clivado com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*. Após a clivagem, os produtos de restrição são submetidos à eletroforese em gel de agarose a 4% e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV). Para a identificação das micobactérias, os perfis de restrição obtidos são comparados aos padrões já existentes. Visando a possibilidade de implantação da técnica molecular na rotina do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, foi objetivo desse estudo a análise do custo e tempo necessários para a identificação de cepas de MNT pela técnica de PRA. Para análise de custo desta técnica foram solicitadas cotações dos reagentes e materiais plásticos descartáveis e, considerados os de menores custos, porém sem desprezar a qualidade dos mesmos necessários para a realização dos ensaios. No presente estudo, não foi incluído o custo dos equipamentos, pois os mesmos já fazem parte do patrimônio do INPA, sendo desnecessárias novas aquisições. Apesar de não ser objetivo desse estudo foi estabelecido também o custo da identificação fenotípica da MNT para comparação em relação à técnica de PRA. Para análise do tempo foi considerado o necessário para a realização de cada etapa: extração de DNA, amplificação de DNA (PCR), eletroforese 1%, digestão dos produtos de PCR e eletroforese 4%. Quarenta e seis cepas micobacterianas foram submetidas à identificação pela técnica de PRA juntamente com os testes de velocidade de crescimento e produção de pigmento. Foram identificadas: 12 (26%) cepas de *M. fortuitum*, 5 (10,8%) *M. avium*, 4 (8,7%) *M. gordonae*, 3 (6,5%) *M. lentiflavum*, 2 (4,4%) *M. simiae*, 2 (4,4%) *M. intracellulare*, 1 (2,2%) *M. farcinogenes*, 1 (2,2%) *M. genavense*, 1 (2,2%) *M. kansasii*, 1 (2,2%) *M. phlei*, 1 (2,2%) *M. szulgai* e 1 (2,2%) *M. terrae* (Figura). Em 12 casos (26%), as MNT não puderam ser identificadas, pois apresentaram perfis de restrição diferentes daqueles descritos na literatura. O custo da identificação pela técnica de PRA foi de R\$ 28,76/cepa. Na fenotipagem, para um total de 13 testes bioquímicos necessários para a identificação das principais espécies de micobactérias de importância clínica, o custo calculado foi de R\$ 106,73/cepa. O custo da técnica de PRA foi semelhante ao relatado por Mondragón-Barreto *et al.* (2000), R\$ 25,48/cepa. Em outro estudo, Prammananan *et al.* (2005) definiram o custo em R\$ 4,11/cepa. Porém, nestes estudos não foram mencionados especificamente quais itens (materiais, reagentes ou salário) compuseram o custo da identificação molecular. Em nosso estudo o tempo necessário para a realização da técnica de PRA foi estimado separadamente para cada etapa: Extração de DNA (2:00h), Protocolo de PCR (3:30min), Eletroforese 1% (1:30min), Protocolo de digestão (4:00h) e Eletroforese 4% (5:00h), totalizando 16 horas de trabalho. Estes resultados indicam o menor custo da técnica de PRA em relação à fenotipagem para identificação das espécies de MNT. Vale ressaltar que, independente do custo, um fator importante para os pacientes suspeitos de Micobacterioses é a abreviação do tempo para conclusão diagnóstica, o que pode ser obtido com a identificação molecular. A técnica de PRA em combinação com os



parâmetros de velocidade de crescimento e produção de pigmento foi suficiente para identificar aproximadamente 75% das MNT analisadas no presente trabalho. Isso evidencia melhor custo-benefício, o que favorece a sua implantação no Laboratório de Micobacteriologia do INPA. A inclusão de mais provas bioquímicas, bem como a realização de estudos adicionais de seqüenciamento de DNA do gene *hsp65* ou da região 16S rRNA nas cepas de MNT não identificadas, poderão auxiliar na definição de novos padrões de restrição para as MNT ou demonstrar a presença em nossa região de espécies ainda não descritas.

Obs.: R\$ 1,00 = US\$ 0,51 (Cotação em 21 de junho de 2007).

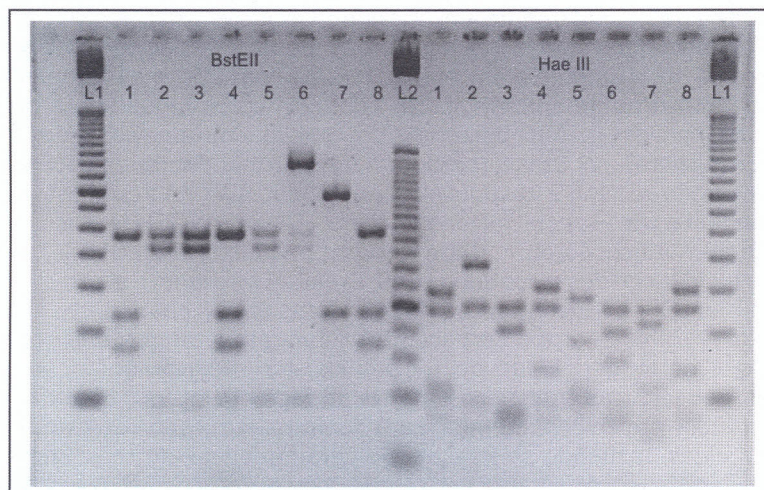


Figura - Eletroforese em gel de agarose 4% do perfil de restrição de espécies micobacterianas após digestão de fragmentos de DNA (*hsp65*) com enzimas *BstEII* e *HaeIII*. L1 - Ladder 50 pares de bases; L2 - Ladder 25 pares de bases; 1 - *M. fortuitum* 2; 2 - *M. simiae* 1; 3 - *M. goodii* 5; 4 - PNI\*; 5 - *M. phlei* 1; 6 - *M. kansasii*; 7 - *M. genavense* 1; 8 - PNI\*.

\*PNI = Perfil de restrição não identificado.

**Palavras-chave** :Custo; Micobactérias Não Tuberculosas (MNT); PCR-Restriction Enzyme Analysis (PRA); Método diagnóstico.

#### Bibliografias citadas

- Collins, C. H.; Grange, J. M.; Yates, M. D. 1997. *Tuberculosis bacteriology: organization and practice*. 2. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann. 139p.
- David, H. L. 1976. *Bacteriology of the Mycobacterioses*. U.S. Department of Health, Education, and Welfare (CDC). Atlanta, Georgia, USA. 166p.
- DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Bacterial Nomenclature up-to-date: approved lists, validation lists. Braunschweig, Germany, 2007.
- Mondragón-Barreto, M.; Vázquez-Chacón, C.A.; Barrón-Rivero, C.; Acosta-Blanco, P.; Jost, K.C.; Balandrano, S.; Oliveira-Díaz, H. Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Publica Mex*, 42(6):486-9
- Prammananan, T.; Cheunoy, W.; Na-Ubol, P.; Tinqtoy, N.; Srimuanq, S.; Chaiprasert, A. Evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis for routine identification of mycobacteria: accuracy, rapidity, and cost analysis. *Southeast Asia J Trop Med Public Health*, 36(5):1252-60.
- Salem, J.I.; Filho P.G.; Lévy-Frébault, V.; Davis, H. 1989a. Isolation and Characterization of Mycobacteria Colonizing the Healthy Skin. *Acta Leprologica*, 7(1):18-30
- Salem, J.I.; Marója M.F. 1989b. Mycobacteria other than tubercle bacilli in sputum specimens from patients in Manaus. *Acta Amazonica*, 19:349-354
- Silva, C.F.; Ueki, S.Y.M; Geiger, D.C.P; Leão, S.C. 2001. *hsp65* PCR-Restriction Enzyme Analysis (PRA) for identification of Mycobacteria in the clinical laboratory. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 43(1):25-28.
- Vega, F.A.F.; Moreno, J.E.; Martin, J.G.; Gutiérrez, J.J.P. 2005. *Procedimientos em Microbiologia Clínica - Micobactérias*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica, Espanha. 89p.