

Marcos Santos Zanini

**Identificação de *Mycobacterium bovis* em leite através da
Reação em Cadeia da Polimerase-PCR**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Medicina
Veterinária
Área: Epidemiologia
Orientador: Prof. Carlos Edmundo
Salas Bravo

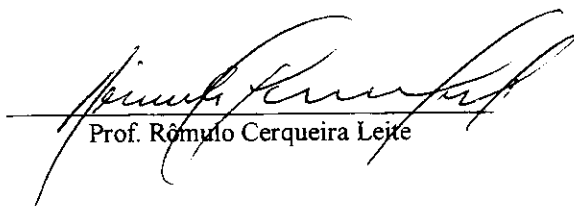
**Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1998**

- Z31 Zanini, Marcos Santos, 1956 -
Identificação de Mycobacterium bovis
em leite através da Reação em Cadeia da
Polimerase - PCR/ Marcos Santos Zanini
Belo Horizonte: UFMG - Escola de
Veterinária, 1998
52 p. : 16 il.
Dissertação (Mestrado)
1 - Leite - Inspeção - Teses. 2 -
Micobactérias - Identificação - Teses. 3 -
Engenharia genética - Teses. I. Título
CDC. 614. 32

Dissertação defendida e aprovada em 29/01/98, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo
Orientador



Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof. Elvio Carlos Moreira

AGRADECIMENTOS

Ao povo brasileiro que através da UFMG custeou a realização do curso e experimentos.

Ao Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota (LARA -- MA, Pedro Leopoldo, MG) pelo inestimável apoio técnico e pessoal.

Ao comitê de orientação, constituído pelos professores Carlos Edmundo Salas Bravo, Élvio Carlos Moreira e Rômulo Cerqueira Leite pelas constantes colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

A minha esposa, Surama Freitas Zanini, pelo companheirismo profissional e constante amor.

A meu pai por todos os anos de confiança e apoio aos caminhos trilhados.

SUMÁRIO

	pág
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
RESUMO.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 LITERATURA CONSULTADA.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4 RESULTADOS.....	28
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	42
7 SUMMARY.....	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l: microlitro
 μ g: microgramas
 η g: nanograma
 η m: nanomoles
 η M: nanomolar
 ρ M: picomolar
A: adenina
ATCC: American Type Culture Collection
bp: pares de bases nucleotídicas
C: citosina
CMT: California Mastite Teste
CFU: unidades formadoras de colônias
CTAB: hexadecyl trimethyl ammonium bromide
dATP: desoxiadenosina tri-fosfato
dCTP: desoxicitidina tri-fosfato
dGTP: desoxiguanosina tri-fosfato
DNA: ácido desoxirrinucleico
E. coli: Escherichia coli
dNTPs: desoxirribonucleotídeos tri-fosfato
dTTP: desoxitimidina tri-fosfato
EDTA: etilene-diamina-tetra-acetato
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
G: guanina
g: gravidade
IS: Insertion Segment
Kb: kilobases
kDa: quilodalton
LARA-MA: Laboratório de Referência Animal-Ministério da Agricultura
LJ: meio de cultura Löwenstein-Jensen
M: molar
M. avium: Mycobacterium avium
M. bovis: Mycobacterium bovi
M. intracellulare: Mycobacterium intracellulare
M. paratuberculosis: Mycobacterium paratuberculosis
M. tuberculosis: Mycobacterium tuberculosis
mCi: miliCouri
mg: miligrama
mM: milimolar
nm: nanômetros

ORF: open reading frame, "janela de abertura para leitura"
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
PAHO-WHO: Panamerican Health Organization-World Health Organization
PCI: fenol-clorofórmio-isoamil
PCR: Polymerase Chain Reaction
PPD: Derivado Protéico Purificado
q.s.p: quantum satis
EDTA: dissódio etilenediaminatetra-acetato
RNA: ácido ribonucleioco
S. aureus: *Staphylococcus aureus*
SDS: duodecil sulfato de sódio
T: timina
Taq: *Thermus aquaticus*
TBE: Tris-borato-EDTA
TBT: tween 80, soro albumina bovina, Tris-HCl
TE: Tris-EDTA
Tris-HCl: Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U: unidade
UNG: uracil-N-glicosilase
UTP: uridina-tri-fosfato
u.v: luz ultra-violeta
∞: infinito
%: porcentagem
°C: graus centígrados

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		pág.
TABELA 1	Contagem de CFU/ml em meio de cultura LJ de diluições de <i>M. bovis</i> em TBT.....	28
TABELA 2	Parâmetros estudados da reação da PCR	30
FIGURA 1	Produto da extração DNA de <i>M. bovis</i> pôr diferentes protocolos em gel de agarose 0,8%.....	29
FIGURA 2	PAGE de fragmento 306 bp de DNA <i>M. bovis</i> extraído com proteinase vegetal.....	29
FIGURA 3	PAGE de fragmento 383 bp de DNA <i>M. bovis</i> amplificado através da PCR com 1,5 mM MgCl ₂	31
FIGURA 4	Efeito da temperatura de anelamento da PCR para diferentes iniciadores	31
FIGURA 5	PAGE de fragmento de 383 bp do DNA <i>M. bovis</i> amplificado através da PCR com 2.0 mM MgCl ₂	32
FIGURA 6	PAGE de fragmento de 306 bp do DNA de <i>M. bovis</i> amplificado através da PCR com 2,0 mM MgCl ₂	32
FIGURA 7	PAGE de fragmento 306 bp do DNA de <i>M. bovis</i> amplificado através da PCR com 2.5 mM MgCl ₂	33
FIGURA 8	Efeito da concentração de DNA na amplificação....	33
FIGURA 9	Amplificação de diferentes DNAs com iniciadores BW6-BW7.....	33
FIGURA 10	PAGE de fragmento 248 bp do DNA de <i>M. bovis</i> amplificado através de PCR com 2.0 mM MgCl ₂ ...	34
FIGURA 11	PAGE de fragmento 248 bp do DNA de <i>M. bovis</i> amplificado através de PCR com 2.5 mM MgCl ₂	34
FIGURA 12	PAGE de fragmento 248 bp de DNAs <i>M. bovis</i> + <i>S. aureus</i> e <i>M. tuberculosis</i> + <i>S. aureus</i>	35
FIGURA 13	PAGE de PCR de DNA de <i>M. bovis</i> com diferentes combinações de iniciadores	35
FIGURA 14	Hibridização de DNA de <i>M. bovis</i>	36

RESUMO

Desenvolveu-se um método simples para extração e identificação de DNA de *Mycobacterium bovis* em leite artificialmente contaminado. O método utiliza extração do DNA com fenol-clorofórmio-álcool-isoamil e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permite através de síntese enzimática *in vitro*, a geração exponencial de seqüências gênicas específicas. Neste trabalho, comparou-se os perfis de amplificação com os conjuntos de iniciadores, TB1-TB2, BW6-BW7 e BW8-BW9, que produzem fragmentos de 383 bp, 306 bp e 248 bp. Usando este procedimento, foi detectado até 10^2 CFU/ml ou 5 µg de puro DNA. Este método pode ser usado na rotina de identificação de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite.

Palavras-chave: PCR, diagnóstico de *Mycobacterium bovis*, leite.

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina, causada pela espécie *Mycobacterium bovis*, pertence classicamente ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, onde incluem-se o *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium microti* que predominantemente causam a tuberculose humana. A tuberculose bovina, epidemiologicamente, classifica-se como zoonose de ocorrência mundial que determina prejuízos à pecuária e riscos à saúde da população que consome produtos de origem animal ou que tem contato direto com animais infectados. O consumo de leite *in natura* e produtos lácteos não pasteurizados é significativo a nível mundial sendo a forma predominante de transmissão do *M. bovis* para o homem.

A principal forma de transmissão da tuberculose entre bovinos é por via respiratória e, entre as formas não-respiratórias, a mais comum ocorre em bezerras que se infectam ao mamarem leite infectado. Pode ainda ocorrer a forma intestinal, com diarreia crônica e caquexia em cerca de 10-20% dos casos, e uma forma ganglionar difusa, forma preferencial de apresentação na glândula mamária. Outras vias, como a cutânea ou a genital, são de ocorrência bastante rara.

A situação da tuberculose mundial em animais é diversa. Em países desenvolvidos, o *M. bovis* e outras micobactérias tem sido motivo de pesquisa e programas de controle devido a infecção em animais silvestres, pois a apresentação em animais domésticos encontra-se relativamente controlada. Nos países em desenvolvimento, a tuberculose por *M. bovis* tem maior relevância em animais domésticos, principalmente no bovino, sendo motivo de controle sanitário dos animais infectados.

Quanto a situação da tuberculose bovina no Brasil, os dados mais recentes são isolados. Principalmente, considerando-se que a tuberculinização não é realizada na maioria do rebanho leiteiro (15 milhões de cabeças), pois são produzidas em média somente 800.000 doses/tuberculina/ano. Considera-se que o gado tuberculoso constitui a principal fonte e agente mantenedor da infecção no rebanho sendo, no rebanho nacional leiteiro a doença é endêmica e a transmissão normalmente respiratória. O Ministério da Agricultura como forma de controle da tuberculose, preconiza o método do teste-e-abate, no qual todo animal considerado positivo nas provas de tuberculinização devem ser encaminhados ao abatedouro sob inspeção federal, o que não é cumprido, tendo em vista o prejuízo não ressarcido do proprietário e o desconhecimento da lei.

Particularmente, a tuberculose mamária bovina não possui tratamento pois a quantidade de medicamentos que atravessa a barreira da glândula é em quantidade insuficiente para a cura, e aqueles que se encontram debilitados não reagem ao teste alérgico de tuberculinização intra-dérmica. O diagnóstico laboratorial da tuberculose mamária utilizando a semeadura de leite em meios de cultura microbiológica, necessita acima de 10^3 micobactérias/ml, demanda mais de 30 dias e é dificultado por contaminações secundárias de microrganismos com crescimento mais rápido que a micobactéria. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo propor a técnica de PCR como alternativa rápida e sensível para a identificação da espécie *Mycobacterium bovis* em leite de animais tuberculosos.

2 LITERATURA CONSULTADA

O aspecto clínico e sanitário da tuberculose pode ser verificado por alguns trabalhos a seguir. Leite et al. (1978) quando testaram 2061 bovinos da bacia leiteira de tipo B da grande Belo Horizonte encontraram 17,37% de animais reagentes positivos a tuberculinização intradérmica. Langenegger et al.(1991) em estudo sobre o tratamento da tuberculose bovina com isoniazida, destaca a importância de eliminar animais que possuam lesões tuberculosas no úbere verificando a presença de bezerras positivas a tuberculinização. No sul do Brasil, Dickel et al (1995) realizaram levantamento junto a propriedades rurais produtoras de leite e observaram 27,7% de estabelecimentos com animais reagentes a tuberculinização sendo que, em muitos casos o leite destas propriedades é vendido *in natura* a população da periferia de centros urbanos. Na mesma região, Pardo et al. (1997) isolou o gênero *Mycobacterium* em meio de cultura Löwestein-Jensen do leite de 36,54% dos animais positivos a tuberculinização. Segundo a Panamerican Health Organization-World Health Organization (PAHO-WHO), o rebanho bovino brasileiro está estimado em mais de 160 milhões de cabeças e os resultados de testes de tuberculinização no gado, indicam taxas de reação à tuberculinização da ordem de 0,9 a 2,9% dos animais em diferentes regiões (Kantor & Ritacco, 1994).

A quantificação através de unidades formadoras de colônias - CFU foi utilizada por diversos autores como forma de verificar concentração de micobactérias. Pierre et al. (1991) em estudo da identificação de *M. tuberculosis* em amostras clínicas através da PCR com iniciadores TB1-TB2, utiliza a CFU como forma de verificar a sensibilidade de seu protocolo. Yajko et al. (1995) verificando a sensibilidade de kit de diagnóstico de tuberculose através de PCR, utiliza a CFU como método de quantificação de amostras controle. Grant et al (1996), estudando a contaminação de leite com *M. paratuberculosis* também utiliza a CFU como parâmetro para verificar a eficiência dos métodos de pasteurização. Kantor (1979), propõe em manual editado pelo Centro Panamericano de Zoonoses, a utilização da CFU para verificar a eficiência de antimicobacterianos. O uso da espectofotometria para quantificação do número de bactérias é controverso e os parâmetros não são bem definidos, pois Wayne(1994) trabalhando com absorvância de 580(A_{580}) e leitura 0,1 encontrou $6,3 \times 10^7$ CFU/ml, já Kolk et al (1992) enquanto Noordhak et al. (1994), utilizando comprimento de onda 420 (A_{420}) e leitura 0,1 indicam 10^8 micobactérias/ml

Quanto a extração e quantificação de ácidos nucleicos, Grange (1996) fazendo revisão das características morfológicas das micobacterias destaca que apesar destas não serem encapsuladas, seus constituintes de parede celular e seu

contrapartida, também tem homologia com seqüências do DNA de *Pseudomonas aureginosa*, e *E. coli*, que deveram ser excluídos do diagnóstico através de cultura (Walker et al., 1992), apesar de neste experimento não haver sido verificada esta homologia.

A seqüência de inserção do DNA-*M. bovis*-IS1081, descrita por Collins & Stephens (1991), contem os iniciadores BW6-BW7 e BW8-BW9. Possui um total de 1324 bp, delimitadas por seqüências invertidas repetidas de 15 bp entre as posições 333-347 e 1642-1656. Esta seqüência repete-se por seis vezes no genoma do *M. bovis* e em menor número no genoma do *M. tuberculosis*. Já foi utilizada como referência para iniciadores por van Soolingen et al., (1992), Wards et al., (1995) e Glennon et al., (1997). A IS1081 possui um longo ORF que supostamente expressa uma proteína de 415 aminoácidos associada a resistência a antibióticos (Collins & Stephens, 1991). Os pares de fragmentos complementares amplificados por estas seqüências utilizadas como iniciadores, BW6-BW7 e BW8-BW9, (Wards et al., 1995) possuem respectivamente segmentos de 306 bp e 248 bp. Os iniciadores são;

- BW6: 5' CGA CAC CGA GCA GCT TCT GGC TG 3', que faz pareamento com fita complementar
- BW7: 5' GTC GCC ACC ACG CTG GCT AGT G 3', pareamento invertido com fita complementar
- BW8: 5' ACA GGC GAG CCC GGA TCT GCT G 3', pareamento com fita complementar
- BW9: 5' GTT CAG CTC GCT TGC GGC GCT G 3', pareamento invertido com fita complementar

Rodriguez et al. (1995) utilizou a técnica de "Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD" para diferenciar *M. bovis* e *M. tuberculosis* e paralelamente testou esta técnica para diagnóstico de *M. bovis* em leite com resultados positivos, mas não especificou o protocolo utilizado na contaminação e extração do DNA

Em geral, a escolha da técnica mais indicada é circunstancial a situação clínica em questão. Sepkowitz et al. (1995) realizou extensa revisão da relação entre a AIDS e a tuberculose, observando a sensibilidade dos diversos métodos para diagnóstico da tuberculose humana, conclui que não existe um método mais indicado, mas sim a associação de métodos para cada circunstância clínica. Meinkoth & Wahl (1984) em extensa revisão sobre métodos de hibridização, demonstram a técnica de dot blot como sendo a mais indicada para exames de rotina.

A especificidade de uma reação de PCR é influenciada por uma série de diferentes fatores. O primeiro a ser considerado se relaciona ao tamanho do iniciador: quanto mais longo o iniciador, maior será a sua especificidade. Esta especificidade também pode ser dirigida conforme o nível de polimorfismo de seqüência de uma determinada região à ser amplificada. Outros fatores, importantes na manutenção da especificidade da reação são a concentração de Mg^{2+} , iniciadores e enzima, as quais devem ser mantidas num patamar o mais inferior possível. Um excesso no número de ciclos e nos períodos de tempo de anelamento e extensão também contribuem para a diminuição da especificidade da reação. Certamente, um dos fatores mais importantes na manutenção desta especificidade é a temperatura de anelamento-extensão dos iniciadores. Esta temperatura deve ser a mais elevada possível, dentro dos limites do conteúdo máximo de 50% de guanina+citosina (ligação tripla de pontes de hidrogênio exigem maior temperatura para desnaturação), considerando o comprimento dos iniciadores (mínimo de 1 min por kilobase) e do ótimo de atividade da DNA polimerase. Menores tempos de anelamento-extensão devem ser também testados quando as demais condições da PCR estiverem definidas (Erlich et al., 1991; Saiki, 1989).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de *Mycobacterium bovis* AN5 e *M. avium* D4ER utilizadas foram fornecidas pelo Laboratório de Referência Animal-LARA, Ministério da Agricultura, Pedro Leopoldo-MG, , após cultura em meio Löwenstein-Jensen-LJ a 37 °C durante oito dias. A amostra de *M. tuberculosis* ATCC 27294 cultivada em LJ, foi fornecida pelo Hemocentro-SP. As amostras de DNA humano, *Escherichia coli* DHS, e *Staphylococcus aureus* (ATCCC 27853) pertencem aos estoques padrão de referência utilizados pelo Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais, Dept. Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais, no qual foi também realizado a maioria dos processos laboratoriais deste projeto.

O leite foi coletado de vaca mestiça com reação alérgica negativa a tuberculinização (proteína purificada digerida-PPD) e Califórnia Mastite Teste-CMT negativo. O úbere foi lavado com 4% NaHClO (hipoclorito de sódio). Após desprezar os primeiros jatos foi ordenhado manualmente um litro de leite do quarto dianteiro direito em frasco previamente esterilizado. Este volume foi dividido em parcelas de 50 ml e congelado a -20°C com exceção de uma alíquota que foi diretamente semeada em agar-sangue para verificar contaminantes. Também foi realizada a semeadura em meio Löwenstein-Jensen segundo técnica do Centro Panamericano de Zoonoses-CEPANZO (Kantor, 1979) utilizando o método do laurilsulfato de sódio para verificar a presença de micobactérias.

O preparo do leite com *M. bovis* AN5, partiu de uma amostra de 10 mg de *M. bovis* AN5, coletada após cultivo de oito dias em LJ com glicerina. Homogeneizou-se sob forte agitação manual por 10 min em tubo Falcon de 15 ml contendo 20 pérolas de vidro 3-5 mm ϕ e 10 ml de TBT, formulado com 0,1% Tween-80, 0,5% soro albumina bovina e 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 ((Kantor 1979; Kolk et al., 1992). A partir desta concentração, foram feitas sucessivas diluições de base 10 em TBT (oito diluições), adicionando 90 ml de TBT aos 10 ml de concentrado inicial. Em seguida, semeou-se em duplicata, 1 ml de cada diluição em meio LJ com glicerina afim de verificar o número de unidades formadoras de colônia-CFU/ml. (Cousins et al., 1991; Pierre et al., 1991; Buck et al., 1992; Yajko et al., 1995 Grant et al., 1996), sendo o restante das diluições congeladas a -20 °C. Estes protocolos foram realizados nos laboratórios do LARA-MA, Pedro Leopoldo-MG. Doze dias após a semeadura das diluições e já com o conhecimento do resultado do número de CFU/ml de cada diluição, foi centrifugado 5 ml de cada diluição à 10,000 g x 20 min em temperatura ambiente, desprezado o sobrenadante, e ressuspendido o sedimento

em 5 ml de leite *in natura*. O leite, assim contaminado nas diversas diluições, foi submetido à leve agitação por 2 h/42°C afim de garantir a homogeneidade da suspensão.

Na literatura consultada não foi encontrada referência ao tema extração do DNA de *M. bovis* em leite. Assim, foram avaliados para *M. bovis* três métodos de extração de DNA de outros microrganismos contaminantes do leite. Os DNAs obtidos através de cada método foram estocados a -20°C para posterior quantificação, PCR e hibridização. Em paralelo, como controle, foi extraído pelos três métodos, também o DNA da diluição em TBT que deu origem a correspondente diluição de leite contaminado.

O primeiro método, descrito por Willems et al.(1994) para extração de DNA de *Coxiella burnetti* foi baseado no tratamento da amostra com proteinase em altas concentrações a 56°C durante período prolongado. Na adaptação deste método para extração do DNA de *M. bovis* utilizou-se oito tubos tipo Falcon de 15 ml contendo 1 ml de leite contaminado por *M. bovis* AN5 nas concentrações 10^0 a 10^7 CFU/ml, acrescidos de 1 ml de solução de proteinase K a 40% (Boehringer, Mannheim, Germany), e incubados a 56°C/8 h. Após, as amostras foram acrescidas de 2 ml de ácido acético 1%, seguido de agitação por cinco min à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado ao tubo, 4,2 ml de PCI (fenol-cloroformio-isoamil, 25-24-1), seguido de agitação por 10 min e centrifugação a 10,000 x g por cinco min à temperatura ambiente. A fração aquosa foi recuperada e extraído o DNA por mais duas vezes com igual volume de PCI. O sobrenadante final de 4 ml, foi adicionado de 8 ml de etanol absoluto e 3 µg de tRNA (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, USA) seguido de refrigeração a -70°C por 40 min para ocorrer a precipitação do DNA. Posteriormente, centrifugou-se a 24,000 g x 15 min x 4°C desprezando-se o sobrenadante. O precipitado obtido, foi lavado cuidadosamente por 3 x com 4 ml de etanol 70% para remoção de sais, seguido de ressuspensão do precipitado em água destilada, estéril. Foi realizada uma variação desta técnica ao substituir a proteinase K (Boehringer, Mannheim, Germany) por uma proteinase de origem vegetal recentemente isolada no Laboratório de Produtos Naturais-ICB (Salas et al., 1997)

O segundo método, foi baseado nos protocolos da PCR descritos por Millar et al.(1996) e Tola et al.(1997) para identificação de *M. paratuberculosis* em leite bovino pasteurizado e *Mycoplasma agalactiae* em leite de ovelhas. Iniciou-se pela centrifugação de 1 ml de leite contaminado nas diversas concentrações a 41.000 x g/1 h/4 °C, resultando três fases no tubo; uma fase gordurosa superior, um precipitado no fundo, e uma fase intermediária contendo o soro, que foi

aspirado cuidadosamente e desprezado. Foi acrescentado 1 ml de 6 M tiocinato de guanidina ao sedimento e a gordura, sendo a mistura mantida durante 30 min à temperatura ambiente e agitação constante. O protocolo foi seguido de extração do DNA com PCI conforme método anteriormente descrito.

O terceiro método, foi originalmente utilizado por Wards et al.(1995). O volume de 1 ml de leite contaminado das diversas concentrações, foi acrescentado de 5 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 0,05% Tween 80. Incubado a 60°C sob leve agitação por uma hora. Após a pré-digestão, foi centrifugado a 12.000 x g, 10 min. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuscitado em 1000 µl de água destilada, estéril, contendo 5 µl de proteinase K (10 mg/ml), 1% SDS e 10% CTAB. Incubou-se os tubos por 90 min a 60 °C, seguido de tratamento com PCI, conforme descrito anteriormente.

A extração do DNA dos microrganismos utilizados como controle, *M.tuberculosis*, *M. avium*, *E. coli*, e *S. aureus* foram realizadas utilizando o protocolo do primeiro método modificado (Willems et al., 1994), descrito acima.

A eletroforese dos DNAs obtidos após extração (> 500 bp) e fragmentos amplificados pela PCR(< 500 bp) foram separados em gel de agarose 0,8% e 2,0%, respectivamente. A separação em agarose deu-se em solução tampão TBE (0.045M Tris-borato, 0.001M EDTA) sob 70 volts, 20 miliampères, por aproximadamente 2 horas. A coloração foi realizada em solução de brometo de etídio 0,5 µg/ml. Os fragmentos de DNA obtidos após eletroforese foram visualizados através de u.v. 260 nm. Para a hibridização, fez-se transferência do DNA para membrana de nylon conforme técnica de hibridização abaixo descrita. Os produtos obtidos pela PCR(<500 bp) foram também submetidos a eletroforese em 6% acrilamida/bisacrilamida (29:1) xTBE 1%, 6 mm de espessura, vertical, sob condições de 100 volts/25 miliampères/25°C . A coloração deu-se em solução de prata 0.2% (Sambrook et al., 1989).

As condições ótimas da PCR para amplificação do *M. bovis* em leite foram determinadas após estudo visando otimizar os resultados da PCR. Utilizou-se para tanto, as diluições da micobactéria 10⁰-10⁷ CFU/ml em TBT. As condições variadas com seu respectivo par de iniciadores estão abaixo enumeradas. Cada conjunto de iniciadores, TB1-TB2, BW6-BW7 e BW8-BW9, foram também testadas nas condições de concentração descrita na bibliografia (Hance et al., 1989; Walker et al., 1992; Wards et al., 1995). Nestas condições, procedeu-se a PCR do DNA extraído das concentrações 10⁰, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ CFU/ml produzidas em TBT(como controle) e em leite *in natura* contaminado. A única modificação realizada foi a adição de 1 unidade da enzima UDG

(uracil-N-glycosylase, Gibco BRL, USA) para cada 100 microlitros da PCR (Kox et al., 1994; Wards et al., 1995). Cada bateria da PCR transcorreu com um controle negativo de leite não contaminado, assim como, na eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), utilizou-se como padrão para peso molecular o marcador 100 bp (Gibco, BRL) e nos geis de agarose o marcador Lambda DNA Hind III Digest (Pharmacia Biotech), abreviadamente denominados 100 bp e λ Hind III, respectivamente.

Para os iniciadores TB1-TB2, a condição padronizada para a PCR foi; 0,25 U UDG, 10mM Tris-HCl (pH 8,3) 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo tri-fosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP- Promega), 50 μ M de cada iniciador, TB1-TB2, 2,5 U de Taq polimerase (Enzi Biot, Cuba), solução de DNA extraído de 1 ml das diversas concentrações, q.s.p 25 μ l de água destilada, estéril, e finalmente 15 μ l de óleo mineral para evitar evaporação dos reagentes durante a PCR. O programa estabelecido para o ciclador de temperatura (MultiCycler, M. J. Research, MO, USA) foi de 37°C/10 min (ação da UDG), 94°C/10 min (inativação da UDG e desnaturação inicial) seguida de 35 ciclos de 94°C/1 min+ 60°C/2 min+ 72°C/2 min, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C, 10 min (Walker et al., 1992).

O efeito da concentração de MgCl₂ na reação da PCR foi avaliado entre 1,5 mM e 2,0 mM. O efeito de variação de temperatura de anelamento na PCR também foi estudado, mantendo-se constantes os demais valores da reação. Para tanto, utilizou-se a diluição 10² CFU/ml, sendo diminuída a temperatura de anelamento de 60°C para 52°C.

A composição padronizada dos reagentes da PCR para os conjuntos de iniciadores BW6-BW7 e BW8-BW9 foi a mesma (Wards et al., 1995). Constituiu-se de 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 50 μ M de cada iniciador, 0,25 U UDG, 2,5 U de Taq polimerase, solução de DNA extraído de 1 ml das diversas concentrações, água deionizada estéril q.s.p 25 μ l e 15 μ l de óleo mineral. O programa para o ciclador de temperatura foi de 37 °C/10 min, 94 °C/10 min, seguida de 42 ciclos de 94 °C/30 s, 68 °C/1 min, 72 °C/30 s, finalizando com um ciclo de extensão a 72 °C/20 min.

Nestas condições, foi avaliado o produto extraído do leite com concentração 10² CFU/ml frente aos efeitos do aumento da concentração de MgCl₂ de 2,0 para 2,5 mM, a variação de temperatura de anelamento de 68°C para 60 e 52°C e a especificidade destes iniciadores para DNAs variados na concentração de 50 ng(humano, bovino, *S. aureus*, *M. avium*). As demais condições da PCR foram

mantidas. Utilizando ainda estes iniciadores, também foi testado o aumento das concentrações de DNA para 50×10^6 pg/ml do *M. bovis*, *M. tuberculosis* e *S. aureus* e verificado seu efeito na PCR.

A condição padrão da PCR para BW8-BW9, foi idêntica à utilizada para BW6-BW7. A concentração de $MgCl_2$; mantidas as demais condições, foi elevada para 2,5 mM. A variação de temperatura de anelamento da reação de PCR para 60 e 52 °C foi testada. Também misturou-se em iguais quantidades de 50 ng/ml os DNAs de *M. bovis* AN5+S. *aureus* e *M.tuberculosis*+*S. aureus*. Estas 2 misturas, contendo 100 ng/ml DNA, foram amplificadas na condição padrão para os iniciadores BW8-BW9.

Um mix de iniciadores, foi também motivo de pesquisa. Para tanto, utilizou-se na PCR diferentes temperaturas (60°C-68°C) e mistura de iniciadores em diferentes combinações (TB1-TB2, BW6-BW7 e BW8-BW9) na concentração de 25 µM para cada iniciador. As demais condições de reagentes foram mantidas. As combinações foram; TB1-TB2+BW6-BW7/68 °C/60 s, TB1-TB2+BW8-BW9/68 °C/60 s, BW8-BW9+BW6-BW7/68 °C/60 s, BW8-BW9+TB1-TB2/60 °C/120 s, BW6-BW7+TB1-TB2/60 °C/120 s.

A identificação por hibridização dos produtos da PCR foi feita através do produto de amplificação da concentração 10^2 CFU/ml com os iniciadores BWs, que uma vez, identificados em gel de poliacrilamida após coloração com prata, foram também aplicados em gel de agarose 2% conforme descrito no item 3.5. O processo denominado por "Southern blot" foi aplicado ao gel de agarose contendo fragmentos de DNA amplificado. Foi constituído da eletroforese do produto da PCR de concentração 10^2 CFU/ml em agarose, seguido da desnaturação dos fragmentos *in situ* deixando o gel imerso em 0,2 M HCl por 10 min. A seguir, procedeu-se a transferência por capilaridade dos produtos separados no gel para membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham International plc, Buckinghamshire, England) em solução 0,4 M NaOH. A fixação ou "cross-linking" do DNA à membrana (ligação cruzada covalente intermolecular) deu-se em u.v. 305 nm por 3 min (Sambrook et al., 1989).

Uma variação do processo de hibridização também conhecido como "Dot blot" foi realizada (Meinkoth et al., 1984). Para tal, o produto da PCR da concentração 10^2 CFU/ml foi acrescido de 0,5 µl 3M NaOH, incubado 1h/70 °C, resfriado à temperatura ambiente, e neutralizado com igual volume de 2M NH_4OAc (acetato de amônia). Volumes de 2, 1 e 0,5 µl em separado sofreram 4 diluições sucessivas de base 10 ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$). As diluições de cada

volume, foram aplicadas em fitas de membranas de nylon separadas, na quantidade de 2, 1 e 0,5 μ l. O processamento destas membranas (membrana 2 μ l, membrana 1 μ l, membrana 0.5 μ l) acompanhou o protocolo de hibridização a partir do "cross-linking".

No passo seguinte, as membranas ("dot blot" e "Southern blot") foram banhadas em 2X SSPE (3 M NaCl, 0.2 M Na_2PO_4 e 0.02 M EDTA) e logo incubadas a 65 °C durante 15 min em solução de pré-hibridização (2X SSPE, 1% soro albumina bovina e 7% SDS). Após, substituiu-se a solução de pré-hibridização por nova solução de pré-hibridização contendo a sonda (iniciador BW 8) radioativa em seu terminal 5' com $1,9 \times 10^7$ mCi/ η g DNA $\{^{32}\text{P}\}$ γ ATP. A hibridização procedeu-se por 10 h à 65°C, sendo então o excesso de radioatividade retirado das membranas com sucessivas lavagens de 2XSSC (0.15 M NaCl, 0.015 M citrato de sódio)+ 0.1% SDS, 0.5xSSC+0.1% SDS, 0.1XSSC+0.1%SDS e 0.1XSSC+1.0% SDS. A lavagem final das membranas foram monitoradas (contador Geiger Technical Associates mod. PUG1, USA) de forma a radioatividade da parte central das membranas permanecer, apresentando ausência de radioatividade nas bordas onde supostamente não havia nenhum produto hibridizado. A seguir, as membranas foram postas em contato com filme radiográfico Kodak X-Omat K (XK1) durante 12 h à -70°C (Sambrook et al., 1989).

A marcação do oligonucleotídeo (iniciador BW8), foi realizada através do seguinte protocolo (Sambrook et al., 1989);

a) purificação da sonda em gel desnaturante de poliacrilamida 15% com 8M de uréia em condições de 1200 volts/50 miliampères/5 watt

b) visualização com u.v. 302 nm e isolamento do fragmento do gel contendo a sonda , seguido de trituração do fragmento do gel e adição de 0,1% SDS, 0,5M acetato de sódio e 1 mM EDTA em tubo 1,5 ml. Incubação durante 12 h em banho-maria à 37°C

c) centrifugação do tubo a 3000 x g/5 min/temperatura ambiente, coletando o sobrenadante, que é acrescido de 2X etanol absoluto, 1 μ l glicogênio (20 mg/ml) e incubado a -70°C por 1 h. Centrifugação do tubo a 12,000 x g/4°C, sendo desprezado o sobrenadante e lavado o precipitado com etanol 70%, seguido de nova centrifugação

d) ressuspensão do precipitado em 100 μ l de TE e ajuste da absorbância para 0.3 em espectrofotômetro regulado em 260 nm, correspondendo a 15 μ g/ml de oligonucleotídeo (Sambrook et al., 1989), seguido de filtração em membrana 0.22 micros (Milipore Inc., USA).

e) a marcação do oligonucleotídeo (BW8) propriamente dita, com a mistura dos seguintes componentes: 67 ng (10 pmol) de oligo + 2,5 µl 10X buffer para enzima fosfoquinase + 9 µl de [³²P]γ ATP, atividade específica 2 mCi/nm + 1 µl polinucleotídeo quinase 400u/µl (Enzi Biot, Cuba) + q.s.p. 25 µl, água Milli-Q (Milipore Inc.). Incubação da reação 45 min/37°C, seguido de 10 min a 68°C para inativação da enzima. Para retirar o excesso de radiativo da suspensão, filtra-se em coluna Sephadex G-25 previamente equilibrada (NAP-Medium of DNA Grade - Pharmacia Blotech), sendo a coleta monitorada com contador Geiger para separar o primeiro pico de radioatividade que contém a maior quantidade de o oligonucleotídeo marcado que serve para o processo de hibridização.

4 RESULTADOS

Em uma primeira etapa, anterior a contaminação do leite, foram determinadas as concentrações das diluições em TBT de *M. bovis* através do cultivo em LJ. A concentração inicial (10 mg/10 ml) foi considerada como controle positivo e com concentração 10^7 CFU/ml. Estes resultados foram reproduzidos com novas sementeiras para cada uma das diluições. Particularmente, a diluição 10^{-5} , correspondente a 10^2 CFU/ml, foi novamente diluída com base 10 e semeada (1 ml) em meio LJ afim de confirmar sua concentração.

Tabela 1. Contagem de CFU/ml em meio de cultura LJ de diluições de *M. bovis*

Diluição	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Colônias	∞	∞	∞	∞	∞	10-14	2-3	0-0
CFU/ml	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	0-0

Obteve-se para todos os processos de extração em leite quantidades significativas de DNA, mesmo no leite que foi contaminado com concentração 10^1 CFU, onde foram obtidos até 2 η g de ácido nucléico. Utilizando o produto de extração da concentração 10^2 CFU/ml, foi demonstrada na Figura 1 a extração e quantificação de DNA *M. bovis* através do primeiro método (B), segundo método (C) e terceiro método (D).

Também foi realizada a extração de DNA de *M. bovis* do leite com uma nova proteinase de origem vegetal, E6870 (Figura 2) e amplificada por PCR com iniciadores BW6-BW7. Em paralelo, como controle foi utilizada a proteinase K de rotina (Boehringer, Mannheim, Germany) com amplificação na condição padrão para iniciadores BW6-BW7 e eletroforese em gel de poliacrilamida.

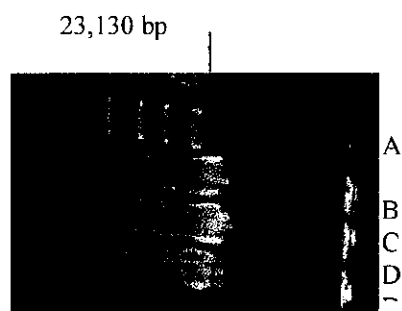


Figura 1. Produto da extração de DNA de *M. bovis* por diferentes protocolos em gel de agarose 0,8%. Canaletas; A) marcador de peso molecular λ Hind III, canaletas B)C) e D) DNA extraído através do 1^o, 2^o e 3^o método.



Figura 2. PAGE de fragmento 306 bp de DNA de *M. bovis* extraído com proteinase vegetal. Canaletas A)100 bp, B)controle negativo de amplificação, C)G) amplificação de *M. bovis* extraído de leite, D)E)F) controles negativos.

De posse do DNA obtido pelos procedimentos acima descritos, foram variadas as condições para a PCR com cada par de iniciadores (TB1-TB2, BW6-BW7, BW8-BW9) e feita eletroforese em gel de poliacrilamida-PAGE (poliacrylamide gel electrophoresis). A revisão da literatura (Saiki, 1989; Erlich et al., 1991) refere-se particularmente à otimização das condições da concentração de $MgCl_2$ e a temperatura de anelamento para a PCR.

As condições testadas estão resumidas esquematicamente na tabela a seguir.

Tabela 2. Parâmetros estudados da reação da PCR

Iniciador	Varição [] MgCl ₂	Temp. ane lamento	Varição [] de DNA	Tempo ane lamento	Mix inicia dores	DNA <i>M. bovis</i>	Outros DNA	Híbrid zação
TB1-TB2	X	X		X	X	X		
BW6-BW7	X	X	X	X	X	X	X	X
BW8-BW9	X	X		X	X	X	X	X

TB1-TB2

A concentração padrão (Hance et al., 1989; Walker et al., 1992) de 1,5 mM de $MgCl_2$ resultou em amplificação entre 10^4 e 10^7 CFU (Figura 3). Em contrapartida, com 2,0 mM $MgCl_2$, obteve-se amplificação nas concentrações 10^2 a 10^7 CFU/ml, acompanhadas da amplificação de fragmentos inespecíficos ao redor de 1000 bp (Figura 5). O efeito da temperatura de anelamento com os iniciadores TB1-TB2 foi estudado diminuindo a temperatura para 52 °C, e os resultados destes experimentos são apresentados na Figura 4E, onde foi observada a amplificação de fragmentos inespecíficos.

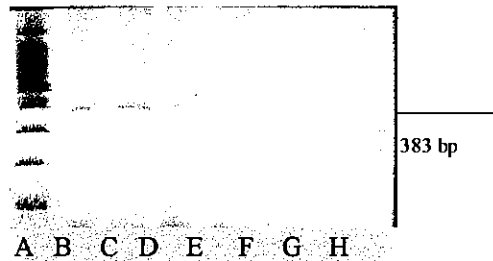


Figura 3. PAGE de fragmento 383 bp de DNA *M. bovis* amplificado através da PCR, 1,5 mM de $MgCl_2$. Canaletas, A) marcador peso molecular 100 bp, H) controle negativo de leite, B-G) leite infectado com 10^7 - 10^2 CFU/ml

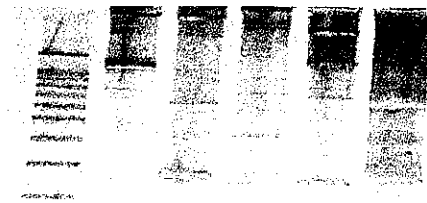


Figura 4. Efeito da temperatura de anelamento da PCR para diferentes iniciadores. Eletroforese em poliacrilamida, canaletas A) marcador 100 bp, B) e C) BW6-BW7: 60°C, 1 min e 52°C, 1 min, E) TB1-TB2, 52 °C, 2 min, L) e R) BW8-BW9: 60°C, 1 min e 52°C, 1 min.

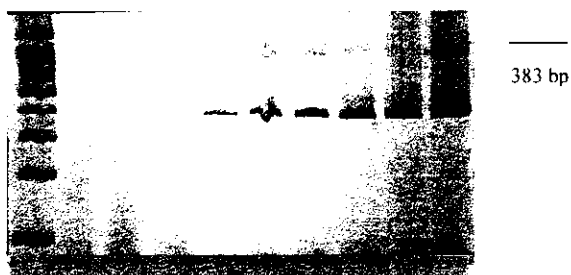


Figura 5. PAGE de fragmento 383 bp de DNA *M. bovis* amplificado através da PCR com 2,0 mM de $MgCl_2$. Canaletas, A) marcador peso molecular 100 bp, B) controle negativo de leite, C-L) leite infectado com 10^0 - 10^7 CFU/ml

BW6-BW7

Na condição padronizada da PCR foi obtida amplificação entre as concentrações 10^2 - 10^3 CFU (Figura 6). O aumento da concentração para 2,5 mM $MgCl_2$, mantidas as demais condições, contribui somente para o surgimento de bandas inespecíficas (Figura 7). O aumento da concentração de DNA (Figura 8) na reação de PCR 10^6 x não impediu a amplificação do segmento-alvo, apesar de comprometer a visualização das bandas no gel de poliacrilamida. Estes iniciadores mostraram a especificidade citada na literatura (Collins & Stephens, 1991), não amplificando DNAs que podem eventualmente comprometer a PCR como o DNA bovino e humano (Figura 9). A variação de temperatura de anelamento e mix de iniciadores (Figuras 4 B-C) não resultou em um perfil de bandas diferenciado.



Figura 6. PAGE de fragmento 306 bp do DNA *M. bovis* amplificado através da PCR com 2,0 mM $MgCl_2$. Canaletas; D-T) 10^7 - 10^0 CFU/ml, A) controle de amplificação de leite sem *M. bovis* e B) indicador de peso molecular de 100 bp.

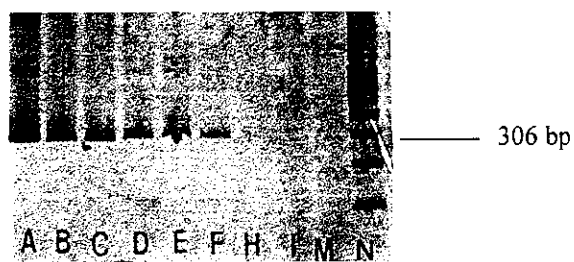


Figura 7. PAGE de fragmento 306 bp do DNA de *M. bovis* amplificado através da PCR com 2.5 mM MgCl₂. Canaletas, A-I) 10⁷-10⁰CFU/ml, M) controle, leite não contaminado e N) marcador 100 bp.



Figura 8. Efeito da concentração de DNA na amplificação. Canaletas; B) 50x10⁶pg/ml *M.bovis*, C)50 pg/ml *M.bovis* D)marcador 100 bp, E) 50x10⁶pg/ml *M. tuberculosis*, M) 500 pg/ml *M. tuberculosis*, R)50x10⁶pg/ml *S. aureus*.



Figura 9. Amplificação de diferentes DNAs com iniciadores BW6-BW7. PAGE do produto extraído em TBT e amplificado na condição padrão. A)indicador de peso molecular 100 bp B) DNA humano C) DNA bovino D) *S. aureus* E) *M. bovis* F) *M. avium* G) controle TBT amplificado sem DNA.

BW8-BW9

O conjunto de iniciadores BW8-BW9, foi utilizado na condição padrão para PCR frente ao produto extraído do leite contaminado nas concentrações 10^0 - 10^7 CFU/ml (Figura 10), resultando em amplificação nas concentrações 10^2 - 10^7 CFU. Também foi avaliado para condições de variação da concentração de $MgCl_2$ para 2,5 mM (Figura 4) e diminuição da temperatura de anelamento (Figura 4). Foram observadas bandas inespecíficas devido ao aumento de $MgCl_2$, mas com amplificação de produto na concentração 10^1 CFU/ml (Figura 11). Estudou-se ainda, a combinação de DNAs de *M. tuberculosis*, *M. bovis* com DNA de *S. aureus* (50 μ g de cada DNA) para PCR (Figura 12), resultando em um perfil de bandas diferenciado com a mistura dos dois DNAs que são normalmente amplificados pelos iniciadores BW.



Figura 10. PAGE de fragmento 248 bp de DNA *M. bovis* amplificado através da PCR com 2,0 mM $MgCl_2$. Canaletas; B-L) 10^7 - 10^0 CFU/ml X) controle de amplificação de leite sem *M. bovis* e A) indicador de peso molecular de 100 bp.

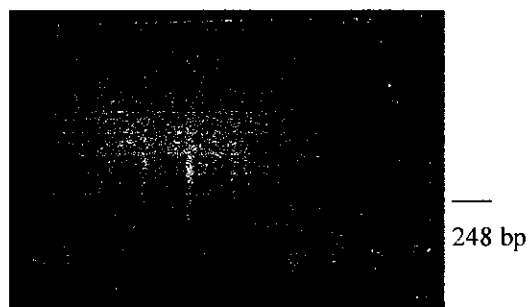


Figura 11. PAGE de fragmento 248 bp de DNA *M. bovis* amplificado através da PCR com 2,5 mM $MgCl_2$. Canaletas; H-T) 10^7 - 10^0 CFU/ml E) controle, leite não contaminado e A) marcador de peso molecular 100 bp.

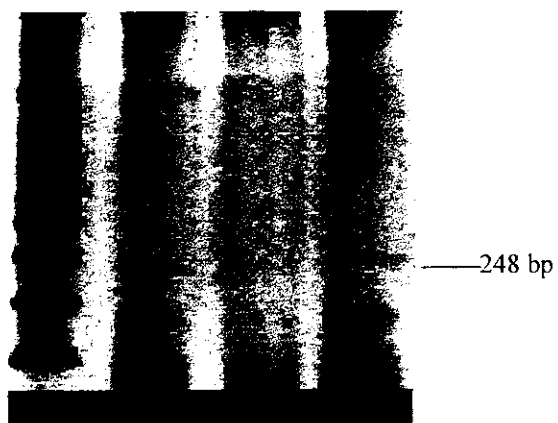


Figura 12. PAGE de fragmento 248 bp de DNAs *M. bovis*+*S. aureus* e *M. tuberculosis*+*S. aureus*. Mix de 50 ng de DNA de cada microrganismo e submetidos à PCR com iniciadores BW8-BW9, sendo respectivamente A) marcador 100 bp, K) *M. bovis*+*S. aureus*, L) controle negativo de TBT, M) *M. tuberculosis*+*S. aureus*

A combinação de diferentes pares de iniciadores (Figura 13), condições de temperatura e tempos de anelamento resultou em amplificação de fragmentos inespecíficos, mas com perfil diferenciado para cada combinação.



Figura 13. PAGE de produtos de PCR de DNA de *M. bovis* amplificado com diferentes combinações de iniciadores. Canaletas; A) 100 bp, B) controle TBT sem DNA, C) BW6+BW7 +TB1+TB2, 68°C/60 s, D) BW6+ BW7+BW8+BW9, 68 °C/60 s, E) BW6+BW7 na condição padrão como controle, F) TB1+TB2+BW8+BW9, 60°C, 2 min, G) BW6+BW7+TB1+TB2, 60°C/120 s, H) TB1+TB2+BW8+ BW9, 68°C/60 s.

Southern blot e dot blot

A confirmação da amplificação integral da seqüência-alvo da concentração 10^2 CFU/ml do produto de PCR obtido com iniciadores BW8-BW9 (248 bp) e BW6-BW7 (306 bp) foi realizada por hibridização com sonda radioativa marcada com P^{32} gama ATP (BW8) e pode ser visualizada na Figura abaixo nas letras C e D. A utilização do produto de PCR da concentração 10^2 CFU/ml deve-se ao fato de ser este o limite detectado em PAGE nos experimentos realizados. O dot blot, realizado em tiras de membrana de nylon, está representado pelas letras E, F, G onde observa-se hibridização com a sonda BW8 no limite de $0,5\mu\text{l}$, diluição 10^{-2} , para o produto da PCR *M. bovis* 10^2 CFU/ml (10^{-2}). Nas diluições 10^{-3} , 10^{-4} com o volume de $0,5\mu\text{l}$ não houve hibridização.

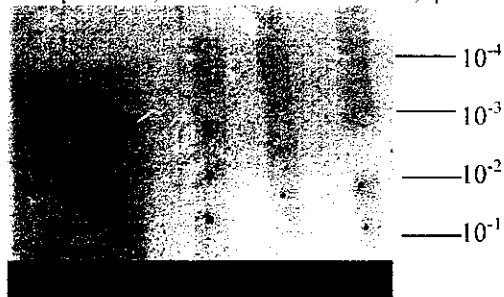


Figura 14. Hibridização de DNA de *M. bovis*

- A) controle negativo, leite amplificado sem DNA *M. bovis*
 B) controle positivo, iniciador BW8 identificado com sonda radioativa BW8
 C) fragmento 248 bp amplificado de leite contaminado *M. bovis* 10^2 CFU/ml e identificado por sonda radioativa BW8
 D) fragmento 306 bp amplificado de leite contaminado *M. bovis* 10^2 CFU/ml e identificado por sonda radioativa BW8
 E) dot-blot: $2\mu\text{l}$ de produto amplificado *M. bovis* com BW6-BW7 da concentração 10^2 CFU e diluído 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}
 F) dot-blot: $1\mu\text{l}$ de produto amplificado *M. bovis*, BW6-BW7, 10^2 CFU/ml, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}
 G) dot-blot: $0,5\mu\text{l}$ de produto amplificado *M. bovis*, BW6-BW7, 10^2 CFU/ml, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}

5 DISCUSSÃO

A tuberculose nos bovinos é diagnosticada comumente através de teste alérgico ou por técnicas laboratoriais. O teste alérgico também denominado tuberculinização, consiste na injeção intradérmica de PPD (proteína purificada digerida, produzida a partir de *M. bovis* amostra AN5) no pescoço do animal ou na prega ano-caudal. Outra alternativa mais sensível é o teste intradérmico comparativo, que consiste na inoculação simultânea de 0,1 ml de turberculina aviária (25.000 U.I./ml) produzida a partir de *M. avium* (amostra D4ER) e 0,1 ml de tuberculina bovina (50.000UI/ml) na região do pescoço do animal com 15 cm de distância entre si. A leitura, após 72 horas, é baseada na avaliação de hipersensibilidade cutânea. Este método clínico de diagnóstico da tuberculose em bovinos tem sido utilizado no Brasil por diversos autores para levantamento sanitário de rebanhos (Leite et al., 1978; Langenegger et al., 1991; Kantor et al., 1994; Dickel et al., 1995; Pardo et al., 1997). Apesar de ser uma técnica consagrada para identificação de bovinos tuberculosos, está sujeita em casos isolados à reações inespecíficas e cruzadas (Lagenegger et al., 1981) além de não identificar os casos de tuberculose exclusivamente mamaría e animais debilitados que tenham seu sistema imune celular comprometido. As técnicas laboratoriais mais utilizadas são técnicas de identificação direta da micobactéria através de baciloscopia, inoculação em animais sensíveis, cultura microbiológica e constituintes celulares (PCR, sondas moleculares e cromatografia). As técnicas de identificação sorológica não tem aplicação para o leite. A aplicação da baciloscopia ao leite ocorre geralmente de forma indireta após a inoculação do leite contaminado em animais de laboratório (Sinha, 1994). Estes animais ao serem sacrificados apresentam processos infecciosos locais e ganglionares que ao exame microscópico corados por Ziehl-Neelsen ou auramina-rodamina podem apresentar bacilos tipo micobacteriano. Esta técnica, assim como a cultura microbiológica necessita mais de 30 dias para fornecer resultados. A cultura bacteriológica é o método referência e teste definitivo para a confirmação do diagnóstico de tuberculose-doença porém, é um procedimento extremamente lento que pode levar até mesmo dois ou três meses para sua conclusão. A sensibilidade da cultura não é de 100%, e culturas falso-negativas podem ocorrer. Perdas por contaminação dos cultivos por outros microrganismos e/ou processos de descontaminação a base de ácidos (HCl), álcalis (NaOH) e/ou mucolíticos (duodecil sulfato de sódio e N-acetil L cisteína) somado a sucessivas centrifugações implicam sempre em perda da viabilidade celular (Sepkowitz et al., 1995). Para identificação de micobactérias no leite, Kantor (1979) recomenda a utilização do método do laurilsulfato de sódio(SDS) por sua ação detergente no tratamento das amostras de leite semeando em seguida a amostra em meio de cultura Löwenstein-Jensen(LJ).

A aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para diagnóstico de microrganismos no leite, verifica-se através diversos trabalhos citados por Pfeffer et al. (1995), quando constata a aplicação de técnicas de amplificação de DNA em diagnóstico de microrganismos de interesse veterinário.

Os resultados obtidos neste trabalho, confirmam a técnica da PCR como um processo rápido de síntese enzimática *in vitro* que permite a geração exponencial de seqüências gênicas específicas a partir de misturas simples ou complexas de RNA ou DNA. A reação básica tem como componentes, um DNA que contém uma seqüência específica de nucleotídeos a ser amplificado (DNA molde ou DNA alvo), os 4 desoxirribonucleotídeos tri-fosfato presentes em excesso, uma DNA polimerase e um par de oligonucleotídeos sintéticos complementares à regiões adjacentes a região a ser amplificada, equilibrados por um tampão adequado. A reação consiste basicamente em uma alteração sucessiva e cíclica de temperaturas nas quais o DNA será desnaturado, os iniciadores se anelarão a estas fitas desnaturadas e a fita molde de DNA será copiada. Em função deste processo detectou-se a micobactéria na concentração de 10^2 CFU/ml em leite artificialmente contaminado.

O envelhecimento do cultivo de micobactérias aumenta a deposição de micosídeos ao nível da parede celular que, fornecem à micobactéria características semelhantes ao encapsulamento dificultando a extração de DNA (Grange, 1996). A CFU, conforme a bibliografia consultada (Hance et al., 1989; Buck et al., 1992; Yajko et al., 1995 Grant et al., 1996), parece ser o método preferencial para medir concentração de micobactérias viáveis. Para evitar então, os prejuízos inerentes ao envelhecimento da cultura, foram selecionadas para a coleta de amostras, culturas recentes em LJ (oito dias) do *M. bovis* AN5.

Alguns autores (Kolk et al., 1992; Noordhoek et al., 1994; Wayne, 1994) utilizam a espectrofotometria para testes de concentração de micobactérias, mas certamente este método exige uma rígida padronização de meio de cultura, tempo de cultivo, protocolo de homegeinização, aferição e espectrofotômetro.

Em amostras de leite, a extração e quantificação do DNA de *M. bovis* não podem ser seletiva, pois o DNA de outras células presentes no leite também são extraídos conjuntamente com DNA de *M. bovis*. A diferenciação destes DNAs dá-se somente no momento da PCR pela amplificação do fragmento do *M. bovis*. A concentração 10^1 CFU/ml continha 2 η g de ácido nucléico, certamente

resultado de DNAs das diversas células presentes no leite que impedem a quantificação específica do DNA micobacteriano.

Em testes preliminares de extração de DNA de *M. bovis* foi utilizado o processo de choque térmico que consiste em congelar a amostra em N₂ por cinco min seguido de imersão em banho-maria a 37°C/5 min, repetindo-se este ciclo por cinco vezes. Este processo mostrou-se eficiente somente para amostras recém cultivadas, pois após o congelamento da amostra em TBT e estocagem à -20 °C, isolou-se DNA somente até a diluição 10⁻³ (1 ng/ml). Ainda nos testes preliminares, foi utilizado a micobactéria em TBT na concentração de 10⁷ CFU/ml para extrair o DNA através de sonicação (Buck et al., 1992). Este processo envolve uma aferição do sonicador (emissor de ondas ultra sônicas) utilizado e da concentração de microrganismos da amostra. Amostras de concentrações e tempo de cultivo diversos exigem potências diferenciadas no aparelho para que haja rompimento da parede celular do microrganismo. Além disso, o excesso de sonicação pode levar a um fracionamento excessivo do DNA, prejudicando a PCR.

O uso da proteinase de origem vegetal (Salas et al., 1997), comprovou que a mesma não possui atividade DNase ou RNase, e pode ser aplicada em substituição a proteinase K em rotina (Boehringer, Mannheim, Germany). A principal vantagem desta enzima sobre a proteinase K, reside no fato de não ter sua atividade comprometida na presença de EDTA (inibidor de nucleases na PCR), ao passo que a proteinase K tem sempre sua atividade diminuída pelo EDTA.

Em função das particularidades da extração do DNA de *M. bovis* em leite, foram realizados testes de eficiência de extração. Foram utilizados os 3 métodos de extração, obtendo-se concentrações de DNA de *M. bovis* que variaram de 0,7 a 1,8 ng, medidos através de espectrofotometria, utilizando como padrão DNA de concentração conhecida. Quanto aos três métodos realizados, vale salientar que, no primeiro método; (alta concentração de proteinase e alta temperatura) o artifício de aumentar os volumes iniciais (Powell et al., 1993) com ácido acético 1% auxilia na desproteinização e na inibição de DNases. Seu ponto crítico é a necessidade de um longo período (oito horas) em incubação a 56°C. O segundo método; centrifugação do leite em alta rotação e extração do DNA com 6M de tiocinato de guanidina (Tola et al., 1997), apesar de prático envolve o uso de centrifuga de alta rotação (41,000 x g), o que limita seu uso somente para laboratórios que dispõe deste equipamento. O terceiro método, proteinase K e CTAB (Wards et al., 1995), envolveu várias etapas de lavagem e centrifugação

o que em rotina de laboratório pode levar a perda parcial ou total do DNA extraído.

Considerando que, não houve diferença nos perfis de amplificação entre os métodos de extração de DNA, a escolha para o protocolo padrão foi pelo primeiro método modificado (proteínase em altas concentrações, associadas a incubação em alta temperatura durante período prolongado). Este método, envolve menor manipulação do leite o que minimiza as perdas de DNA, viabilizando mais facilmente a sua aplicação em rotina.

Variações nas condições de temperatura e anelamento da PCR não lograram melhores resultados, demonstrando-se desta forma que as variações destas condições prejudica o desempenho da PCR com este par de iniciadores.

O conjunto de iniciadores TB1-TB2 (Hance et al., 1989; Walker et al., 1992) mostrou uma menor eficiência de amplificação nas condições testadas, por isto não foi utilizado em novos protocolos. Quanto aos iniciadores, BW6-BW7 e BW8-BW9, (Wards et al., 1995); foram originalmente utilizados de maneira combinada para a técnica de "Nested PCR". Nesta técnica são realizados dois PCRs consecutivos, primeiramente o fragmento maior é amplificado (306 bp) por BW6-BW7, seguindo-se de uma nova adição de reagentes com a inclusão do iniciadores BW8-BW9 que iram reamplificar um fragmento de 248 bp interno ao primeiro fragmento produzido (306 bp) pelos iniciadores BW6-BW7. Apesar desta modalidade (Nested PCR) aumentar a sensibilidade do diagnóstico, não foi adotada, pois o objetivo deste trabalho foi buscar uma prova simples, sensível e rápida para ser aplicada em rotina. Assim, a escolha do par de iniciadores para rotina, recaiu sobre BW6/BW7, particularmente por ser seu produto de amplificação mais estável frente as variações de condições como $MgCl_2$ e pela possibilidade de utilizarmos o iniciador BW8 como sonda interna para confirmar a identidade dos produtos amplificados por BW6/BW7. Os iniciadores BW8-BW9, frente ao aumento da concentração de $MgCl_2$ para 2.5 mM apresentaram bandas inespecíficas com amplificação de produto na diluição 10^1 CFU/ml, o que indica maior sensibilidade mas com menor especificidade. Outras condições estudadas para os iniciadores BW8-BW9, tais como o aumento da concentração de Taq polimerase, dNTPs e dos próprios iniciadores, foram variadas mas não foram obtidos melhores resultados.

A combinação de diferentes pares de iniciadores (Figura 13) e diferentes condições de stringência do anelamento teve como objetivo verificar o surgimento de um perfil diferenciado de amplificação. O resultado , amplificação de fragmentos inespecíficos, se associado com enzimas de restrição

poderá indicar um perfil diferenciado para espécies de *Mycobacterium*, tal qual é utilizado na técnica de "Multiplex PCR" (Liébana et al., 1996; Portillo et al., 1996; Herrera et al., 1996).

Nos protocolos de identificação por PCR com os iniciadores BW6-BW7 e BW8-BW9 foi detectada a presença de *M. bovis* até 10^2 CFU/ml correspondente 5 η g de DNA. Em situações clínicas de rotina, utilizando os iniciadores BW6-BW7, deverá ser sempre descartada a contaminação por *S. aureus* (Collins & Stephens, 1991), através da cultura em agar-sangue, pois o mesmo possui seqüências em seu DNA que podem ser amplificadas por este par de iniciadores. No entanto, estes iniciadores não possuem homologia com outros DNAs (humano, bovino, *E. coli*, *M. avium*) que podem estar presentes na amostra. A combinação de DNAs de *M. tuberculosis*, *M. bovis* com DNA de *S. aureus* (50 η g de cada DNA) para PCR com iniciadores BW8-BW9, passível de ocorrer em situações clínicas, demonstrou um perfil de fragmentos diferenciado (amplificação de fragmento de 150 bp) nas condições estabelecidas, indicando a possibilidade de diferenciação quando da ocorrência de contaminações por *S. aureus* no leite através da técnica de "Multiplex PCR" (Liébana et al., 1996; Portillo et al., 1996; Herrera et al., 1996)

A hibridização com o fragmento de 248 bp, naturalmente tem validade relativa, pois mede a homologia entre a sonda e o produto formado pelo iniciador BW8, ao passo que a hibridização com o fragmento 306 bp (BW6-BW7), demonstra indiscutivelmente a presença do DNA de *M. bovis*. O uso da hibridização direta em membrana de nylon (dot blot) com diluições do produto de PCR da concentração 10^2 CFU/ml confirmou a eficiência de amplificação. Certamente, nos experimentos por dot blot, não há caracterização por tamanho do produto amplificado (bp), mas é um protocolo mais rápido e com semelhante sensibilidade ao Southern blot, além de maior facilidade de técnica para situações de rotina de diagnóstico. As técnicas de hibridização com isótopos radioativos detectam quantidades de DNA inferiores a < 1 μ g (Meinkoth & Wahl, 1984), mas estes níveis somente foram reproduzíveis nos experimentos realizados se consideramos o dot blot onde, onde com volume de 0,5 μ l e diluição 10^{-2} obteve resultados positivos para hibridização.

6 CONCLUSÃO

Nas condições estabelecidas de trabalho, a PCR com iniciadores BW é capaz de identificar *M. bovis* em leite no limite de 10^2 CFU em um prazo de 48 h. Detecta-se desta forma, a maioria dos casos clínicos de TB mamária que, situam-se entre 5×10^2 e 5×10^5 micobactérias/ml de leite.

Summary

We developed a simple method for DNA extraction of *Mycobacterium bovis* in artificially infected milk to be used in diagnosis by the polymerase chain reaction (PCR). We compared the amplification pattern with set primers TB1-TB2 that yields a 383 bp fragment, set primers BW6-BW7 and BW8-BW9 that amplified a 306 bp and 248 bp, respectively. Set primers, BW6-BW7 and BW8-BW9 amplified fragments present in six copies (IS1081) in strains of *M. bovis*. Using this procedure, we detected until 10^2 CFU/ml or 5 μ g of pure DNA. The method can be used for the routine diagnosis of *Mycobacterium bovis* in milk samples.

Key words: PCR, diagnosis *Mycobacterium bovis*, milk

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUCK, G. E., O'HARA L., SUMMERSGILL. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.7, p. 1331-1334, 1992.
- COLLINS, D.M., STEPHENS D.M. Identification of na sequence, IS 1081, in *Mycobacterium bovis*. **FEMS Microbiol Lett**, v.83, n. 11/16, p.11-16, 1991
- DICKEL, E. L., FALLEIRO, F. R., MESSINA, S. A. Controle sanitário do rebanho leiteiro de Passo Fundo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, 1996, Goiânia. **Anais**: Goiânia, 1996, p.79-80.
- ERLICH, H.A., GELFAND, D., SNINSKY, J.J. Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. **Science**, v.252, n.76, p. 1643-1651, 1991.
- GRANGE, J.M. The biology of the genus *Mycobacterium*. **J. Appl. Bacteriol.** v.81, n.1, p. 01S-09S, 1996.
- GRANT, I. R., BALL, H. J., NEILL, S. D. et al. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, n.2, p.631-636, 1996.
- HANCE, A.J., GRANDCHAMP, B., FRÉBAULT, V.L. et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. **Mol. Microbiol.**, v.3, n.3-7, p.843-849, 1989.
- HERRERA, E.A., PÉREZ, O., SEGOVIA, M. Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by a multiplex-polymerase chain reaction. **J. Appl. Bacteriol.**, v.80, n. 12, p.596-604, 1996.
- KANTOR, I.N., RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the caribbean: current status, control and eradication programs. **Vet. Microbiol.**, v.40, n.32, p.5-14, 1994.
- KOLK, A. H.J., SHUITEMA, A.R.J., KUIJPER, S. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.10, p.2567-2575, 1992.

- KOX, L.F.F., RHIENTHONG, D., MIRANDA, A.M. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.3, p.672-678, 1994.
- LANGENEGGER, J., LANGENEGGER, C.H., MOTA, P.M.P.C. et al. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. **Pesq. Vet. Bras.** v.1, n.4, p. 145-150, 1981.
- LANGENEGGER, J., LEITE G.O., OLIVEIRA J. Tratamento intermitente da tuberculose bovina com isoniazida. **Pesq. Vet. Bras.** v.11, n.3/4, p. 55-59, 1991.
- LEITE, R.C., MOTA, P.M., DINTZ, C.C., et al. Incidência da tuberculose bovina em rebanhos produtores de leite tipo "B". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 16, 1978, Salvador. **Anais:** Salvador, 1978, p.18.
- LIÉBANA, E., ARANAZ, A., FRANCIS, B., COUSINS, D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n.4, p. 933-938, 1996.
- MEINKOTH, J., WAHL, G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. **Anal. Chem.** v.138, n.2, p.267-284, 1984.
- MILLAR, D., FORD, J., SANDERSON J. et al. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, n.9, p. 3446-3452, 1996.
- NOORDHOEK, G., KOLK, A., BJUNE, G. et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.2, p.277-284, 1994.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Health conditions in the Americas.** Washington: PAHO/WHO, 1991, v.1 (Scientific publication, 524).
- PARDO, R.B., LANGONI, H., MENDONÇA, L.J.P., KUNG, D.C. Pesquisa de microrganismos do gênero *Mycobacterium* sp. no leite de vacas tuberculosas e avaliação deste alimento como veículo de zoonoses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, 1997, Rio de Janeiro. **Anais:** Rio de Janeiro, 1997. p. 120.
- PFEFFER, M., WIEDMANN, M., BATT, C.A. Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics. **Vet. Res. Commun.** v.19, n.5, p.375-407, 1995.

- PIERRE, C., LECOSSIER D., BOUSSOUGANT Y. et al. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, n.4, p.712-717, 1991.
- PORTILLO, P.D., THOMAS, M.C., MARTÍNEZ, E. et al. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.2 p.324-328, 1996.
- POWELL, H.A., GOODING, C.M., GARRETT, S.D., LUND, B.M., McKEE, R.A. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 18, n. 1, p. 59-61, 1994.
- RODRIGUEZ, J. G., MEJIA, G., PORTILLO, P. D. et al. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology** v.141, n.32, p.2131-2138, 1995.
- SALAS, C.E., MOUTIM, V., GARCIA, O. et al. Characterization of two proteinases composing latex from *Carica camadamarcensis*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM PERPECTIVES ON PROTEIN ENGINEERING, 6, 1997. **PROCEEDINGS**. Norwich: United Kingdom, 1997.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.41, 487-491, 1988.
- SAIKI, R.K. The design and optimization of the PCR. In: ERLICH, H.A.(ed.) **PCR Technology, principles and applications for DNA amplification**. New York: Stockton Press. 1989. p. 7-16.
- SAMBROOK, J., FRISTSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning:a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, p.11.48-11.51.
- SEPKOWITZ, K., RAFFALLI, J., RILEY, L. et al. Tuberculosis in the AIDS era. **Clin. Microbiol. Rev.** , v.8, n.2, 180-199, 1995
- SINHA, R. N., 1994. **The significance of pathogenic microorganisms in raw milk**. Brussels: International Dairy Federation, 1994.p.117-167. (Ref. S.I. 9405).
- TOLA S., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M. et al. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v.54, n. 1, p.17-22, 1997.
- WALKER, D., TAYLOR, I.K., MITCHELL, D. M. et al. Comparison of polymerase chain reaction amplification of two mycobacterial DNA sequences, IS6110 and the 65 kDa antigen gene, in the diagnosis of tuberculosis. **Thorax**, v.47, n.3, p.690-694, 1992.

- WAYNE L.G. Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* for research purposes. In: Bloom, B.R.(ed). **Tuberculosis, pathogenesis, protection, and control**. Washington: Asm. 1994. p. 73-83.
- WARDS, B. J., COLLINS D. M., LISLE G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v.43, n.2, p.227-240, 1995.
- WILLEMS, H., THIELE, D., FRÖLICH-RITTER, R. et al. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). **J. Vet. Med Ser. B**, v.41, n.4, p.580-587, 1994.
- YAJKO D.M., WAGNER C., TEVERE V.J. et al. Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the amplicor PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.1944-1947, 1995