

Identificación genotípica de miembros del complejo *Mycobacterium avium* aislados de infecciones pulmonares en el Estado de Pará, Brasil

Identificação genotípica de membros do complexo *Mycobacterium avium* isolados de infecções pulmonares no Estado do Pará, Brasil

Genotypic identification of members of the *Mycobacterium avium* complex isolated from pulmonary infections in Pará State, Brazil

Ana Roberta Fusco da Costa
Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS,
Ananindeua, Pará, Brasil

Emilyn da Costa Conceição
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil
Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Maria Luíza Lopes
Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS,
Ananindeua, Pará, Brasil

Karla Valéria Batista Lima
Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS,
Ananindeua, Pará, Brasil

Jeann Ricardo da Costa Bahia
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil
Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El complejo *Mycobacterium avium* (MAC) comprende micobacterias de crecimiento lento, naturalmente encontradas en el medio ambiente, capaces de causar infecciones en diversas especies de seres vivos, incluyendo aves, porcinos y humanos. Tales infecciones pueden ser asintomáticas, clínicamente significantes y, en algunos casos, fatales. Sin embargo, existe la necesidad de poner a disposición técnicas que ofrezcan una identificación conclusiva de bacterias estrechamente relacionadas. Las técnicas de biología molecular se presentan como herramientas prometedoras para una identificación más precisa. **MATERIALES Y MÉTODOS:** En este trabajo fueron evaluados los marcadores moleculares RNAr 16S, *hsp65* y *rpoB* aplicados a la distinción de miembros del MAC, aislados en el Laboratorio de Micobacterias del Instituto Evandro Chagas. **RESULTADOS:** Muestras del MAC colectadas en 15 pacientes fueron previamente evaluadas por el método de análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción del gen *hsp65* (PRA-*hsp65*), que suministró tres perfiles diferentes: (I) *BstEII*: 235/115/100, *HaeIII*: 145/130/60; (II) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 130/105; y (III) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 145/130. Se construyeron árboles filogenéticos luego del análisis del RNAr 16S, en el que las muestras fueron distribuidas en dos grupos, semejante al encontrado en el análisis de *hsp65*. Sin embargo, los resultados del *rpoB* fueron discordantes de los otros árboles, debido a la modificación de la topología. **CONCLUSIÓN:** Los hallazgos de este estudio sugieren que distintas fuerzas evolutivas pueden estar actuando sobre el gen *rpoB*, y así, es necesario tener precaución al establecer esa meta para fines taxonómicos. Adicionalmente, se recomienda que más de un marcador, incluyendo el RNAr 16S, sea evaluado para la identificación micobacteriana.

Palabras clave: Complejo *Mycobacterium avium*; Polimorfismo de Longitud del Fragmento de Restricción; Análisis de Secuencia de ADN; Filogenia.

Correspondencia / Correspondência / Correspondence:

Ana Roberta Fusco da Costa
Instituto Evandro Chagas, Seção de Bacteriologia e Micologia,
Laboratório de Biologia Molecular
Rodovia BR 316, km 7, s/n°. Bairro: Levilândia
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
E-mail: anacosta@iec.pa.gov.br / robertafusco@gmail.com
Tel./Fax: +55 (91) 3214-2116 / +55 (91) 3214-2129

Traducido por / Traduzido por / Translated by:

Lota Moncada

INTRODUCTION

El complejo *Mycobacterium avium* (MAC), junto con otras especies mico bacterianas atípicas, denominadas de micobacterias no tuberculosas (MNT), comprende micobacterias de crecimiento lento, naturalmente encontradas en el medio ambiente¹, capaces de causar infecciones en diversas especies de seres vivos, incluyendo aves, porcinos y humanos, pudiendo presentarse como asintomáticas, clínicamente significantes y, en algunos casos, fatales². Este complejo está constituido por las especies *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. colombiense* y *M. chimaera*^{3,1}.

El MAC representa un importante grupo de micobacterias asociado a varias patologías humanas, especialmente a las infecciones diseminadas en pacientes con SIDA⁴. Además de esas, recientes evidencias sugieren que la tasa de infección en pacientes inmunocompetentes esté en elevación en los EUA^{5,6,7}.

Varias metodologías se aplican a la diferenciación de miembros del MAC, entre las que están incluidas la seroaglutinación⁸. La hibridación ADN-ARNr con sondas comerciales (Accuprobe; GenProbe), el análisis del polimorfismo de restricción del gen *hsp65* (65-kDa heat shock protein)⁹, el análisis de ITS (16S-23S rADN internal transcribed spacer)¹⁰, el ARNr 16S (ARN ribosómico 16S)¹¹, el *hsp65*¹² y, recientemente, la región V del gen *rpoB* (subunidad beta del ARN polimerasa)¹³. Este último blanco fue propuesto como alternativa para identificación de MAC en una única etapa¹⁴, pero hay pocos estudios utilizando ese marcador.

Así, el objetivo del presente estudio es evaluar la aplicación de este marcador, bien como el ARNr 16S y *hsp65*, para distinguir especies miembros del MAC aisladas en el Laboratorio de Micobacterias de la Sección de Bacteriología y Micología (SABMI) del Instituto Evandro Chagas (IEC), contribuyendo de esta forma para el perfeccionamiento de la identificación de este grupo de micobacterias, todavía poco conocido en la Región Amazónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

CASUÍSTICA

Se trata de un estudio retrospectivo de identificación de 60 muestras del MAC aisladas de especímenes clínicos pulmonares provenientes de 15 pacientes de las ciudades de Belém, Ananindeua, Parauapebas y Marabá, Estado de Pará. Las muestras fueron aisladas en el Laboratorio de Referencia Regional de Micobacterias, SABMI/IEC, en el período de enero de 2004 a diciembre de 2007. La infección por MNT se definió según los criterios de la *American Thoracic Society*¹⁵ y el Ministerio de Salud¹⁶, que consideraron de importancia bacteriológica las MNT de origen pulmonar aisladas por lo menos dos veces consecutivas de esputo o lavado broncoalveolar. Fueron excluidos los pacientes con más de una especie de micobacteria aislada de los especímenes clínicos.

El proyecto que dio origen a este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación con Seres Humanos

del IEC, bajo el parecer n° 0010/2008, CAAE: 0001.0.072.073-08.

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Cultivo micobacteriano

Todas las muestras fueron procesadas en cabina de seguridad biológica clase II B2, en la SABMI/IEC, en el período de enero de 2004 a diciembre de 2007.

Los especímenes clínicos fueron sembrados en medio sólido Löwenstein-Jensen (LJ-Difco, São Paulo, Brasil) e incubados a 35-37° C en ausencia de luz. La distinción presuntiva entre especies del complejo *M. tuberculosis* y MNT se obtuvo por medio del análisis macro y microscópico del cultivo, investigación del factor corda y test de inhibición de crecimiento en medio LJ conteniendo 0,5 mg/mL de ácido paranitrobenzoico (MP Biomedicals, Solon, EUA)¹⁶. Todos los cultivos con características sugestivas de MNT fueron sometidas a identificación molecular.

Extracción del ADN

Dos cultivos de crecimiento micobacteriano en medio sólido fueron suspendidas en 300 L de agua MilliQ estéril. Esa suspensión se transfirió a microtubos conteniendo 600 L de tampón de lisis (Tris HCl pH 9,0 300 mM, EDTA 100 mM, sucrose 4,8%, SDS 1,25%), 600 L de solución homogeneizadora (Tris HCl pH8 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA pH8 10 mM, sucrose 5%), 15 L de proteinasa K (20 mg/mL) y incubada en 56° C por 12 h. Los detritos celulares se removieron con 600 L de solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 (Invitrogen, São Paulo, Brasil). El DNA fue precipitado con 100 L de acetato de sodio 3M, pH 4,8 (Sigma, São Paulo, Brasil) y 500 L centrifugado a 13.000 rpm por 10 min y tratado con 500 L de etanol 70% (Merck, Steinheim, Alemanha). Luego de la centrifugación a 13.000 rpm (16.845 xg), a 4° C, el alcohol se removió por evaporación y el ADN precipitado se resuspendió en 100 L de tampón TE 1x (Tris HCl pH8 10 mM, EDTA pH8 1 mM). La concentración de la solución de ADN se determina usando el Kit Qubit Fluorometer (Invitrogen, São Paulo, Brasil), según las recomendaciones del fabricante.

Identificación genotípica

Las muestras fueron identificadas inicialmente por el método de PRA-*hsp65*, según el cual una secuencia de 441 pb fue amplificada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir del gen objetivo *hsp65*, utilizando los primers TB11 (5' ACCAACGATG GTGTGTCAT 3') y TB12 (5' CTTGTCGAACCGCATACC CT 3')⁹. Los productos de PCR fueron digeridos separadamente con 10 U de las enzimas *BstEII* (New England Biolabs, Ipswich, EUA) y *HaeIII* (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Los fragmentos así obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida 8% (Biosolve LTD, Valkenswaard, Holanda) conteniendo marcadores de peso molecular de 25 pb y 50 pb (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Posteriormente, una muestra de cada uno de los 15 pacientes fue sometida a la secuenciación de los genes ARNr 16S (RNAF/RNAR),

hsp65 (HSPF3/HSPR4) y *rpoB* (MycF/MycR), de acuerdo a condiciones previamente descritas^{13,17,18}.

Luego de la verificación de los productos de la PCR en gel de agarosa Seakem LE 1% (Cambrex, Rockland, EUA), estos fueron purificados usando el sistema de purificación S.N.A.P.TM *Gel Purification Kit* (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Los productos amplificados fueron secuenciados directamente con los *primers forward* y *reverse* usando el sistema *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) y purificados con *BigDye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), conforme las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, fueron sometidos al analizador genético ABI3130 (Applied Biosystems, Tokio, Japón).

Análisis

Los perfiles de PRA fueron analizados por simple comparación visual con los marcadores de peso molecular, siendo interpretados con algoritmos publicados^{19,20,21,16} y PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). Las secuencias de nucleótidos obtenidas para RNAr 16S, *hsp65* y *rpoB* fueron alineadas con secuencias de especies relacionadas depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) usando el algoritmo de múltiple alineamiento en el programa BioEdit (versión 7.0.9; Tom Hall [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). Los árboles filogenéticos se construyeron usando el método de *neighbor-joining*, con el modelo de corrección Kimura-2-parámetros en el programa MEGA (versión 4.0; Tamura, Dudley, Nei and Kumar [<http://www.megasoftware.net/>]). El análisis de *bootstrap* con mil repeticiones se realizó tomando *M. fortuitum* ATCC 13756 como grupo externo. Las secuencias del GenBank utilizadas para comparaciones comprendieron: *M. avium* subsp. *avium* (ARNr 16S: EF521895, *hsp65*: AF547808, *rpoB*: EF521907), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (ARNr 16S: EF521896, *hsp65*: AF547809, *rpoB*: EF521906), *M. avium* subsp. *silvaticum* (ARNr 16S: EF521891, *hsp65*: AF547810, *rpoB*: EF521905), *M. avium* subsp. *hominissuis* (ARNr 16S: EF521892, *hsp65*: EU239782, *rpoB*: EF521911), *M. intracellulare* (ARNr 16S: X52927, *hsp65*: EU239784, *rpoB*: EF521909), *M. chimaera* (ARNr 16S: EF521894, *hsp65*: EU239783, *rpoB*: EF521908) y *M. colombiense* (ARNr 16S: AM062764, *hsp65*: EU239785, *rpoB*: EF521910).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN POR PRA-*hsp65*

El PRA-*hsp65* realizado en las muestras de MAC se caracterizó en tres diferentes perfiles alélicos asociados a las especies *M. intracellulare* y *M. avium* (Tabla 1).

ANÁLISIS DE LA SECUENCIACIÓN DEL ARNr 16S, *hsp65* y *rpoB*

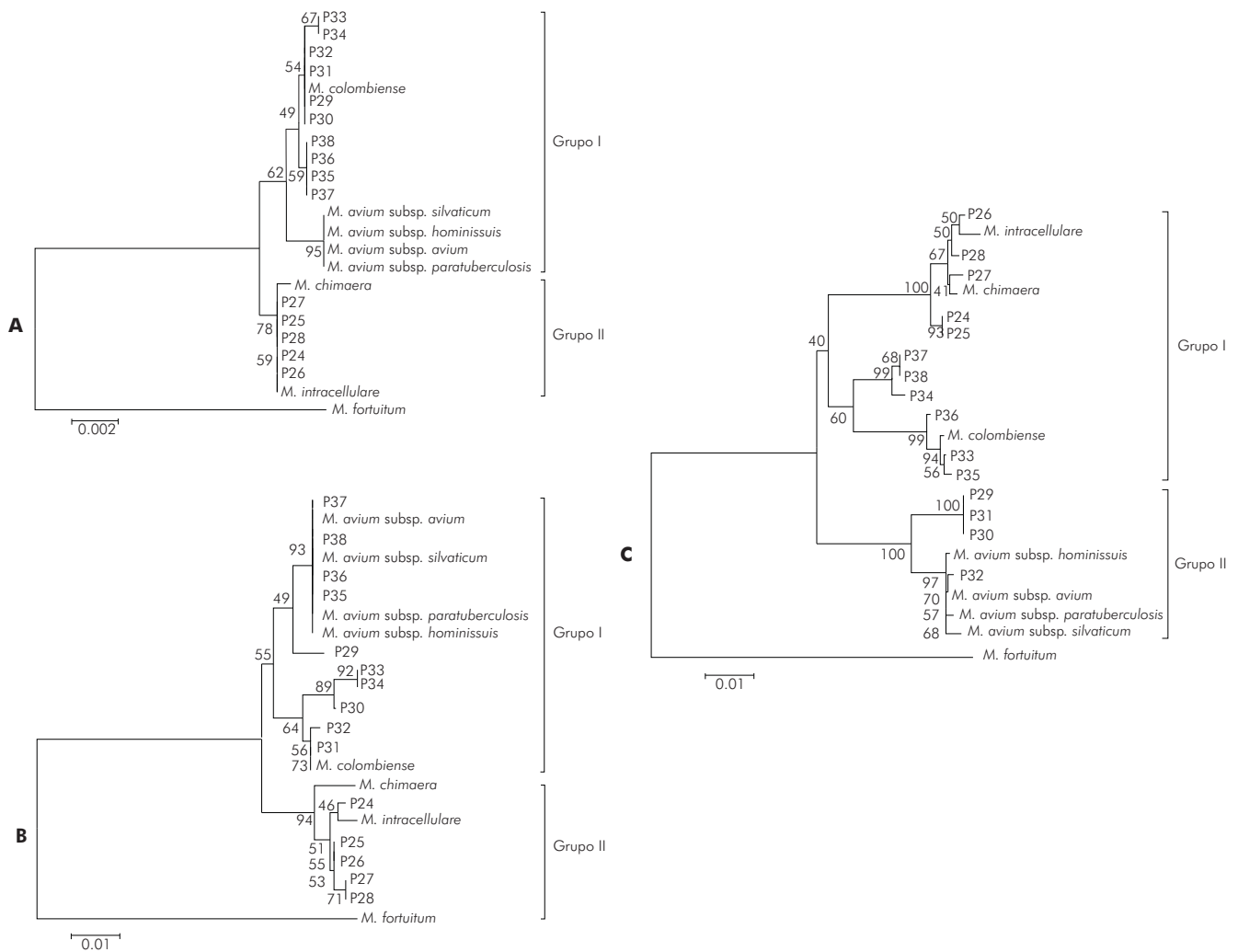
Las muestras presentaron cinco genotipos distribuidos en dos grupos, cuyos valores de similitud variaron de 98,3% a 100% con secuencias del ARNr 16S de cepas de MAC disponibles en el GenBank. A pesar de las subespecies de *M. avium* no ser diferenciadas entre sí, ellas exhibieron divergencias de 2,1% con *M. chimaera*, 1,7% con *M. intracellulare* y 0,9% con *M. colombiense*. Las muestras presentaron cinco genotipos distribuidos en dos grupos, cuyos valores de *bootstrap* indicaban bajo poder discriminatorio para este marcador. El grupo I presentó secuencias de taxones relacionados a la especie *M. avium*, que estaban subdivididos en tres subgrupos, de los cuales apenas uno fue sostenido por valor de *bootstrap* de 95%, comprendiendo los con subespecies de *M. avium* obtenidas del GenBank. La diversidad nucleotídica para este subgrupo con relación a las muestras aisladas de especímenes clínicos de este estudio se atribuye a las sustituciones en las posiciones 154 (C T), 155 (A T) e 169 (C T). El grupo II comprendió muestras estrechamente relacionadas al *M. intracellulare* y al *M. chimaera*, compartiendo similitudes de 99,5% a 100% (Figura 1A).

En el análisis de las secuencias del *hsp65* de las muestras clínicas se observaron nueve genotipos con similitudes de 97% a 100%. Las similitudes entre las muestras y las cepas de referencia se presentan en la tabla 2. Los taxones fueron distribuidos en dos grupos, siendo el grupo I dividido en un subgrupo con *M. avium* sp., cuyo valor de *bootstrap* fue de 93%, y otro con muestras relacionadas al *M. colombiense*. El grupo II presentó muestras relacionadas al *M. intracellulare* y *M. chimaera*, resultado semejante al obtenido en el análisis de ARNr 16S (Figura 1B).

En el análisis del gen *rpoB*, se verificó similitud de 95% a 100% entre las muestras, con divergencias de 0,2% – 0,3% entre las subespecies *M. avium* y la clara distinción de *M. avium* de los demás miembros del MAC (Tabla 2). Sin embargo, se observó cambio en la topología de los aislados, comparada con la obtenida para ARNr 16S y *hsp65*, siendo que muestras antes filogenéticamente relacionadas al *M. colombiense* fueron agrupadas con *M. avium* (P30 – P32) y viceversa (P35 – P38). Un hallazgo importante fue la modificación en los agrupamientos: el grupo I fue formado por *M. intracellulare* con especies relacionadas y *M. colombiense*, y el grupo II por subespecies de *M. avium* (Figura 1C). Se encontraron 11 genotipos en el análisis de ese objetivo molecular.

Tabla 1 – Perfiles alélicos obtenidos por PRA-*hsp65* para miembros del MAC aislados en el IEC entre 2004 y 2007

Perfiles	Pacientes	Nº muestras	<i>BstEII</i>	<i>HaeIII</i>	Identificación – PRA- <i>hsp65</i>
I	P24 - 28	16	235/115/100	145/130/60	<i>M. intracellulare</i> 1 / <i>M. chimaera</i> 1
II	P29 - 36	40	235/210	130/105	<i>M. avium</i> 1 / <i>M. colombiense</i> 1
III	P37 - 38	4	235/210	145/130	<i>M. avium</i> 3



Los árboles fueron construidos por medio del método *neighbor-joining*, utilizando el modelo de corrección de distancia Kimura-2-parámetros. Los números nos indican los valores de *bootstrap* obtenidos en mil repeticiones (expresadas en porcentaje). *M. fortuitum* ATCC 13756 fue usado como grupo externo.

Figura 1 – Árboles filogenéticos basados en las secuencias del ARNr 16S (A), *hsp65* (B) *rpoB* (C) de 15 aislados del MAC y siete cepas de referencia

Tabla 2 – Valores de similitudes para las secuencias *rpoB* (debajo a la izquierda) y *hsp65* (arriba a la derecha) para miembros del MAC aislados en el IEC entre 2004 y 2007

Muestras	Similitud (%)																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. P24	ID	99,7	99,7	99,5	99,5	97,1	97,1	97,1	96,9	96,9	96,9	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	99,5	98,8	97,1
2. P25	100	ID	100	99,7	99,7	97,3	97,3	97,3	97,1	97,1	97,1	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	99,2	98,5	97,3
3. P26	99,2	99,2	ID	99,7	99,7	97,3	97,3	97,3	97,1	97,1	97,1	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	97,8	99,2	98,5	97,3
4. P27	99,2	99,2	99,4	ID	100	97,1	97,1	97,1	96,9	96,9	96,9	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	99,0	98,3	97,1
5. P28	99,1	99,1	99,5	99,2	ID	97,1	97,1	97,1	96,9	96,9	96,9	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	99,0	98,3	97,1
6. P29	94,6	94,6	94,2	94,2	94,6	ID	98,1	99,0	98,8	97,6	97,6	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	96,6	96,4	99,0
7. P30	94,6	94,6	94,2	94,2	94,6	100	ID	99,0	99,2	99,5	99,5	98,1	98,1	98,1	98,1	98,1	98,1	98,1	98,1	96,6	97,3	99,0
8. P31	94,6	94,6	94,2	94,2	94,6	100	100	ID	99,7	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	96,6	96,9	100
9. P32	95,2	95,2	94,6	94,6	94,7	98,0	98,0	98,0	ID	98,8	98,8	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	98,3	96,4	97,1	99,7
10. P33	95,4	95,4	95,3	95,6	95,4	94,7	94,7	94,7	94,5	ID	100	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	96,4	97,1	98,5
11. P34	95,9	95,9	95,7	95,7	95,9	95,7	95,7	95,7	95,7	97,1	ID	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	96,4	97,1	98,5
12. P35	95,3	95,3	95,2	95,4	95,3	94,6	94,6	94,6	94,3	99,8	97,3	ID	100	100	100	100	100	100	100	97,6	97,3	98,5
13. P36	95,9	95,9	95,7	96,0	95,9	94,9	94,9	94,9	94,6	99,5	97,3	99,4	ID	100	100	100	100	100	100	97,6	97,3	98,5
14. P37	96,0	96,0	95,9	95,9	96,0	95,9	95,9	95,9	95,9	97,3	99,5	97,1	97,4	ID	100	100	100	100	100	97,6	97,3	98,5
15. P38	96,0	96,0	95,9	95,9	96,0	95,9	95,9	95,9	95,9	97,3	99,5	97,1	97,4	1	ID	100	100	100	100	97,6	97,3	98,5
16. Maa	95,2	95,2	94,7	94,7	94,9	98,1	98,1	98,1	99,8	94,6	95,9	94,5	94,7	96,0	96,0	ID	100	100	100	97,6	97,3	98,5
17. Map	95,0	95,0	94,6	94,6	94,7	98,0	98,0	98,0	99,7	94,5	95,7	94,3	94,6	95,9	95,9	99,8	ID	100	100	97,6	97,3	98,5
18. Mas	94,9	94,9	94,5	94,5	94,6	97,8	97,8	97,8	99,5	94,3	95,6	94,2	94,5	95,7	95,7	99,7	99,5	ID	100	97,6	97,3	98,5
19. Mah	95,2	95,2	94,7	94,7	94,9	98,3	98,3	98,3	99,7	94,5	95,7	94,3	94,6	95,9	95,9	99,8	99,7	99,5	ID	97,6	97,3	98,5
20. Mi	99,4	99,4	99,5	99,5	99,4	94,3	94,3	94,3	94,7	95,4	95,9	95,3	95,9	96,0	96,0	94,9	94,7	94,6	94,9	ID	98,8	96,6
21. Mchi	99,0	99,0	99,4	99,1	99,2	93,9	93,9	93,9	94,3	95,0	95,4	94,9	95,4	95,6	95,6	94,5	94,3	94,2	94,5	99,2	ID	96,9
22. Mcol	95,4	95,4	95,3	95,6	95,4	94,7	94,7	94,7	94,5	99,7	97,4	99,8	99,5	97,3	97,3	94,6	94,5	94,3	94,5	95,4	95,0	ID

Maa: *M. avium* subsp. *avium*; Map: *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; Mas: *M. avium* subsp. *silvaticum*; Mah: *M. avium* subsp. *hominissuis*; Mi: *M. intracellulare*; Mchi: *M. chimaera*; Mcol: *M. colombiense*.

DISCUSIÓN

El estudio de miembros del MAC se ha tornado importante por la prevalencia en infecciones diseminadas en pacientes con SIDA y por el aumento del número de infecciones en pacientes sin SIDA. Estudios ha sugerido que las infecciones por MAC en pacientes con SIDA puedan ser causadas por un limitado número de cepas relacionadas al *M. avium*^{22,23}. Sin embargo, las especies y subespecies que pertenecen al MAC no se diferencian fácilmente por análisis fenotípicos, siendo los métodos moleculares, por lo tanto, la mejor opción actualmente para la identificación de esas micobacterias³.

El PRA-*hsp65* se considera un método simple, de fácil implantación en los laboratorios clínicos y que permite la identificación de una amplia variedad de especies detectadas en la rutina laboratorial^{19,24,21}. Sin embargo, no posibilita la diferenciación de especies recientemente descritas, como *M. colombiense* y *M. chimaera*, que comparten perfiles con las variantes alélicas *M. avium* I y *M. intracellulare* I, respectivamente^{19,25}. En virtud de las diferentes significaciones clínicas entre las especies de MAC, es necesario que se realice la aclaración taxonómica^{3,26}.

La secuenciación del ARNr 16S evidenció la distribución de los aislados en dos principales agrupamientos: uno con taxones relacionados al *M. avium* y otro al *M. intracellulare*, pero los bajos valores de bootstrap encontrados en el árbol demuestran el pequeño poder discriminatorio para este objetivo. Aunque el ARNr 16S tenga un importante valor para la taxonomía de las micobacterias, definiendo la clasificación de las mismas en grupos sistemáticos, la pequeña variabilidad encontrada entre miembros pertenecientes al MAC no permite distinción a nivel de especie¹.

Las secuencias *hsp65* presentaron un mayor polimorfismo cuando comparadas al ARNr 16S. Las similitudes variaron de 97% a 100%. En el grupo I, que reunió especies relacionadas al *M. avium* y *M. colombiense*, no fue posible realizar una diferenciación clara entre los aislados. O sea, cuando se adoptó el valor de *cut-off* superior a 97% para diferenciación de especies por *hsp65*, propuesto por McNabb et al¹², no fue posible diferenciar *M. avium* de *M. colombiense*, cuyas secuencias de referencia compartieron similitudes de 98,5%. Sin embargo, al considerar la mayor puntuación de similitud, conseguimos identificar un 90% (9/10) de los aislados de este grupo, representados por *M. colombiense* (P30 – P34) y *M. avium* (P35 – P38), excluyendo apenas P29, que exhibió un 99% de similitud con ambas especies. Este hallazgo confirma la estrecha relación entre *M. avium* y *M. colombiense*, como demostrado por Murcia et al²⁵. Los aislados clínicos P24 a P28 exhibieron mayor similitud con *M. intracellulare*, aunque compartieran un 98,3% – 98,8% de similitud con *M. chimaera*. Tal dato demuestra la

necesidad de búsqueda de nuevos objetivos moleculares, capaces de distinguir una amplia variedad de especies, incluyendo aquellas que exhiben estrechas relaciones filogenéticas.

Un segmento de la región V del gen *rpoB*, inicialmente usado para identificación de micobacterias de crecimiento rápido¹³ y recientemente propuesto para identificación de especies del MAC¹⁴, fue también evaluado en este estudio. En el análisis de las secuencias se observaron incongruencias de resultados cuando comparados a la secuenciación de los genes ARNr 16S y *hsp65*. Como observado en el árbol 2A, *M. colombiense* se mostró estrechamente relacionado al *M. avium*, que también se extendió al análisis de *hsp65* (Figura 2B). Este hallazgo es equivalente al descrito por Murcia et al²⁵. Sin embargo, en el análisis del *rpoB* se comprobó que *M. colombiense* se presentó en el grupo relacionado al *M. chimaera* y *M. intracellulare*, sucediendo, por lo tanto, un cambio en la topología del árbol. Además de eso, hubo una inversión e la ubicación de los aislados dentro de los grupos, siendo que algunos aislados filogenéticamente relacionados al *M. colombiense* fueron reunidos con *M. avium* y viceversa.

La disposición de taxones en el árbol de *rpoB* de este estudio también fue observada en trabajo previo, lo que demostró la utilidad de este marcador para la identificación del MAC, según el cual, una divergencia de 0,7% posibilitó la diferenciación de 93% de los aislados clínicos¹⁴.

Hay consenso a respecto de que el conocimiento preciso de aislados de MAC involucrados en infecciones puede suministrar importantes datos sobre la heterogeneidad clínica y la patogenicidad de estos miembros, así como sobre el establecimiento de terapia basada en la diversidad genotípica^{27,28,3}.

CONCLUSIÓN

Aunque el gen *rpoB* haya sido propuesto como marcador molecular adicional para diferenciación de micobacterias, inclusive de aislados pertenecientes al MAC, los hallazgos de este estudio demostraron que los resultados del análisis del gen *rpoB* fueron discordantes de los encontrados para las secuencias del ARNr 16S y *hsp65*, sugiriendo que diferentes fuerzas evolutivas actúan sobre marcadores individuales. Delante de lo expuesto, alertamos sobre que, la selección de objetivos moleculares para fines taxonómicos debe estar basada en marcadores conservados, en donde se observe la manutención de la relación de las especies con sus grupos sistemáticos conocidos y que exhiban mayor poder discriminatorio que el gen del ARNr 16S. Adicionalmente, recomendamos que más de un marcador, incluyendo el ARNr 16S, sea evaluado para la identificación de las especies micobacterianas.



Identificação genotípica de membros do complexo *Mycobacterium avium* isolados de infecções pulmonares no Estado do Pará, Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: O complexo *Mycobacterium avium* (MAC) compreende micobactérias de crescimento lento, naturalmente encontradas no meio ambiente, capazes de causar infecções em diversas espécies de seres vivos, incluindo aves, suínos e humanos. Tais infecções podem ser assintomáticas, clinicamente significativas e, em alguns casos, fatais. No entanto, existe a necessidade de se disponibilizarem técnicas que ofereçam uma identificação conclusiva de bactérias estreitamente relacionadas. As técnicas de biologia molecular se apresentam como ferramentas promissoras para uma identificação mais precisa. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Neste trabalho foram avaliados os marcadores moleculares RNAr 16S, *hsp65* e *rpoB* aplicados à distinção de membros do MAC isolados no Laboratório de Micobactérias do Instituto Evandro Chagas. **RESULTADOS:** Amostras de MAC colhidas em 15 pacientes foram previamente avaliadas pelo método de análise de polimorfismo de fragmentos de restrição do gene *hsp65* (PRA-*hsp65*), que forneceu três diferentes perfis: (I) *BstEII*: 235/115/100, *HaeIII*: 145/130/60; (II) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 130/105; e (III) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 145/130. Árvores filogenéticas foram construídas após análise do RNAr 16S, em que as amostras foram distribuídas em dois grupos, semelhante ao encontrado na análise de *hsp65*. Entretanto, os resultados de *rpoB* foram discordantes daqueles das outras árvores, devido à modificação de topologia. **CONCLUSÃO:** Os achados deste estudo sugerem que diferentes forças evolucionárias podem estar atuando sobre o gene *rpoB*, e, desta forma, é necessário que se tenha precaução ao estabelecer esse alvo para fins taxonômicos. Adicionalmente, recomenda-se que mais de um marcador, incluindo o RNAr 16S, seja avaliado para a identificação micobacteriana.

Palavras-chave: Complexo *Mycobacterium avium*; Polimorfismo de Fragmento de Restrição; Análise de Sequência de DNA; Filogenia.

Genotypic identification of members of the *Mycobacterium avium* complex isolated from pulmonary infections in Pará State, Brazil

ABSTRACT

INTRODUCTION: The *Mycobacterium avium* complex (MAC) is a group of slow-growing mycobacteria naturally found in the environment capable of causing infections in a wide variety of living species, including birds, swines and humans. These infections can be asymptomatic, clinically significant and, in some cases, fatal. There is a demand for techniques that are capable of conclusively identifying closely related bacteria. Molecular biological techniques are promising tools for a more precise identification. **MATERIAL AND METHODS:** In this study, we evaluated the ability of 16S rRNA, *hsp65* and *rpoB* molecular markers to distinguish between members of the MAC isolated in the Mycobacteria Laboratory at the Instituto Evandro Chagas. **RESULTS:** MAC samples collected from 15 patients were previously evaluated using an *hsp65* gene restriction fragment length polymorphism analytical method (RFLP-*hsp65*), and they showed three different profiles: (I) *BstEII*: 235/115/100, *HaeIII*: 145/130/60; (II) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 130/105; and (III) *BstEII*: 235/210, *HaeIII*: 145/130. We constructed phylogenetic trees using 16S rRNA analysis in which the samples were distributed into two groups, similarly to those found in the *hsp65* analysis. However, the results from the *rpoB* analysis disagreed with those of the other trees due to changes in topology. **CONCLUSION:** The findings from this study warrant that various evolutionary forces may be acting on the *rpoB* gene. Thus, it is necessary to be cautious when using this target for taxonomic analyses. Additionally, we recommend that multiple markers (including 16S rRNA) be evaluated when identifying mycobacteria.

Keywords: *Mycobacterium avium* Complex; Polymorphism, Restriction Fragment Length; Sequence Analysis, DNA; Phylogeny.



REFERENCIAS

- 1 Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990. Clin Microbiol Rev. 2003 Apr;16(2):319-54.
- 2 Smole SC, McAleese F, Ngampasutadol J, von Reyn CF, Arbeit RD. Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by restriction and sequence analysis of *hsp65*. J Clin Microbiol. 2002 Sep;40(9):3374-80.

- 3 Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, et al. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54: 1277-85.
- 4 von Reyn CF, Arbeit RD, Horsburgh CR, Ristola MA, Waddell RD, Tvaroha SM, et al. Sources of disseminated *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *J Infect*. 2002 Apr;44(3):166-70.
- 5 Cappelluti E, Fraire AE, Schaefer OP. A case of 'hot tub lung' due to *Mycobacterium avium* complex in an immunocompetent host. *Arch Intern Med*. 2003 Apr;163(7):845-8.
- 6 Lumb R, Stapledon R, Scroop A, Bond P, Cunliffe D, Goodwin A, et al. Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompetent adults. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(8):4906-10.
- 7 Myojo M, Fujiuchi S, Matsumoto H, Yamazaki Y, Takahashi M, Satoh K, et al. Disseminated *Mycobacterium avium* complex (DMAC) in an immunocompetent adult. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003 May;7(5):498-501.
- 8 Tsang AY, Denner JC, Brennan PJ, McClatchy JK. Clinical and epidemiological importance of typing of *Mycobacterium avium* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 1992 Feb;30(2):479-84.
- 9 Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction, restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 1993 Feb;31:175-8.
- 10 Frothingham R, Wilson KH. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J Bacteriol*. 1993 May;175(10):2818-25.
- 11 Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol*. 2001;39(10):3637-48.
- 12 McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul;42(7):3000-11.
- 13 Adékambi T, Colson P, Drancourt M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5699-708.
- 14 Ben Salah I, Adékambi T, Raoult D, Drancourt M. *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology*. 2008 Dec;154(12):3715-23.
- 15 Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:367-416.
- 16 Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
- 17 Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim MN, Bai GH, Park YG, et al. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (*hsp65*) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. *J Microbiol Methods*. 2005 Aug;62(2):199-209.
- 18 Shin S, Kim EC, Yoon JH. Identification of nontuberculous mycobacteria by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA, the heat-shock protein 65 and the RNA polymerase β -subunit genes. *Korean J Lab Med*. 2006 Jun;26(3):153-60.
- 19 Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol*. 2001 Aug;39(8):2799-806.
- 20 Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol*. 1997 Nov;35(11):2969-73.
- 21 Leão SC, Bernadelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods*. 2005 May;61(2):193-9.
- 22 Ritacco V, Kremer K, Van der Laan T, Pijnenburg JE, Haas PE, van Soolingen D. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998 Mar;2(3):242-51.
- 23 Yakus MA, Good RC. Geographic distribution, frequency, and specimen source of *Mycobacterium avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol*. 1990 May;28(5):926-9.
- 24 Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiology*. 2008;8(48):1-12.
- 25 Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E, Garcia MJ. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(9):2049-54.

- 26 Turenne CY, Wallace R Jr, Behr MA. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. Clin Microbiol Rev. 2007 Apr;20(2):205-29.
- 27 Frothingham R, Wilson KH. Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. J Infect Dis. 1994 Feb;169(2):305-12.
- 28 Maekura R, Okuda Y, Hirotani A, Kitada S, Hiraga T, Yoshimura K, et al. Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. J Clin Microbiol. 2005 Jul;43(7):3150-8.

Recibido en / Recebido em / Received: 31/7/2010
Aceito en / Aceito em / Accepted: 24/8/2010