

Mariana Lázaro Sales

Identificação de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* por PCR

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Marcos Bryan Heinemann

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2012

S163i Sales, Marina Lázaro, 1986-
Identificação de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* por PCR /
Marina Lázaro Sales. – 2014.

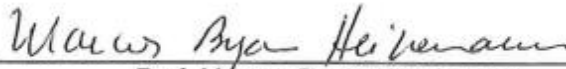
62 p. : il.

Orientador: Marcos Bryan Heinemann
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Tuberculose em bovino – Teses. 2. Tuberculose humana – Teses.
3. Micobacterias – Identificação – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses.
I. Heinemann, Marcos Bryan. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 699 5


Dissertação defendida e aprovada em 25 de maio de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Marcos Bryan Heinemann
Presidente



Profª. Ana Claudia Pinto Cottorello



Prof. Andrey Pereira Lage

Agradecimentos

Ao meu pai (*in memoriam*) e minha mãe por todo o apoio, carinho e educação que vocês me deram.

Aos meus irmãos pela carinho e companheirismo.

A minha avó Lilia (*in memoriam*), tia Ana, tio Paulo, tia Magali e tia Beata (*in memoriam*), por terem participado da minha criação e darem todo o apoio que preciso.

Aos meus primos por todo o carinho.

A todos os meus amigos com que construí uma grande família.

A Saulo (*in memoriam*) por ter feito parte da minha vida.

Ao meu orientador Marcos Bryan e a Antônio (Junim), por todos os ensinamentos e por todo o apoio que tive, principalmente no momento em que mais precisei.

Aos membros da banca que aceitaram contribuir neste trabalho.

A todos do LANAGRO/MG pelo carinho, ajuda e amizade.

A todos do LBM pela ajuda, incentivo, amizade e carinho.

A todos do DDB, em especial a Andrea Padilha, pelo apoio e ajuda.

Ao Dr. Marcio Roberto Silva por ceder as amostras de *Mycobacterium tuberculosis*.

Ao CNPq, LANAGRO e MAPA pelo auxílio financeiro no desenvolvimento do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	10
Capítulo 1	11
Uma visão do diagnóstico de tuberculose bovina	11
Introdução	11
Diagnóstico in vivo.....	12
<i>Diagnóstico Clínico</i>	12
<i>Diagnóstico Imuno-alérgico</i>	12
<i>Interferon gama (INF-γ)</i>	14
Diagnóstico post mortem.....	14
<i>Anatomo-histopatológico</i>	14
<i>Isolamento Bacteriano</i>	15
<i>Testes moleculares</i>	18
Considerações finais	20
Referências Bibliográfica	20
Capítulo 2	28
Avaliação de marcadores moleculares para o diagnóstico de <i>Mycobacterium bovis</i>	28
Resumo	28
Introdução	28
Materiais e Métodos	29
<i>Amostras</i>	29
<i>Desenho dos Iniciadores</i>	30
<i>PCR</i>	30
Resultados.....	32
Discussão	33
Conclusão	35
Referências Bibliográficas.....	36
Capítulo 3	39
PCR em tempo real para identificação de <i>Mycobacterium bovis</i> em amostras de colônias bacterianas.	39
Resumo	39
Introdução	39
Material e método	40

<i>Desenho dos Iniciadores</i>	40
<i>Amostras</i>	40
<i>Extração do DNA</i>	41
<i>Critérios</i>	41
<i>Padronização da PCR em tempo real (qPCR)</i>	41
<i>Eficiência da reação</i>	41
<i>Limite de Detecção (LD)</i>	42
<i>Repetitividade e Reprodutibilidade</i>	42
<i>Robustez</i>	42
<i>Análise Estatística</i>	42
Resultados.....	43
<i>Eficiência da Reação</i>	43
<i>Limite de Detecção</i>	43
<i>Repetibilidade e reprodutibilidade</i>	44
<i>Robustez</i>	45
Discussão	45
Conclusão	49
Referências Bibliográficas.....	49
Capítulo 4	52
PCR em tempo real para caracterização de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em amostras de suspensão bacteriana.....	52
Resumo	52
Palavras chaves: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , diagnóstico, gene Rv151, suspensão bacteriana.....	52
Introdução.....	52
Material e Método	53
<i>Desenho dos Iniciadores</i>	53
<i>Amostras</i>	54
<i>Extração do DNA</i>	54
<i>Critérios</i>	54
<i>Padronização da PCR em tempo real (qPCR)</i>	55
<i>Eficiência da reação</i>	55
<i>Limite de Detecção (LD)</i>	55

<i>Repetitividade e Reprodutibilidade</i>	55
<i>Robustez</i>	55
<i>Análise Estatística</i>	55
Resultados.....	55
<i>Limite de Detecção</i>	56
<i>Repetitividade e reprodutibilidade</i>	56
<i>Robustez</i>	57
<i>Análises estatísticas</i>	58
Discussão	59
Conclusão	60
Referencia	60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Gráfico comparativo entre o número de amostras de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* que amplificaram para cada iniciador testado..... 33
- Figura 2 Derivada da curva de desnaturação (temperatura de melting) mostrando a variação específica da temperatura para a qPCR Mbovis-100, entre 91,58°C e 92,53° C. 43
- Figura 3 Curva de eficiência da qPCR Mbovis-100 produzida a partir da diluição em 1/10 da amostra controle *M. bovis* AN5 CRNC 02. a) Curva de amplificação das diluições do DNA; b) Disposição dos pontos da curva de eficiência em uma reta. Eixo x representando a quantificação do DNA e eixo y, o ciclo de *threshold* – ou linear (Ct).44
- Figura 4 Curva de amplificação (a e c) e derivada da temperatura de melt (b e d) das qPCR Mbovis-100 com os Kits “2.0X RealQ-PCR Master Mix com Sybr Green” (Neobio, Brasil) (a e b) e “Fast-Plus EvaGreen qPCR Master Mix” (Biotium, EUA) (c e d). A: amostra de *M. tuberculosis*; B: NTC; C: amostras de *M. bovis* 46
- Figura 5 Derivada da curva de desnaturação (curva de melting) mostrando a variação específica da temperatura para a qPCR Mtub-115. As setas indicam amostras de *M. bovis* com picos inespecíficos..... 56
- Figura 6 Derivada da curva de desnaturação (dF/dT versus Temperatura) das amostras positivas e negativas utilizadas na Robustez 1 (a) e Robustez 2 (b) para a qPCR-Mtub-115. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Perfil do resultado bioquímico para caracterização do <i>M. avium</i> , <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> através de testes bioquímicos.....	18
Tabela 2 Oligonucleotídeos desenhados e citados na literatura para a detecção do <i>Mycobacterium bovis</i>	31
Tabela 3 Descrição das condições de amplificação para o diagnóstico no <i>Mycobacterium bovis</i>	32
Tabela 4 Análise estatísticas dos dados obtidos para a diferenciação do <i>Mycobacterium bovis</i> e <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para cada iniciador testado, com intervalo de segurança de 95%.	33
Tabela 5 Resultado da média do ciclo de threshold (Ct), e seu respectivo desvio padrão (DP) para a curva de diluição em 1/10 da amostra controle <i>M. bovis</i> AN5 CRNC 02 da qPCR Mbovis-100.	44
Tabela 6 Valores da média da curva de melting (md) para cada amostra, realizada em três dias consecutivos na qPCR Mbovis-100 para repetibilidade (1ª analista) e reprodutibilidade (2ª analista).....	44
Tabela 7 Variação da temperatura do pico de melting apresentados nos testes de robustez da qPCR Mbovis-100.....	45
Tabela 8 Resultado da média do ciclo de threshold (Ct), e seu respectivo desvio padrão (DP) para a curva de diluição em 1/10 da amostra controle <i>M. bovis</i> AN5 CRNC 02 da qPCR Mbovis-100.	56
Tabela 9 Valores da média da curva de melting (md) para cada amostra, realizada em três dias consecutivos na qPCR Mtuberculosis-115 para repetibilidade (1ª analista) e reprodutibilidade (2ª analista).....	57
Tabela 10 Variação da temperatura do pico de <i>melting</i> apresentados nos testes de robustez para qPCR-Mtub-115.....	57

RESUMO

O *Mycobacterium bovis* e o *Mycobacterium tuberculosis* são os agentes causadores da tuberculose bovina e humana, respectivamente. O diagnóstico padrão se baseia no isolamento bacteriano e a identificação das colônias através de métodos bioquímicos. Estas metodologias além de serem onerosas, requerem um ambiente com alto nível de biossegurança e um grande tempo de cultivo e testes para obtenção dos resultados. Os testes moleculares baseados nos princípios da PCR em tempo real utilizando-se o fluoróforo Eva Green foram eficientes na identificação do *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Além disso, foram realizadas análises com iniciadores e marcadores moleculares, descritos na literatura, capazes de diferenciar o *M. bovis* do *M. tuberculosis* por PCR. Os resultados mostraram que alguns dos marcadores moleculares são encontrados em ambos os micro-organismos. O trabalho dessa dissertação permitiu o desenvolvimento de técnicas de PCR em tempo real capazes de identificar colônias de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, em substituição aos testes bioquímicos.

Palavra-chave: Tuberculose, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, PCR, marcadores moleculares

ABSTRACT

Mycobacterium bovis and *Mycobacterium tuberculosis* are the causative agents of bovine and human tuberculosis, respectively. The standard diagnosis is based on the isolation and identification of bacterial colonies through biochemical methods. These methodologies in addition to being costly, require an environment with high level of biosecurity and a great time of cultivation and tests to obtain the results. The molecular tests based on the principles of real-time PCR using the fluorophore Eva Green were efficient in the identification of *M. bovis* and *M. tuberculosis*. In addition, analyses were performed with primers and molecular markers, described in the literature, able to differentiate the *M. bovis* of *M. tuberculosis* by PCR. The results showed that some of the molecular markers are found in both microorganisms. The work of this dissertation has enabled the development of real-time PCR techniques able to identify colonies of *M. bovis* and *M. tuberculosis*.

Keywords: tuberculosis, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, PCR, molecular markers

Capítulo 1

Uma visão do diagnóstico de tuberculose bovina

Introdução

A tuberculose bovina (TB) é uma enfermidade infectocontagiosa, de caráter crônico debilitante que se caracteriza pelo desenvolvimento de nódulos de tecido de granulação causada pelo *Mycobacterium bovis*. Esta enfermidade tem um importante papel econômico e zoonótico. As perdas econômicas geradas pelo animal tuberculoso estão relacionadas à queda na capacidade produtiva, além do descarte de carcaças infectadas, bem como a perda de mercado na exportação de carne bovina (Alves et al., 2008; Kantor e Ritacco, 1994).

Assim como a tuberculose humana, a doença bovina assumiu grande importância em todo mundo, com destaque para os países em desenvolvimento. Como zoonose, suspeita-se que a infecção pelo *M. bovis* seja responsável por aproximadamente 1% dos casos de tuberculose humana descritos nos países em desenvolvimento (Kantor et al., 2008). A infecção naturalmente é transmissível do gado para humanos diretamente pela via aerógena entretanto, a principal fonte de transmissão da doença é realizada através do leite e seus derivados não pasteurizados provenientes de animais tuberculosos (Ashford et al., 2001). Sinha (1994) e Zanini et al. (1998) demonstraram que vacas com infecção clínica e subclínica podem excretar de 5×10^2 a 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) de *M. bovis* por mL de leite.

Os seres humanos parecem ser tão susceptíveis a *M. bovis* quanto ao *Mycobacterium tuberculosis*, principal causador da tuberculose humana (Huchzermeyer et al., 1994). Atualmente o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e

outros tipos de imunossupressão, ocasionadas por fatores como, quimioterapia ou transplantes de órgãos, são associados ao aumento no risco da ocorrência da tuberculose em humanos (Mattos et al., 2006; Murakami et al., 2009). Acredita-se que este aumento no risco ocorre também no caso das infecções ocasionadas por *M. bovis* em seres humanos (O'Reilly e Daborn, 1995). O surtos de *M. bovis* multirresistente (MDR) em pacientes hospitalizados com HIV (Samper et al., 1997) demonstrou que a tuberculose zoonótica ressurgiu no Estados Unidos da América fronteira com o México entre os imigrantes de regiões onde a tuberculose bovina é endêmica (Dankner et al. 1993, Dankner e Davis 2000, LoBue et al. 2003, Rodwell et al. 2010).

São conhecidas mais de 50 espécies de micobactérias, classificadas por diferentes critérios. Quanto à patogenicidade, estão divididas em tuberculosas e não tuberculosas. As tuberculosas são às espécies causadoras de doenças granulomatosa tanto no homem como nos animais. São elas *M. tuberculosis* e *M. africanum* (causadores da tuberculose humana, sendo o segundo encontrado na África), *M. bovis* (causador da tuberculose em bovinos), *M. avium* (responsável pela tuberculose em aves e em suínos) e *M. microti* (agente etiológico da tuberculose em roedores). As micobactérias não tuberculosas são denominadas *mycobacteria other than tuberculosis* (MOTT) (Heinemann et al., 2008).

Programas de controle da tuberculose nos rebanhos em países industrializados foram criados e implantados no início do século passado. Nos Estados Unidos o programa foi estabelecido em 1917 e a estratégia mais

importante era a inspeção da carne em matadouros para detectar o gado tuberculoso. No Canadá o programa foi criado em 1923, mas a inspeção de carcaças já era realizada desde 1907 (Essey e Koller, 1994).

Em 2001, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) com o objetivo de baixar a prevalência e a incidência da brucelose e da tuberculose e certificar um número elevado de estabelecimentos de criação, nos quais o controle e erradicação destas enfermidades sejam executados com rigor e eficácia, objetivando aumentar a oferta de produtos de baixo risco para a saúde pública. Desta forma, promovendo a competitividade da pecuária nacional e diminuindo o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal (Normativa n.º 2 de janeiro de 2001).

Para o sucesso de um programa de controle e erradicação da tuberculose são necessárias a utilização de metodologias de diagnóstico da doença e a caracterização do agente de forma eficiente. Com o avanço da ciência, várias formas de diagnóstico foram desenvolvidas e uma grande variedade de métodos tem sido utilizada. Além disso, a biologia molecular trouxe novos esclarecimentos sobre o genoma das micobactérias. A presente revisão tem como objetivo realizar um levantamento crítico dos principais meios de diagnóstico da tuberculose bovina.

Diagnóstico *in vivo*

Diagnóstico Clínico

A tuberculose pode causar uma grande diversidade de sinais clínicos. Muitos animais infectados apresentam pouco, se algum, sinal clínico, enquanto outras demonstram sintomatologia amplamente

diferenciada por causa da variação da localização da doença (Huchzermeyer et al., 1994). A principal manifestação clínica da tuberculose é o emagrecimento progressivo do animal que ocorre principalmente em bovinos com idade avançada. Podem ainda apresentar hiperplasia de linfonodos superficiais e/ou profundo, dispnéia, tosse, mastite e infertilidade, entre outros (Brasil, 2006). O apetite é variável e a febre flutuante, podendo ocorrer outras manifestações em função de órgãos afetados (Radostits et al., 2002; Smith, 2006).

Sempre haverá a necessidade do uso de técnicas complementares para o alcance de uma informação eficaz e completa. Diagnóstico imuno-alérgico é atualmente o principal método *in vivo* para o diagnóstico e controle da tuberculose.

Diagnóstico Imuno-alérgico

Na maioria dos rebanhos infectados por *M. bovis* a doença é inaparente e a sua presença é somente detectada pelo teste tuberculínico (Murakami et al., 2009). Pode-se revelar infecções incipientes a partir de 3 a 8 semanas da exposição ao *M. bovis* (Brasil, 2001). Para diagnóstico de rotina e triagem da tuberculose bovina, a tuberculinização é um método rápido, seguro, econômico, podendo aplicar-se também com resultados satisfatórios em suínos, caprinos e ovinos. Em equinos, cães e gatos a prova tuberculínica é pouco satisfatória (Mota et al., 2008).

As tuberculinas disponíveis para o diagnóstico presuntivo da tuberculose bovina são extratos antigênicos de proteínas purificadas, conhecidas como PPD (*purified protein derivative*), da amostra de *M. bovis* AN5 (PPD bovino) e amostra *M. avium* D4 (PPD aviário). Embora as tuberculinas sejam descritas como puras, elas são formadas por uma mistura complexa de proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos nucleicos, o que

inclui uma grande variedade de antígenos, alguns comuns a várias espécies de micobactérias (Monaghan et al. 1994), sendo este um fator que contribui para as reações inespecíficas.

O PNCETB preconiza a tuberculinização intradérmica pela prega caudal, cervical simples e comparada. O teste tuberculínico simples utiliza apenas a tuberculina bovina (teste da prega caudal - TPC ou o teste cervical simples - TCS), enquanto o teste cervical comparativo (TCC) utiliza as tuberculinas bovina e aviária de forma simultânea. O TCC tem uma especificidade analítica maior que os testes simples, pois permite distinguir infecção por *M. bovis* das MOTT (OIE 1992, Brasil 2003, Waters et al. 2003).

Tais testes foram desenhados para determinar a infecção específica por *M. bovis*. Por essa razão, a inoculação intradérmica de pequenas quantidades de antígenos micobacterianos gera em 72h uma reação de hipersensibilidade tardia no local, naqueles animais que responderam imunologicamente à infecção prévia por *M. bovis* (Monaghan et al. 1994).

Apesar de a tuberculinização ser um teste de fácil execução, é necessário que se observem alguns fatores na execução do mesmo para garantir a sua confiabilidade. O operador necessita ter treinamento específico e experiência na inoculação, leitura e interpretação dos testes. O PNCEBT prevê que antes da habilitação para a execução das atividades do programa, incluindo a tuberculinização, o médico veterinário necessita ser aprovado em um curso específico de habilitação. Além disso, o mesmo operador deve realizar a medida da dobra da pele no dia da inoculação da PPD e 72h depois, leitura do teste. Isto evita diferença entre observadores que poderiam introduzir um viés no teste (Brasil, 2006; Mota et al., 2008).

A sensibilidade do teste de tuberculinização varia entre 68%-95%, enquanto sua especificidade foi estimada entre 95%-99%. A sensibilidade pode ser afetada por fatores iatrogênicos (Correa e Correa, 1982). Animais em estágio adiantado da doença podem desenvolver o fenômeno da anergia, que é caracterizado pela ausência de reatividade no teste cutâneo tuberculínico, podendo ocasionar resultado falso-negativo interferindo no diagnóstico. Este fenômeno também pode ser observado em caso de infecção recente por *M. bovis*, entre os 30 e 50 dias finais da gestação, parto recente, desnutrição e uso inadequado de drogas imunossupressoras. Além disso, variações inerentes ao teste, cuidados com o armazenamento e conservação e a própria tuberculina utilizada, somado as possíveis variações nos métodos de realização, critérios de leitura e formas de interpretação do teste, podem contribuir para o aumento da ocorrência do resultado falso-negativo (Monaghan et al., 1994; Roxo, 1997). Mota (1985) mostrou que infecções por parasitas, como *Oesophagostomum radiatum*, podem carrear micobactérias atípicas encontradas normalmente na luz intestinal, podendo levar a sensibilização do bovino no teste de tuberculinização.

Há bovinos que, embora infectados, não reagem à tuberculinização devido a uma deficiência temporária do sistema imunitário, induzida por inoculações sucessivas de tuberculina ou aplicação de altas concentrações do antígeno, denominada dessensibilização. É um fenômeno de curta duração e cessa quando a população de linfócitos T é restabelecida. Em animais com tuberculose generalizada, ou em estágios finais da doença, há um excesso de antígeno circulante que induz uma imunossupressão específica e, por consequência, uma inibição da produção de citocinas necessárias à ativação de macrófagos participantes da reação de hipersensibilidade retardada (Brasil, 2001).

Interferon gama (INF- γ)

Respostas imunológicas a infecções por *M. bovis* em bovinos continuam a ser estudadas na tentativa de desenvolver melhores métodos ou métodos alternativos de diagnóstico, já que, o teste cutâneo, às vezes tem inconvenientes práticos. O teste interferon gama (INF- γ) é cada vez mais usado como um exame diagnóstico sanguíneo para tuberculose em bovinos e outros animais (por exemplo, cabra, búfalo). O teste de proliferação de linfócitos e ensaios imunoenzimático (ELISA), provou ser útil como teste auxiliar (para aumentar a especificidade) e paralelo (para aumentar a sensibilidade) em testes em cervo (OIE, 2009).

O INF- γ é uma citocina predominantemente liberada por linfócitos T após estimulação antigénica. INF- γ tem um papel importante na resposta imune à micobactéria tuberculosa, como o principal fator de ativação macrofágica. De 1 a 4 semanas pós-infecção, as células T do sangue periférico de gado, liberam quantidades mensuráveis de INF- γ que é detectado no plasma por ELISA de captura com anticorpo monoclonal (Wood et al. 1990, Waters et al. 2003, Rua-Domenech et al., 2006).

O desempenho diagnóstico avaliado em vários estudos verificou que a sensibilidade do teste INF- γ varia entre 73,0% e 100%, com um valor médio de 87,6%. A sua especificidade é de 96,6%, variando entre 85,0-99,6%. Estes resultados foram influenciados (entre outros fatores) pelas características das populações de rebanho em que o ensaio foi avaliado, os referentes valores de corte adotados para classificar os animais como teste positivo, o lote e fonte de tuberculina utilizados, o padrão ouro usado para determinar o verdadeiro *M. bovis* e o estado da infecção dos animais em estudo (Rua-Domenech et al 2006).

A especificidade diagnóstica do teste INF- γ é de 96,6%. No entanto, em um país ou região onde a prevalência de TB animal é baixa, como nos casos de países com programas de controle e erradicação adiantados, o resultado seria o abate de elevado número de cabeças de gado não infectadas (Pollock et al, 2001). Este é o principal argumento contra a implantação do teste em massa. Além disso, este teste é relativamente caro e a sua utilização levanta alguns problemas logísticos (Ameni et al, 2000). Portanto, a aplicação mais benéfica do teste INF- γ é como um auxiliar em rebanhos persistentemente infectados aos testes cutâneos, onde a remoção de um pequeno número de falsos positivos é uma preocupação secundária (Neill et al, 1994; Archetti et al, 1996;. Monaghan et al, 1997; Vordermeier et al., 2004).

Diagnóstico *post mortem*

Anatomo-histopatológico

O diagnóstico anatomo-patológico é realizado pela inspeção sanitária que tem um importante papel na detecção de rebanhos infectados e contribui ativamente para o sucesso dos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina principalmente nas regiões em que a doença apresenta uma prevalência muito baixa (Corner et al., 1990; Milian-Suazo et al., 2000). Segundo Corner (1994), a localização mais frequente das lesões pelo *M. bovis* são os linfonodos retrofaringal medial, mediastinal e bronquial seguido do pulmão.

Aproximadamente, 47% das carcaças infectadas são detectadas durante a inspeção sanitária de rotina (Corner, 1994). Esta baixa sensibilidade na detecção das lesões pela inspeção em abatedouro se deve ao fato que o objetivo principal do abate é manter a integridade da carne e detectar lesões que a tornam imprópria para o consumo (Paixão et al., 2008).

Nos estágios iniciais dos programas de controle da tuberculose, quando a prevalência da doença é alta, o diagnóstico da tuberculose pode ser realizado com base na detecção de lesões macroscópicas durante o exame *post mortem* bruto. Exames culturais são raramente necessários quando a frequência da doença é grande e o custo de um diagnóstico é negligenciável. Quando a prevalência da doença é baixa, já que durante as últimas fases de uma campanha de erradicação, a necessidade de um diagnóstico definitivo torna-se mais importante e cultura de rotina de todas as lesões suspeitas devem ser realizadas (Corner, 1994).

A presença de lesões granulomatosas típicas, durante a inspeção sanitária, é um indício da presença de *M. bovis*. No entanto, é necessária a realização de outras técnicas de diagnóstico para a caracterização do microrganismo presente na lesão (Hernandez de Anda et al., 1997). Infecções por fungos, *Rhodococcus equi*, actinobacilose, actinomycose, parasitas, abscessos, carcinomas e sarcomas podem desenvolver processos granulomatosos semelhantes aos de tuberculose (Mckenzie et al., 1979; Jensen et al., 1990; Hernandez de Anda et al., 1997).

O método histopatológico é rápido e barato. As lesões são do tipo granulomatosa com necrose central e, geralmente, apresentam calcificação (Paixão et al., 2008). A visualização é realizada pelo método de Ziehl-Nelsen. Esta técnica baseia-se na resistência que a bactéria tem na descoloração por álcool ácido, quando corada pela fucsina aquecida e observada em microscopia ótica. Desta forma os microrganismos que apresentam esta característica são chamados de álcool-ácidos resistentes (AAR) (Behmer et al., 1976). As micobactérias apresentam uma parede com alto teor de lipídeos e ácidos graxos saturados e insaturados, conhecidos como ácidos micólicos formando uma barreira

hidrofóbica que confere resistência à dessecação, à descoloração por álcool e ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos (Ratledge e Dale, 1999; Prescott, 2002). No entanto, outras bactérias dos gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* também compartilham tal característica (Correa e Correa, 1992), não sendo este o único critério para caracterização do *M. bovis*. Além disso, para melhor visualização, o método histológico exige uma grande concentração de bactérias (cerca de 10^4 bacilos por mL ou mais) para que se consiga visualizar o microrganismo (Wards et al., 1995).

Isolamento Bacteriano

A presença de lesões macroscópicas granulomatosas na inspeção de uma carcaça são características sugestivas de tuberculose. No entanto, o diagnóstico definitivo da tuberculose é realizado mediante o isolamento e identificação por meio da caracterização bioquímica para diferenciar o *M. bovis* de outros processos patológicos com alterações semelhantes, sendo este considerado o padrão ouro do diagnóstico (Brasil, 2006; Sakamoto et al., 2008).

O gênero *Mycobacterium* é altamente exigente no que se refere a nutrientes, quando comparados com outras bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e outras enterobactérias. As características dos meios de culturas para micobactérias facilitam a multiplicação mais rápida de contaminantes menos exigentes, tornando indispensável a aplicação de um tratamento das amostras previamente à tentativa de isolamento de micobactérias (Balian et al., 2002).

Para um bom crescimento do micobactéria é de grande importância a forma de envio da amostra a ser analisada. Países como o Brasil que apresentam grandes extensões territoriais e temperatura elevadas durante

grande parte do ano, tem na forma de acondicionamento e envio das amostras um ponto crítico no isolamento do *M. bovis*. A amostra deve estar em um frasco plástico bem vedado e de boca larga, encaminhado resfriado a 4-6°C em uma caixa de isopor com gelo e ser processada entre 24 e 48 horas. Quando isso não pode ser realizado, os espécimes devem ser congelados e mantidos a -20°C até o processamento no laboratório (Corner, 1994; Brasil, 2006).

Em decorrência da manipulação nos frigoríficos e devido a presença da microbiota natural do animal, o material enviado não é estéril. Devido a este fato, a descontaminação é um procedimento indispensável para o cultivo primário do *M. bovis*. Descontaminação envolve o uso de produtos químicos tóxicos para o qual micobactérias são geralmente mais resistentes do que os microrganismos contaminantes. Embora sua toxicidade para micobactérias varie, os produtos químicos geralmente diminuem o número de bacilos do *M. bovis* viáveis nas amostras (Corner e Trajstman, 1988). Na literatura são descritos vários métodos de descontaminação, como por ácido oxálico (Jorgensen, 1982), método Cloreto de hexadecil piridínio (HPC) (Whipple et al., 1991) e ácido sulfúrico 6% (Holanda, 2000).

A detecção de *M. bovis* é influenciada pela escolha dos meios de cultura, o descontaminante e da duração da incubação das culturas (Corner et al., 2012). As micobactérias crescem lentamente sendo aconselhada observação por no mínimo oito semanas (Kent e Kubica, 1985), sendo que o ideal é de 10 a 12 semanas (OIE, 2009). Corner et al. (2012) observou em seus experimentos a necessidade de um período de incubação de até 15 semanas para o diagnóstico conclusivo de *M. bovis*. O isolamento é geralmente realizado em meio sólido. Para o *M. bovis* é utilizado o meio Stonebrink e para o *M. tuberculosis* o meio Löwenstein-Jensen (Collins e Grange, 1983;

OIE, 2009). O *M. bovis* tem dificuldade em se desenvolver em meios com glicerina, e por este motivo se desenvolve melhor no meio de Stonebrink, onde o glicerol é substituído pelo piruvato de sódio. Para o isolamento primário do *M. bovis* nos meios sólidos, recomenda-se uma pequena concentração de CO₂ (não superior a 5%), já que o *M. bovis* é microaerófilo (Yajko et al., 1995).

Do ponto de vista diagnóstico, uma das principais desvantagens da cultura de micobactérias é o tempo necessário entre a semeadura, o surgimento de colônias macroscopicamente visíveis e a identificação bioquímica (Koneman et al., 2001). O aperfeiçoamento do método microbiológico convencional para um rápido diagnóstico representa uma grande vantagem na luta contra a tuberculose no homem e no bovino (Mejia et al., 1999) e tem considerável impacto no controle da doença no bovino (Corner, 1994). O meio Middlebrook 7H11 foi desenvolvido por Cohn e colaboradores, pela da adição de caseína ao ágar 7H10, otimizando o crescimento de estirpes de *M. tuberculosis* existentes, resistentes a fármacos, que tem crescimento reduzido em Ágar 7H10 (Cohn et al. 1968; Nolte e Metchock, 1995). Mejia et al. (1999) e Smoskovi e Magyar (1999) demonstraram as vantagens do diagnóstico da técnica de camada delgada que se baseia na observação precoce de microcolônias de micobactérias em placas com uma fina camada de meio de Middlebrook 7H11, frente ao método tradicional de cultivo em meios de Löwenstein-Jensen e Stonebrink. Esses trabalhos demonstraram significativa redução no tempo para observação das primeiras colônias com elevada sensibilidade em favor da técnica de camada delgada, além de permitir a identificação preliminar das micobactérias por suas características morfológicas.

Cousins et al. (1989) observaram que, apesar da precocidade em dias para o isolamento do

M. bovis no meio de Middlebrook 7H11 modificado, o número de colônias recuperadas foi inferior quando comparado aos meio de Stonebrink. A porcentagem dos isolamentos nos meios vai variar de acordo com o processo de descontaminação utilizada, para o meio Middlebrook 7H11 é observada uma média de 67% das amostras enquanto para o meio Stonebrink uma média de 73,7% (Corner et al., 2012). Marcondes (2002) e Corner e Nicolacopoulos (1988) concluíram que o método de Middlebrook 7H11 modificado deve ser utilizado simultaneamente com os métodos tradicionais de cultivo.

O meio líquido 7H9 de Middlebrook é mais utilizado para o isolamento de materiais de pacientes paucibacilares inclusive sangue. É o meio ideal para repiques, conservação de amostras congeladas, preparação de inóculos padrão e é o principal meio de cultura para os métodos automatizados (Brasil, 2005).

O sistema semi-automático BACTEC 460 TB[®] é um equipamento desenvolvido para o diagnóstico laboratorial de micobactérias, baseado na detecção de CO₂ liberado pelo metabolismo microbacteriano, durante o seu crescimento em meio líquido Middlebrook. O CO₂ é então aspirado do frasco de cultura e quantificado, determinando a positividade ou não de uma amostra. A desvantagem do método de cultura BACTEC 460 é que apresenta um risco de exposição à radiação e são relatados resultados falso-positivos entre 1,4% e 4%, pela contaminação por outros microrganismos durante a leitura pelo equipamento, além de um sério problema quanto ao descarte de material radioativo (Castilho Filho et al., 2004; Hines et al., 2006).

O sistema BACTEC MGIT 960[®] é bem difundido em centros de referência para o diagnóstico da tuberculose humana e se mostra mais sensível para a recuperação de *M. bovis* a partir de amostras clínicas (Hines

et al., 2006). O BACTEC MGIT 960[®] é não-radiométrico. Os tubos de cultura contêm um composto fluorescente, embebido em silicone, que é sensível à presença do oxigênio dissolvido no meio. Inicialmente, uma grande quantidade do oxigênio dissolvido extingue as emissões do composto e pouca fluorescência pode ser detectada. Posteriormente, microrganismos respirando ativamente no meio, consomem o oxigênio o que ocasiona a emissão da fluorescência e sua detecção pelo equipamento (Brasil, 2005).

Redução no tempo de preparo da amostra e observações do crescimento bacteriano é a vantagem mais importante deste sistema, pois é totalmente automatizado. Outros benefícios deste procedimento são o aumento da sensibilidade do meio de cultura líquida e a diminuição do tempo necessário para o crescimento (Hines et al., 2006). Em amostras clínicas com grande quantidade de bacilos, o resultado pode ser obtido a partir de cinco dias (American Thoracic Society, 2000). Em contrapartida, estudos realizados (Tortoli et al. 1999; Somoskovi e Magyar, 1999) mostram que as taxas de contaminação são quase o dobro (5%) das que ocorrem nos métodos clássicos que utilizam o meio de Lowenstein-Jensen (2,7%). Além disso, para a identificação da espécie, se faz necessário à transferência do crescimento micobacteriano para um meio sólido, ampliando sensivelmente o tempo de emissão do resultado (Lima et al., 2010).

Após o crescimento em meio sólido a bactéria é submetida a uma coloração pelo método de Ziehl-Nelsen. No entanto, este teste não é suficiente pois, as micobactérias compartilham com outros grupos a característica de serem bacilos álcool-ácido resistente (BAAR). Para a distinção e caracterização do *M. bovis* deve-se realizar provas bioquímicas. O acúmulo de niacina, a redução do nitrato a nitrito e produção de catalase, permite a caracterização do grupo das micobactérias. Provas bioquímicas

complementares podem refinar a identificação. O teste de sensibilidade a antibióticos pirazinamida (Pzase) e a capacidade da micobactéria de catalisar

uréia e liberar amônia, prova da uréase, separam *M. bovis* de *M. tuberculosis* (Jorge, 2001; Brasil, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1 Perfil do resultado bioquímico para caracterização do *M. avium*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* através de testes bioquímicos.

Perfil	Ziehl-Nelsen	Catalase TA	Catalase 68°C	Niacina	Nitrato	Pzase	Uréia
<i>M. avium</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	+	-	-	+	-
<i>M. bovis</i>	+	-	-	-	-	-	+

(+) presente, (-) ausente, (TA) temperatura ambiente, (Pzase) sensibilidade a antibióticos pirazinamida

Dentre os principais problemas na identificação das micobactérias quanto à espécie estão a diversidade de técnicas e testes que são necessários, além do tempo para identificação completa (Telenti et al., 1993). Conjuntamente, estes testes podem ser lentos, trabalhosos, imprecisos, não reprodutíveis, podem gerar um resultado ambíguo e necessitam de instalações adequadas (Huard et al., 2003).

Testes moleculares

As técnicas de biologia molecular podem ter grande aplicabilidade em laboratório de diagnóstico de doenças animais. O desenvolvimento de amplificação de segmentos de DNA abriu enormes perspectivas para detecção de agentes infecciosos. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) apresenta vantagens em comparação aos métodos tradicionais de diagnóstico: é altamente sensível, específica e rápida. Para se obter um diagnóstico positivo, são necessárias poucas células e estas não precisam estar viáveis. Amostras que são inadequadamente preservadas para o isolamento microbiológico, podem ser utilizadas no diagnóstico molecular (Abrahão, 1999; Narayanan, 2004).

A PCR em tempo real (qPCR) se baseia na utilização de compostos fluorescentes que geram um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Tem como vantagem uma maior precisão, reprodutibilidade, acurácia, melhor controle de qualidade no processo, menor risco de contaminação e descarta a necessidade do uso de eletroforese após a reação (Novais et al., 2004). Além disso, essa técnica reduz o tempo de diagnóstico para três ou quatro dias, fato importante em um processo trabalhoso e demorado como o diagnóstico microbiológico de tuberculose.

O *M. bovis* assim como o *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, Bacille Calmette-Guérin (BCG), *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii* pertencem ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). A alta semelhança genética entre os integrantes do MTBC torna difícil a distinção das micobactérias desse grupo. O genoma do *M. bovis* se assemelha em 99,95% com *M. tuberculosis*, apresentando colinearidade e nenhuma evidência de translocações extensas, duplicações ou inversões, sendo as deleções no DNA do primeiro o principal contribuinte para essas diferenças. Estudos evolutivos forneceram várias evidências para uma evolução de *M. bovis* como de *M.*

tuberculosis, partindo de outra espécie precursora comum, possivelmente a *M. canetti* (Brosch et al., 2002).

Várias regiões genômicas têm sido utilizadas para identificação e diferenciação das micobacterias. A técnica de PCRs para a detecção de *M. tuberculosis* começaram a serem desenvolvidas por volta de 1989, nas quais foram utilizados os genes da proteína do choque térmico de 65 kDa (Brisson-Noel et al., 1989) e a proteína antigênica de 38 kDa (Andersen e Hansen, 1989). No entanto, esses genes estão presentes em uma única cópia no genoma. Em 1990, foi descrito um protocolo de restrição enzimática (RFLP) para a sequência de inserção (IS) 6110, que está presente em vários sítios e o número de cópias varia de 1 a 20 no genoma das micobacterias do Complexo *M. tuberculosis*, mas não estando presente em outros microrganismos (Eisenach et al., 1990; Thierry et al., 1990; Narayanan, 2004).

No início dos anos 90, muitas PCRs foram desenvolvidas para o diagnóstico das micobacterias do MTBC, e, portanto, não consegue distinguir entre as infecções provocadas por *M. tuberculosis* e aquelas causadas por *M. bovis*. A identificação específica de *M. bovis* requeria procedimentos de amplificação de fragmentos comuns a todas as micobactérias e a identificação específica era subsequente realizada utilizando sondas marcadas radioativamente, ou restrições enzimáticas (Barry et al., 1993; Hance et al., 1989; Collins e deLisle, 1985; Rodriguez et al., 1995).

No ano de 1995, Wards e colaboradores desenvolveram uma PCR para diagnóstico de *M. bovis* em tecido utilizando a sequência de inserção IS1081 e o gene *aspb70* (Wards et al., 1995). No mesmo ano Rodriguez e colaboradores utilizou a região *RvDIRv2031c* para a identificação espécie-específica do bacilo bovino (Rodriguez et

al., 1995). A partir desses estudos, muitas regiões vêm sendo utilizadas para o diagnóstico específico do *M. bovis*, o gene *oxyR* (Sreevatsan et al., 1996), o gene *hsp65* (Sreevatsan et al., 2000), *pncA* (Barouni et al., 2004), *gyrB* (Leão et al., 2005).

A técnica *spoligotyping* pode ser utilizada para a diferenciação das micobacterias do MTBC, entretanto, sua utilização principal envolve a análise da variabilidade genética no MTBC. Baseia-se na metodologia PCR e analisa uma região cromossômica específica do complexo, o *locus* DR (*region of difference*), pela determinação da ausência ou presença de espaçadores específicos entre as sequências DR. Este *locus* contém DRs de 36pb intercaladas com espaços de sequências não repetitivas de 34-41pb múltiplas e bem conservadas (Kamerbeek et al., 1997).

As linhagens variam em número de DR e presença ou ausência de espaçadores. A técnica envolve a amplificação das regiões espaçadoras entre os DR, para posterior hibridização em uma membrana que contenha oligonucleotídeos específicos para as diferentes sequências espaçadoras, previamente ligados covalentemente. O resultado é obtido mediante a hibridização ou não de cada sequência espaçadora, resultando em um padrão de hibridização que é comparado entre as diferentes amostras (Kamerbeek et al., 1997).

Alguns estudos demonstraram que apenas o *spoligotyping* não seria suficiente para todas as correlações epidemiológicas entre as estirpes de *M. bovis*, especialmente porque todo o polimorfismo genético está restrito a um único *locus*, agrupamento DR, havendo a necessidade de associação com outros métodos moleculares (Aranaz et al., 1996; Zumarraga et al., 1999; Roring et al., 2002). No entanto, a desvantagem desta técnica é a dificuldade em adquirir os reagentes, em

especial, a membrana para a hibridização, pois, uma única empresa a produz.

Os passos mais limitantes para a utilização da PCR no diagnóstico de micobactérias são a extração de DNA genômico amplificável, de qualidade e a disponibilidade de oligonucleotídeos com alta especificidade para diferentes espécies (Khan e Yadav, 2004). Além disso, apesar da PCR ser capaz de detectar micobactérias inviáveis para crescimento microbiológico, a sensibilidade é inferior à cultura (Mangiapan et al., 1996; Taylor et al., 2001). A PCR tem sido amplamente aplicada para a detecção de *M. tuberculosis* em escarros e lavagens bronquiolares de pacientes com tuberculose humana com sucesso. No entanto, na tuberculose bovina, onde a carga bacteriana é substancialmente menor e por causa da amostra apresentar uma fibrose forte e calcificação que dificultam o acesso ao DNA a ser detectado muitos métodos de extração vem se mostrando não eficientes (Liebana et al., 1996; Wards et al., 1995). O resultado é uma sensibilidade limitada, a qual varia entre 70% e 75% (Liebana et al., 1996; Taylor et al., 2001; Parra et al., 2008).

Considerações finais

A tuberculose bovina está amplamente distribuída no mundo causando problemas de saúde pública e econômico na pecuária. Com o aumento do número de pessoas imunossuprimidas, principalmente pela infecção do HIV, surgiu uma maior preocupação em relação à infecção humana causada pelo *M.bovis*.

Buscando um melhor preço no mercado externo e diminuir os prejuízos causados pela tuberculose bovina o Brasil lançou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Programas de erradicação, como nos Estados Unidos, tem se demonstrado eficientes no combate da

enfermidade. No entanto, para que um programa de controle assegure rápidas decisões é importante a existência de um suporte laboratorial capaz de diagnosticar a doença com rapidez e especificidade e sensibilidade.

As técnicas moleculares tem demonstrado que são promissoras no diagnóstico e caracterização do *M. bovis*. No entanto, são necessários estudos para aumentar a sensibilidade do diagnóstico e a diferenciação das micobactérias presentes em um mesmo complexo.

Referências Bibliográfica

ABRAHÃO, R.M.C.M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. *Arch. Vet. Sci.* v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999.

ALVES, C.M.; GONÇALVES, V.S.P.; MOTA, P.M.P.C. *et al.* Controle da tuberculose bovina. *Cad. Téc. Vet. Zoot.*, n. 59, p. 69-81, 2008.

AMENI, G.; MIÖRNER, H.; ROGER, F.; TIBBO, M. Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 32, p. 267-276, 2000.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults e Children. *American Journal of Respiratory an Critical Care Medicine*, v. 161, p. 1376-1395, 2000.

ANDERSEN, A.B., HANSEN, E.B. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* v. 57, n. 8, p. 2481-2488, 1989.

- ARANAZ, A., LIEBANA, E., MATEOS, A., et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, p. 2734-2740, 1996.
- ARCHETTI, I.L., AMADORI, M., FRASNELLI, M., et al. Determinazioni Chimico-cliniche a carattere predittivo su bovini di razza Frisona. In: *Congress della società italiana delle scienze veterinarie*, v. 44, p. 317-318, 1996.
- ASHFORD, D.A., WHITNEY, E., RAGHUNATHAN, C. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev Sci Tech*, v. 20, n. 1, p. 325-337, 2001
- BALIAN, S.C., PINHEIRO, S.R., GUERRA, J.L. et al. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias. *Arq. Inst. Biol.*, v. 69, n. 2, p. 11-14, 2002.
- BAROUNI, A.S.; AUGUSTO, C.J.; LOPES, M.T.P.; et al. A pncA polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular and Cellular Probes*, v. 18, p. 167-170, 2004
- BARRY, T., GLENNON, M., SMITH, T. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. *The Veterinary Record*, v.132, p. 66-67, 1993:
- BEHMER, O.P., TALOSA, E.M.C., FREITAS, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: EDART, 1976. 256 p.
- Brasil 2001. Legislação do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal - PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 55p.
- Brasil 2003. Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal - PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 126p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT. Brasil: MAPA/DAS/DAS, 2006. 184p. (Manual Técnico).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3ed. Edição comemorativa Rio de Janeiro: 2005, 240p.
- BRISSENO-NOEL, A., AZNAR, C., CHUREAU, C. et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet.*, v. 338, n. 8763, p. 364-6, 1991.
- BROSCH, R., GORDON, S.V., MARMIESSE, M. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.
- CASTILHO FILHO, A. et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *J. bras. pneumol.*, v. 30, suppl.1, 2004.
- COHN, M.L., WAGGONER, R.F., MCCLATCHY, J.K. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.*, v. 98, n. 2, p. 295-6, 1968.
- COLLINS, C.H., GRANGE, J.M. The bovine tubercle bacillus. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 55, p. 13, 1983.
- COLLINS, D.M., DE LISLE, G.W. DNA restriction endonuclease analysis of

- Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. *J Clin Microbiol* v.21, p.562–564, 1985.
- CORNER, L., MELVILLE, L., MCCUBBIN, K. et al. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust Vet J.*, v. 67, n. 11, p. 389-92, 1990.
- CORNER, L.A. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1-2, p.53-63, 1994.
- CORNER, L.A., GORMLEY, E., PFEIFFER, D.U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet Microbiol.*, v. 156, v. 1-2, p. 162-71, 2012.
- CORNER, L.A., NICOLAPOULOS, C. Comparison of media used for the primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnostic laboratories. *Australian Veterinary Journal*, v.65, n.7, p.202-204, 1988.
- CORNER, L.A., TRAJSTMAN, A.C. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet. Microbiol.* v. 18, p. 127–134, 1988.
- CORREA, W.M., CORREA, C.N.M. A Tuberculose e micobacterioses bovina e suína: etiologia com vistas à inspeção de carnes. *Higiene Alimentar*, v. 1, n. 1, p. 21-23, 1982.
- COUSINS, D.V., FRANCIS, B.R., GOW, B.L. Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol.*, v. 20, n. 1, p. 89-95, 1989.
- DANKNER, W.M., DAVIS C.E. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics*. v.105, n. 6, E79, 2000.
- DANKNER, W.M., WAECKER, N.J., ESSEY, M.A. et al. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: A clinico-epidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine* v. 72, p. 11–37, 1993.
- EISENACH, K.D., CAVE, M.D., BATES, J.H. et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res* v.18, p. 188, 1990.
- ESSEY, M.A., KOLLER, M.A. Status of bovine tuberculosis in North America. *Vet. Microbiol.*, v. 40, p. 15-22, 1994.
- HANCE, A.J., GRANDCHAMP, B., LEVY-FREBAULT, V. et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* v. 3, p. 843-849, 1989.
- HEINEMANN, M.B., MOTA, P.M.P.C., LOBATO, F.C.F. et al Tuberculose bovina: uma introdução a etiologia, cadeia epidemiológica, patogenia e sinais clínicos. *Cad Tec Vet Zootec*, n.59, p. 1-12, 2008.
- HERNÁNDEZ DE ANDA, J., RENTERÍA EVANGELISTA, T., LÓPEZ VALENCIA, G. et al An abattoir monitoring system for diagnosis of tuberculosis in cattle in Baja California, Mexico. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 211, p. 6, p. 709-11, 1997. Erratum in: *J Am Vet Med Assoc*, v. 211, n. 12, p. 1576, 1997.
- HINES, N., PAYEUR, J.B., HOFFMAN, L.J. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC 460 TB system and Middle brook

- 7H10 and 7H11 solid media. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 18, p. 243-250, 2006.
- HOLANDA, E.D. *Avaliação de métodos de descontaminação para isolamento de microbactérias em tecidos animais*. 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- HUARD, R.C., LAZZARINI, L.C., BUTLER, W.R. et al PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol.*, v. 41, n. 4, p. 1637-50, 2003.
- HUCHZERMEYER, H.F.A.K., BRUECKNER, G.K., VAN HEERDEN, A. et al. Tuberculosis In: COETZER, J.A.W., THOMSON, G.R., TUSTIN, R.C. (Eds) *Infectious Diseases of Livestock*. pp. 1425-14445, 1994.
- JENSEN, H.E., SCHONHEYDER, H., JORGENSEN, J.B. Intestinal and pulmonary mycotic lymphadenitis in cattle. *J Comp Pathol.*, v. 102, n. 3, p. 345-55, 1990.
- JORGE, K.S.G. *Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil*. 73 p. UFMS/FIOCRUZ. Dissertação de mestrado. Campo Grande, 2001.
- JORGENSEN, J.B. An improved medium for the culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from faeces. *Acta Vet. Scand.*, v. 23, p. 325-335, 1982.
- KAMERBEEK, J., SCHOOLS, L., KOLK, A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* v.35, p. 907-914, 1997.
- KANTOR, I.N., AMBROGGI M., POGGI S. et al., Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis (Edinb)*. v.88, n.4, p.358-65, 2008.
- KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.* v.40, n.1/2, p.5-14, 1994.
- KENT, P.T., KUBICA, G.P. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*, US Department of Health and Human Services publication. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. 1985.
- KHAN, I.U., YADAV, J.S. Real-time PCR assays for genus-specific detection and quantification of culturable and non-culturable mycobacteria and pseudomonads in metalworking fluids. *Mol Cell Probes.*, v. 18, n. 1, p.67-73, 2004.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., LANDA, W.M. et al. *Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p.
- LEÃO, S.C.; BERNARDELLI, A.; CATALDI, A. et al.. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods*, v. 61, p. 193-199, 2005.
- LIEBANA, E., ARANAZ, A., FRANCIS, B. et al. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, v. 34, p. 933-938, 1996.
- LOBUE, P.A., BETACOURT, W., PETER C. et al. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-

2000. *Int J Tuberc Lung Dis*, v.7, p. 180 - 185, 2003.
- MANGIAPAN , G., VOKURKA, M., SCHOULS, L. et al. Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, v. 34, n. 5, p. 1209-15, 1996.
- MATTOS, I.G., RIBEIRO, M.O., NETTO, I.C. et al. Tuberculosis: a study of 111 cases in an area of high prevalence in the extreme south of Brazil. *Braz J Infect Dis.*, v. 10, n. 3, p. 194-8, 2006.
- MCKENZIE, R.A., DONALD, B.A. Lymphadenitis in cattle associated with *Corynebacterium equi*: a problem in bovine tuberculosis diagnosis. *J Comp Pathol.*, v. 89, n. 1,p. 31-8, 1979.
- MEJIA, G.I., CASTRILLON, I., TRUJILLO, H. et al. Microcolony detection in 7H11 Thin layer culture is na alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis.*, v.3, n.2, p.138-142, 1999.
- MILIAN-SUAZO, F., SALMAN, M.D., RAMIREZ, C. et al. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. *Am J Vet Res.*, v. 61, n. 1, p. 86-9, 2000.
- MONAGHAN, M., DOHERTY, M.L., COLLINS, D. et al. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.*, v.40, p.111-124, 1994.
- MONAGHAN, M.L., DOHERTY, M.L., COLLINS, J.D. et al. O teste tuberculínico. *Vet. Microbiol.*, v. 62, p.111-124, 1997.
- MOTA, P.M.P.C. *Estudo da esofagostomose como fator predisponente de reações alérgicas inespecíficas da tuberculose bovina*. 1985. 70p. Tese (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MOTA, P.M.P.C., ALENCAR, A.P., ASSIS, R.A. et al. Diagnóstico alérgico tuberculose bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.59, p. 13-25, 2008
- MURAKAMI, S., TAKENO, M., KIRINO, Y. et al. Screening of tuberculosis by interferon-gamma assay before biologic therapy for rheumatoid arthritis. *Tuberculosis* (Edinb). v. 89, n. 2, p.136-41, 2009.
- NARAYANAN, S. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* v. 120, p. 233-247, 2004.
- NEILL, S.D., POLLOCK, J.M., BRYSON, D.B. et al. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol.* v. 40, n. 1-2, p. 41-52, 1994.
- NOLTE, F.S., METCHOCK, B. *Mycobacterium*, p. 400-437. In MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A. et al. (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995.
- NOVAIS, C.M., PIRES-ALVES, M., SILVA, F.F. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento*. ed. 33, jun-dez 2004.
- OIE (World Organization for Animal Health). Bovine Tuberculosis. In.: __, *Manual for Diagnosis Techniques of Livestock Diseases*. França: Paris: Office International Epizzoties, p.287-296, 1992.
- OIE (World Organization for Animal Health). Bovine tuberculosis. cap. 2.4.7, p. 1-16. In.: __, *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. França: Paris Office International des Epizooties, 2009.
- O'REILLY, L.M., DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review.

- Tuber Lung Dis.*, v. 76, Suppl 1, p.1-46, 1995.
- PAIXÃO, T.A., MINHARRO, S., CARVALHO NETA, A.V. et al. O diagnóstico *post mortem* da tuberculose bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.59, p. 26-42, 2008
- PARRA, A., GARCÍA, N., GARCÍA, A. et al. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.*, v. 127, p. 315-324, 2008.
- POLLOCK, J.M., MCNAIR, J., WELSH, M.D. et al. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 81, p. 103–107, 2001.
- PRESCOTT, L.M., HARLEY, J. P., KLEIN, D.A. *Microbiology*. 5ed. London: McGraw-Hill, 2002. 1026p.
- RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., BLOOD, D.C. et al. *Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- RATLEDGE, C., DALE, J.W. (Editores) *Mycobacteria: Molecular Biology & Virulence*. Blackwell Science. 1999. 406 p.
- RODRIGUEZ, J.G., MEJIA, G.A., DEL PROTILLO, P. et al. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* v.141, p.2131-2138, 1995.
- RODWELL, T.C., KAPASI, A.J., MOORE, M. et al. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the United States to cattle in Mexico using spoligotyping. *Int. J. Infect. Dis.* supl.14, p.129–135, 2010.
- RORING, S., SCOTT, A., BRITAIN, D. et al. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol*, v. 40, p. 2126–2133, 2002.
- ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 18, p. 101-108, 1997.
- RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 86, p. 77-109, 2006.
- SAKAMOTO, S.M., ASSIS, R.A., ALENCAR, A.P. et al. Métodos auxiliares de diagnóstico da tuberculose bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v.59, p. 43-68, 2008.
- SAMPER S, MARTIN C, PINEDO A et al. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS*, v. 11, p. 1237–42, 1997.
- SINHA, R.N. *Mycobacterium bovis*. In: *The significance of pathogenic microorganisms in raw milk*. International Dairy Federation, Brussels, Belgium. 1994, p. 141-166.
- SMITH, B.P. *Medicina integrada de grandes animais*. 3ed. Barueri: Manole, 2006, 1728p.
- SMOSKÖVI, A., MAGYAR, P. Comparison of the mycobacterial growth indicator tube with MB Redox, Löwestein – Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, v.37, n.5, p.1366-1369, 1999.

- SOMOSKOVI, A., MAGYAR, P. Comparison of the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube With MB Redox, Lowenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 Media for Recovery of *Mycobacteria* in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 5, p. 1366-1369, 1999.
- SREEVATSAN, S., ESCALANTE, P., XI PAN, G. et al. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *M. bovis*. *J Clin Microbiol* v.34, p. 2007-2010, 1996.
- SREEVATSAN, S.; BOOKOUT, J.B.; RINGPIS, F.; et al. A multiplex approach: to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 2602-2610, 2000.
- TAYLOR, M.I., HUGHES M.S., SKUCE R.A. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR. *J Clin Microbiol*, v. 39, p. 1272-1278, 2001.
- TELENTI, A., MARCHESI, F., BALZ, M. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.*, v. 31, n. 2, p. 175-8, 1993.
- THIERRY, D., CAVE, M.D., EISENACH, K.D. et al. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, n. 1, p. 188, 1990.
- TORTOLI, E., CICHERO, P., PIERSIMONI, C. et al. Use of Bactec MGIT 960 for Recovery of *Mycobacteria* from Clinical Specimens: Multicenter Study. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 3578-3582, 1999.
- VORDERMEIER, H.M., RHODES, S.G., DEAN, G. et al. Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacille Calmette-Guérin. *Immunol.*, v. 112, n. 3, p. 461-70, 2004.
- WARDS, B.J., COLLINS, D.M., DE LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, v. 43, p. 227-240, 1995.
- WARDS, B.J., COLLINS, D.M., LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, v.43, p.227-240, 1995.
- WATERS, W.R., PALMER, M.V., WHIPPLE, D.L. et al. Diagnosis implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 10, p.960-966, 2003.
- WHIPPLE, D. L.; CALLIHAN, D. R.; JARNAGIN, J. L. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardised procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 3, p. 368-373, 1991.
- WOOD, P. R.; CORNER, L. A.; PLACKETT, P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of the g-interferon. *Res. Vet. Sci.*, v. 49, p.46-49, 1990.
- YAJKO, D. M.; WAGNER, C.; TEVERE, V. J.; KOCAGOZ, T.; HADLEY, W. K.; CHAMBERS, H. F. Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the Amplicor PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 1944-1947, 1995
- ZANINI, M.S., MOREIRA, E.C., LOPES, M.T. et al. *Mycobacterium bovis* polymerase

chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and RFLP. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 809-813, 2001.

ZUMARRAGA, M.J., MARTI, C., SAMPER, S. et al. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* related infections in South America. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 296-303, 1999.

Capítulo 2

Avaliação de marcadores moleculares para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis*.

Resumo

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* compreende em um grupo de bactérias que apresentam um alto grau de similaridade genômicas. Neste grupo estão os causadores da tuberculose bovina e animal, dessa forma, a diferenciação das micobactérias são de grande importância para estudos epidemiológicos e considerações de saúde pública e para otimizar o tratamento. O atual trabalho teve como objetivo avaliar iniciadores e marcadores moleculares descritos na literatura capazes de diferenciar o *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* através da PCR. Os resultados indicaram que a DR4 é a região ideal para a diferenciação do *M. bovis* das demais *Mycobacterias*, no entanto deve-se ter cuidado no desenho dos iniciadores para os mesmos não estarem associados a regiões repetitivas e a IS6110, evitando dessa forma ligações com o *M. tuberculosis*.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, marcadores moleculares, *region of difference 4* (RD4).

Introdução

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) é composto pelo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, Bacille Calmette-Guérin (BCG), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. O *M. africanum* e *M. tuberculosis* destacam-se por serem os agentes causadores da tuberculose humana, sendo o primeiro somente encontrado no oeste da África ou em indivíduos com alguma relação com a região (van Soolingen et al., 1997). O *M. bovis* é o causador da tuberculose bovina, entretanto,

tem amplo espectro de hospedeiros inclusive os seres humanos (O' Reilly e Daborn, 1995).

O MTBC apresenta microrganismos com grande homologia genética. O genoma do *M. bovis* assemelha-se em 99,95% com o *M. tuberculosis*, sendo as deleções no DNA do primeiro o principal contribuinte para essas diferenças (Fleischmann et al., 2002; Garnier et al., 2003). Acreditava-se que a domesticação do gado bovino, a qual ocorreu entre 10 mil e 25 mil anos atrás, teria permitido a passagem do agente infeccioso dos animais domésticos para os seres humanos. Em sua adaptação ao novo hospedeiro, a bactéria teria evoluído para uma espécie mais próxima do *M. tuberculosis* (Neill et al., 2005). Entretanto, estudos gênicos atuais de distribuição das deleções e inserções nos genomas do MTBC, forneceram várias evidências para uma evolução independente, tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis*, partindo de outra espécie precursora comum, possivelmente o *M. canetti* (Brosch et al., 2002).

É importante identificar corretamente as espécies dos isolados do MTBC para estudos epidemiológicos e considerações de saúde pública e para otimizar o tratamento (O'Reilly e Daborn, 1995). O *M. bovis* pode ser transmitido do gado para o ser humano pela via aerógena ou pela ingestão de lácteos contaminados pelo bacilo (Who, 1993). Sua identificação mostra-se importante para um tratamento eficiente da doença já que, o bacilo bovino é resistente a pirazinamida, um agente antituberculose de primeira linha (Bakshi et al., 2005). Embora o *M. tuberculosis* seja a causa mais comum de tuberculose em seres humanos, *M. bovis* corresponde a 0,5 a 7,2% dos casos de tuberculose humana em países

industrializados e estima-se ser responsável por 10 a 15% de novos casos no mundo em desenvolvimento (de la Rúa-Domenech, 2006).

A identificação do patógeno não é importante apenas na área humana, mas também para a saúde animal. O padrão ouro para diagnóstico da tuberculose bovina é o isolamento com posterior identificação por métodos bioquímicos (Brasil, 2006; Taylor et al., 2007; Cardoso et al. 2009). Essa metodologia é demorada devido ao lento crescimento do *M. bovis*. A utilização de técnicas moleculares tem colaborado na área, permitindo resultados rápidos e precisos tanto na identificação após o isolamento quanto na detecção do agente em amostras clínicas (Sakamoto et al., 1999). No entanto, pelo ao alto grau de similaridade no genoma dos membros do MTBC, é preciso ter cautela ao se padronizar as técnicas moleculares.

Com o avanço da biologia molecular e da bioinformática foi possível sequenciar o genoma completo do *M. tuberculosis* e *M. bovis* e otimizar os estudos moleculares (Fleischmann et al., 2002; Garnier et al., 2003). Análise e comparação de fragmentos de DNA *in silico* em bancos de dados públicos tornaram-se ferramentas essenciais na seleção de sequências alvo, como por exemplo, a descoberta das regiões deletadas que passaram a ser utilizadas como marcadores epidemiológicos na diferenciação de espécies (Garnier et al., 2003).

A escolha correta dos marcadores moleculares a serem detectados e amplificados e dos iniciadores é um dos pontos críticos para o sucesso da reação de PCR no diagnóstico da tuberculose (Sakamoto et al., 1999). A discriminação do MTBC pode ser comprometida caso as regiões estudadas não sejam testadas em amostras de diferentes origens e em maior

número (Ruggiero et al., 2007). Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo desenhar, selecionar e avaliar diversos iniciadores e marcadores moleculares capazes de diferenciar o *M. bovis* do *M. tuberculosis* através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

Materiais e Métodos

Amostras

As amostras de *M. bovis* AN5 CRNC 01 e *M. tuberculosis* H37Rv CRNC 23 foram utilizadas durante todo o processo de padronização e validação das PCR como controles. Além delas, toda rodada de reações contou com controles para se verificar contaminação na extração do DNA e nos reagentes da PCR. Foram testadas as amostras *M. fortuitum* CRNC 10, *M. kansasii* CRNC 48, *M. kansasii* CRNC 18, *M. gordonae* CRNC 16, *M. avium* D4 CRNC 05, *M. avium* 1500 CRNC 15, *M. intracellulare* CRNC 17, *M. avium* 2045 CRNC 14, *M. marinum* CRNC 19, *M. scrofulaceum* CRNC 49, *M. scrofulaceum* CRNC 20, *M. szulgai* CRNC 21, *M. triviale* CRNC 22, *M. fortuitum peregriinum* CRNC 11, *M. phei* CRNC 12, *Corynebacterium pseudotuberculosis* CRNC 09/02, *Rhodococcus equi* CRNC 09/01 e *Nocardia asteroides* CRNC 10/01 para verificar a especificidade analítica dos iniciadores.

Trinta *M. bovis* isolados no Brasil pelo Laboratório de Diagnóstico de Doenças Bacterianas do Laboratório Nacional de Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LDDDB/LANAGRO-MG), provenientes de inspeção sanitária em frigorífico, e 30 *M. tuberculosis*, provenientes de amostras isoladas de pacientes de dois centros de referência em tuberculose na cidade de Juiz de Fora (MG). Todas as amostras testadas foram previamente caracterizadas bioquimicamente

Extração do DNA

Foram lavados meios de cultura Stonebrink e Löwenstein-Jensen contendo as colônias de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, respectivamente, com 1,5mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As amostras foram inativadas por uma hora a 87,5°C. Após o processo de inativação, 200 µL da suspensão bacteriana foram utilizados no processo de extração. Nestas amostras acrescentou-se 60µL de lizosima (10 mg/mL) (Promega) e incubou as mesmas por duas horas a 37°C. Para quebra de proteínas adiciono-se 30µL de proteinase K (10 mg/mL) (Invitrogen) e 60µL de SDS (10% w/v) (Promega) e incubou as amostras por quatro horas a 56°C. Seguiu-se o protocolo de extração do fenol proposto por Leal-Klevezas e colaboradores (1995). O DNA foi resuspenso em 50µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). O DNA extraído foi estocado a 4°C até o momento de uso.

Desenho dos Iniciadores

Foram desenhados iniciadores a partir de regiões descritas na literatura como específicas para o *M. bovis* – o gene *mmpS6* (Garnier et al., 2003), *direct repeat* (DR) (Beggs et al., 1996) e DR 4 (Pinsky e Banaei, 2008). Foram também selecionados dois iniciadores muito citados na literatura, um para a caracterização das micobactérias (Telenti et al., 1993), e para identificação de *M. bovis* (Rodriguez et al., 1995) (Tabela 2). Para desenhar os oligonucleotídeos no presente trabalho foi utilizada a sequência do *M. bovis* (BX258333.1) disponível no banco de dados no GenBank (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>). Primeiramente a sequência do *M. bovis* e do *M. tuberculosis* (AL123456.3, GenBank) foram submetidas ao BLAST@ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificação de polimorfismo (Altschul et. al. 1997). Em seguida, o alvo escolhido no *M.*

bovis, foi alinhado com o genoma das sequências de micobactérias disponíveis no GenBank pelo software BioEdit (Hall, 1999). Após verificação das regiões polimórficas os iniciadores foram desenhados no programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) e, analisados no programa Oligo Analyser 3.1 (IDT, EUA) para verificação das estruturas secundárias e dos dímeros formados. A especificidade analítica *in silico* dos iniciadores foi testada com o programa o PrimerBlast (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) (Altschul et al., 1990) (Tabela 2).

PCR

Foram padronizadas PCR com iniciadores desenhados no presente trabalho e descritos na literatura (Tabela 2) para diferenciação de *M. bovis*. Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1. Todas as PCR foram usadas nesse trabalho com o intuito de diferenciar o *M. bovis* do *M. tuberculosis*, com exceção da descrita por Telenti et al. (1993), cujo objetivo foi somente verificar que as bactérias utilizadas pertenciam ao MTC e se o DNA foi corretamente extraído. O produto amplificado dessa reação foi submetido à restrição pelas enzimas *HaeIII* e *BstEII* (Invitrogen), para confirmar as amostras como micobactérias do MTC.

Tabela 1 Oligonucleotídeos desenhados e citados na literatura para a detecção do *Mycobacterium bovis*.

Iniciador	Região	Sequência 5'- 3'	Amplicon (pb)	Referência	Flanqueamento da região¹
TB11	gene <i>hps65</i>	ACCAACGATGGTGTGTCCAT	439	Telenti et al., 1993	
TB12		CTTGTCGAACCGCATAACCCT			
JB22	locus Mb2049c	TCGTCCGCTGATGCAAGTGC	499	Rodriguez et al., 1995	
JB21		CGTCCGCTGACCTCAAGAAG			
Mb-280-F	gene <i>mmpS6</i>	ACGCGGCTGGATGGTGCTGGTTG	280	Estudo atual	131795 - 131795 (BX248339.1)
Mb-280-R		CGCGGGCAGGGTCGTCGTGA			
TBMB F	DR	CTGAGGTGTTGTTCCGTCC	217	Estudo atual	948 – 1164 (U47864.1)
TBMB R		TCGTTGACCACGAATTTTCA			
Mb-115-F	DR 4	AGAAGCGCAACACTCTTGGA	115	Estudo atual	78740 – 78854 (BX248339.1)
Mb-115-R		CCCCGTAGCGTTACTGAGAA			
Mb-400F	DR4	AACGCGACGACCTCATATTC	400	Estudo atual	78597 – 78996 (BX248339.1)
Mb-400R		AAGGCGAACAGATTTCAGCAT			

¹ GenBank (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>)

As reações foram realizadas com um volume final de 20µL por reação (Tabela 3) nas seguintes concentrações de reagentes: 0,075 U de *GoTaq® Hot Start Polymerase* (Promega, EUA), 20% de Tampão *GoTaq® Hot Start 5x* (Promega, EUA), 1,5 mM MgCl₂ (Promega, EUA), 10 mM de dNTP, 1

pmol/ µL de cada iniciador e 2,0 µL de DNA. As condições de temperatura são descritos na tabela 2. Os produtos amplificados de todas as PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

Tabela 2 Descrição das condições de amplificação para o diagnóstico no *Mycobacterium bovis*.

Iniciador	Desnaturação	Ciclos			Polimerização	
		Desnaturação	Anelamento	Polimerização	N.º	
TB11/TB12		95°C/45s	56°C/45s	72°C/45s		
Mb-280		95°C/35s	66°C/35s	72°C/35s		
JB21/JB22	95°C/5min	95°C/30s	54°C/30s	72°C/30s	35x	72°C/5min
TBMB		95°C/20s	54°C/20s	72°C/20s		
MB-115		95°C/15s	60°C/20s	72°C/30s		
MB-400		95°C/30s	56°C/30s	72°C/30s		

Análise Estatística

Foi utilizado o teste de kappa (IC 95%) e de McNemar, além da sensibilidade e especificidade diagnóstica (Kraemer, 1992).

Resultados

Todas as amostras apresentaram um perfil de amplificação e restrição enzimática semelhante ao complexo *M. tuberculosis* descrito por Telenti et al. (1993). Nenhum dos iniciadores apresentou amplificação para as amostras de micobactérias não pertencentes ao complexo MTBC e outras

bactérias testadas da ordem Actinomycetales.

Na Figura 1 estão apresentados os resultados das amplificações para todos os primers testados para 30 amostras isoladas e caracterizadas bioquimicamente para *M. bovis* e para *M. tuberculosis*.

As análises estatísticas para os iniciadores testados, com intervalo de confiança de 95%, estão descritos na Tabela 4 tendo como padrão ouro o isolamento bacteriológico e os testes bioquímicos

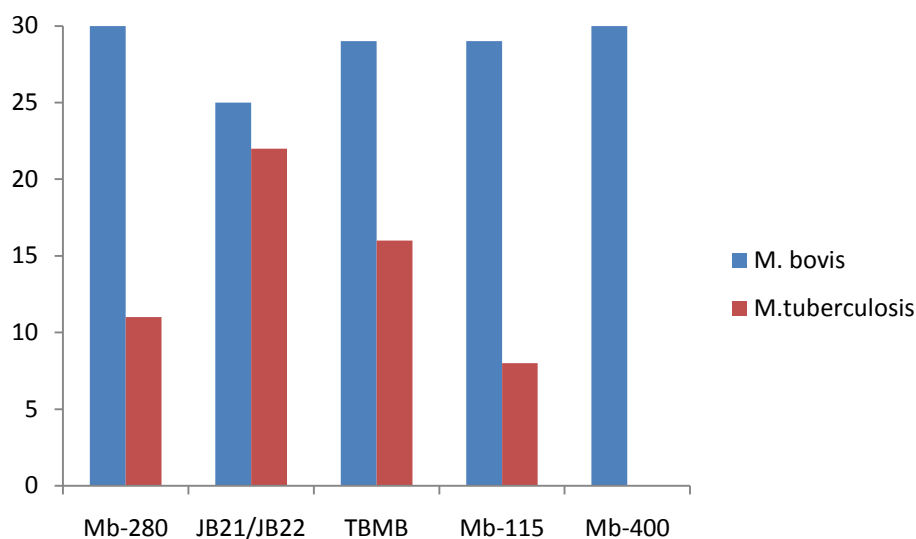


Figura 1 Gráfico comparativo entre o número de amostras de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* que amplificaram para cada iniciador testado.

Tabela 3 Análise estatísticas dos dados obtidos para a diferenciação do *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* para cada iniciador testado, com intervalo de segurança de 95%.

Análises	Mb-280	JB21/JB22	TBMB	Mb-115	Mb-400
Sensibilidade	0,8843	0,6528	0,8278	0,7397	0,8843
Especificidade	0,4386	0,1228	0,2834	0,5411	0,8843
Eficiência	0,6956	0,4161	0,5856	0,6956	0,9404
Falso positivo	0,1993	0,5411	0,3433	0,1228	0,0000
Falso negativo	0,000	0,0564	0,0008	0,0211	0,0000
Kappa	0,6333	0,1000	0,4333	0,6333	1,0000
McNemar	0,0026	0,0021	0,0003	0,2278	0,0000

Discussão

Os pontos críticos para o sucesso da amplificação da PCR são a escolha dos marcadores a serem detectados e amplificados, bem como da sequência dos iniciadores a serem empregados e a qualidade da técnica de extração do DNA (Sakamoto et al., 2008). Muitos iniciadores

que inicialmente se mostraram eficientes na discriminação do gênero e da espécie do bacilo tuberculose falharam em identificar corretamente determinadas amostras quando passaram a ser empregados em diagnóstico de rotina (Ruggiero et al., 2007).

Os alvos dos oligonucleotídeos estudados neste trabalho não foram amplificados em

nenhuma das amostras de *Mycobacterium* não pertencentes ao MTC ou de outras espécies da ordem Actinomycetales. Porém, os resultados foram mais diversos na comparação de bactérias geneticamente semelhantes como o *M. tuberculosis* e o *M. bovis*.

Os iniciadores TB11/TB12 amplificaram um fragmento de 439 pb referente à parte do gene da proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65). As proteínas do choque térmico, ou hsp, funcionam como chaperonas, interagem com proteínas do citoesqueleto e modulam a ligação de hormônios esteróides a seus receptores nas células. A hsp65, como as demais hsp, é filogeneticamente conservada e largamente encontrada na natureza em organismos procarióticos e eucarióticos, sendo muito imunogênica (Kaufmann, 1990). Todas as amostras testadas amplificaram com estes iniciadores. O produto amplificado foi restringido com as enzimas *HaeIII* apresentando um perfil de 160/140/70 pb, e *BstEII* com o perfil de bandas de 245/125/80 bp, confirmando que as mesmas pertenciam ao MTBC.

A PCR com o par de iniciadores JB21/JB22 apresentou o maior número de falso-positivos. Realizou-se um alinhamento do iniciador JB21/JB22 com a sequência do complexo *M. tuberculosis*, disponíveis no GenBank, os mesmos alinharam em um segmento de 499pb na sequência da enzima helicase na região 2257788 a 2258286 da amostra *Mycobacterium tuberculosis* CCDC5180 (CP001642.1). O mesmo iniciador também alinhou com a amostra de *M. africanum* (FR878060.1) e *M. bovis* (BX248341.1), produzindo um produto com o mesmo tamanho.

Em 121 amostras de cultura da Argentina, México e Colômbia, Rodriguez et al (1999) obtiveram 100% de concordância de dados entre o método microbiológico e PCR com

iniciadores JB21/JB22. No entanto, Sechi et al. (2000) mostraram que quatro de trinta amostras de *M. bovis* isolada de bovinos de Sardenha (Itália) não amplificaram nos iniciadores JB21/JB22. Doze de vinte amostras de *M. tuberculosis* isoladas na Índia também apresentaram amplificação para essa região (Shah et al., 2002). Trabalhos no Brasil com os mesmos iniciadores tiveram resultados positivos para 88,24% para amostras isoladas de bovinos (Figueiredo et al., 2009). Tais resultados correspondem com os dados do presente trabalho em que entre os isolados brasileiros não houve amplificação em 16,66% amostras de *M. bovis* testadas e ainda ocorreu a amplificação de 73,33% *M. tuberculosis*.

O alvo dos iniciadores Mb-280 é conhecido com TbD1, detectada como deletada no *M. tuberculosis* após sequenciamento completo do genoma da cepa H37Rv (Brosch et al., 1999). As análises *in silico* deste trabalho determinaram que a região está deletada em todos os genomas de *M. tuberculosis* atualmente disponíveis no GenBank, no entanto, apesar de estes iniciadores terem amplificado todas as amostras de *M. bovis* e nenhuma das espécies fora do MTBC, ocorreu também a formação de bandas de tamanho compatíveis ao segmento analisado no gel de agarose em 36,67% das amostras de *M. tuberculosis*. Esse resultado corrobora os achados de Brosch et al. (2002) que encontrou isolados de *M. tuberculosis* com TbD1 intacta e contendo os genes *mmpS6* e *mmpL6*.

As análises *in silico* com TBMB também não encontraram resultados positivos para alinhamento dos iniciadores nos genomas completos de *M. tuberculosis*. Quando novos testes foram realizados com os programas Blast e Primer-Blast, apenas uma sequência parcial de um *locus* de repetição direta e com presença da IS6110 apresentou alinhamento com um amplicom provável de 365 pb. Essa é uma região de elevada quantidade de polimorfismos em

decorrencia de deleções e inserções (chamadas espaçadoras) presentes entre sequências repetitivas. Os espaçadores possuem sequências muito conservadas apesar do grau de variação na presença e ausência dos mesmos (van Embden et al., 2000). O elevado número de isolados positivos amplificados neste trabalho, para a PCR com TBMB, indicam que esse é um polimorfismo comum na população de *M. tuberculosis* no Brasil.

A região alvo dos iniciadores Mb-115 e Mb-400 é a RD4 - *region of difference 4*, presente em todas as espécies ou ecotipos do MTC, mas ausente no *M. bovis* e nas cepas vacinais BCG (Smith et al., 2006). Os iniciadores Mb-115 amplificaram oito amostras de *M. tuberculosis*. Os testes *in silico* indicaram que o iniciador direto (*forward*) se alinha com o genoma de todos os *M. tuberculosis* depositados no Genbank. O segundo alinha-se com apenas duas sequências (AF181860.1 e AF189746.1) deste microrganismo, nenhuma delas pertencentes a um genoma completo. Quando o par foi analisado em conjunto no PrimerBlast há indicativo de formação de amplicon apenas para sequências de *M. bovis*. Quando foi realizado o alinhamento do produto amplificado de 115pb no genoma de *M. tuberculosis* foi observado um pareamento com 93pb (1709949- 1710041) da sequência CP003234.1. Possivelmente alta taxa de guanina na região 5' do iniciador anti-senso (*reverse*) juntamente com a similaridade de uma grande parte do produto amplificado, tenha gerado bandas nas amostras de *M. tuberculosis* similares em tamanho com o *M. bovis*.

Bahksi et al (2005) analisaram a região DR4 e concluíram que todas as suas amostras de *M. bovis* apresentavam a deleção, porém postularam que a análise de um maior número de amostras ou em outras populações poderia contrariar esse resultado. Apesar de essa ser uma possibilidade, pelo fato de a região estar associada com uma

repetição e com um IS6110, também é provável que o anelamento dos iniciadores Mb-115 com outras porções do genoma de algumas cepas do *M. tuberculosis* tenha ocorrido. A confirmação dos dados poderia ocorrer apenas com o sequenciamento dos produtos de PCR.

A PCR com oligonucleotídeos Mb-400 apresentou os melhores resultados. A deleção da região RD4 remove os genes Rv1506-Rv1516 em todas as sequências do genoma completo de *M. bovis* e BCG do GenBank, enquanto está íntegra em todas as MTBC disponíveis no banco de dados. A deleção dessa região era apontada em outros trabalhos (Brosch et al., 2002) e é corroborada pelo presente experimento sendo constatada como a mais indicada para a identificação do *M. bovis*.

O iniciador Mb-400 obteve o maior índice de eficiência, enquanto o iniciador JB21/JB22 apresentou o menor índice, obtendo também, o maior índice de falso positivo. Os iniciadores Mb-280 e Mb-400 não tiveram amostras falso negativas. De acordo com os cálculos estatístico dos iniciadores Mb-400 e Mb-115, a diferença nos resultados não foram estatisticamente significativos em relação a caracterização bioquímica.

Conclusão

Os resultados encontrados nesse trabalho indicaram que a RD4 é a região de diferenciação mais indicada para diferenciar o *M. bovis* de outras espécies de *Mycobacterium*. Além disso, orientam para o fato de que os testes de PCR para identificação desse gênero não devem ser testados apenas em amostras padrão ou populações pouco diferenciadas. Os polimorfismos aqui encontrados também podem indicar diferentes perfis genéticos e até mesmo características biológicas, pois

vários deles estão localizados em regiões com genes já caracterizados ou hipotéticos.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BAKSHI, C.S., SHAH, D.H., VERMA, R. et al. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Vet Microbiol.*, v. 109, n. 3-4, p. 211-216, 2005.

BEGGS, M.L., CAVE, M.D., MARLOWE, C. et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction. *J Clin Microbiol.* v. 34, p.2985–2989, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT*. Brasil: MAPA/DAS/DAS, 2006. 184p. (Manual Técnico).

BROSCH, R., GORDON, S.V., BILLAULT, A. et al. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect Immun.*, v. 66, n. 5, p. 2221-2229, 1998.

BROSCH, R., GORDON, S.V., MARMIESSE, M. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis*

complex. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

BROSCH, R., PHILIPP, W.J., STAVROPOULOS, E. et al. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infect Immun.*, v. 67, n. 11, p. 5768-5774, 1999. Erratum in: *Infect Immun.*, v. 68, n. 1, p. 427, 2000.

CARDOSO, M.A., CARDOSO, R.F., HIRATA, R.D.C. et al. Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. *Zoonoses Public Health.*, v. 56, p. 465–470, 2009.

DANKNER, W.M., DAVIS, C.E. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics.*, v. 105, n. 6, p. E79, 2000.

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 86, p. 77-109, 2006.

FIGUEIREDO, E.E.S., SILVESTRE, F.G., CAMPOS, W.N. et al. Identification of *Mycobacterium bovis* Isolates by a multiplex PCR. *Braz. J. Microbiol.*, v.40, p. 231-233, 2009.

FLEISCHMANN, R.D., ALLAND, D., EISEN, J.A. et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol.*, v. 184, n. 19, p. 5479-5490, 2002.

GARNIER, T., EIGLMEIER, K., CAMUS, J.C. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, 2003.

- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- KAUFMANN, S.H. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today.*, v.11, n. 4, p. 129-36, 1990.
- KRAEMER, H.C. *Evaluating Medical Tests*. Newbury Park, CA:Sage. 1992.
- NEILL, S.D., SKUCE, R.A., POLLOCK, J.M. Tuberculosis - new light from an old window. *J Appl Microbiol.*, v. 98, n. 6, p. 1261-9, 2005.
- O'REILLY, L.M., DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.*, v. 76, Suppl 1, p. 1-46, 1995.
- PINSKY, B.A., BANAEI, N. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J Clin Microbiol.*, v. 46, n. 7, p. 2241-6, 2008.
- RODRIGUEZ, J.G., FISSANOTI, J.C., DEL PORTILLO, P. et al. A. Amplification of a 500-base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 37, p. 2330-2332, 1999.
- RODRIGUEZ, J.G., MEJIA, G.A., DEL PROTILLO, P. et al. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* v.141, p.2131-2138, 1995.
- RUGGIERO, A.P., IKUNO, A.A., FERREIRA, V.C.A. et al. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. *Arq. Inst. Biol.*, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.
- SAKAMOTO, S.M., ASSIS, R.A., ALENCAR, A.P. et al. Métodos auxiliares de diagnóstico da tuberculose bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v.59, p. 43-68, 2008.
- SAKAMOTO, S.M., TELLES, M.A.S., HEINEMANN, M.B. et al. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 66, n. 2, p. 45-58, 1999.
- SECHI, L.A., DUPRÈ, I., LEORI, G. et al. Distribution of a specific 500-base-pair fragment in mycobacterium bovis isolates from Sardinian cattle. *J Clin Microbiol.*, v. 38, n. 10, p. 3837-9, 2000.
- SHAH, D.H., VERMA, R., BAKSHI, C.S. et al. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*, v. 214, p. 39-43, 2002.
- SMITH, N.H., KREMER, K., INWALD, J. et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Theor Biol*, v. 239, p. 220-225, 2006.
- TAYLOR, G.M., WORTH, D.R., PALMER, S. et al. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res.*, v. 3, p. 12, 2007.
- TELENTI, A., MARCHESI, F., BALZ, M. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.*, v. 31, n. 2, p. 175-8, 1993.
- UNTERGASSER, A., NIJVEEN, H., RAO, X. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, p. W71-W74, 2007.

VAN EMBDEN, J.D., VAN GORKOM, T., KREMER, K. et al. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol.*, v. 182, n. 9, p. 2393-401, 2000.

VAN SOOLINGEN, D., HOOGENBOEZEM, T., DE HAAS, P. E. et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.*, v. 47, n. 4, p. 1236-45.

WHO-World Health Organization 1993. Report of the WHO meeting of zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) Technical Note, Geneva, 27 pp.

Capítulo 3

PCR em tempo real para identificação de *Mycobacterium bovis* em amostras de colônias bacterianas.

Resumo

As metodologias tradicionais de diagnóstico da tuberculose bovina envolve o teste de tuberculina e o isolamento bacteriano juntamente com a caracterização bioquímica das colônias, sendo estas metodologias trabalhosas e que requerem um grande tempo para execução. Dessa forma, PCR em tempo real (qPCR) conta com a possibilidade de reduzir o tempo de análise para um ou dois dias. O atual trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma PCR em tempo real para o diagnóstico do *M. bovis* em amostras de colônias bacteriana. Os iniciadores foram desenhados para o gene PE-PGRS 20, codificante da proteína da família PE-PGRS. A técnica mostrou-se eficiente, específica e robusta para o diagnóstico de *M. bovis*.

Palavras chave: *Mycobacterium bovis*, diagnóstico, qPCR, validação, PE-PGRS 20.

Introdução

A tuberculose bovina é enfermidade crônica granulomatosa que afeta os linfonodos e diversos tecidos bovinos. O agente causador é o *Mycobacterium bovis*, um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), capaz de infectar várias espécies de animais domésticos, silvestres e o homem. As perdas econômicas determinadas por esta enfermidade se manifestam pela redução de 10 a 20% da produção leiteira, do ganho de peso, infertilidade, condenação de carcaças e mortes dos animais (Hernandez, 1998; Lilenbaum, 2000).

A metodologia tradicional de diagnóstico da tuberculose bovina envolve o teste da tuberculina e o isolamento bacteriano, sendo

esse último o padrão ouro (Brasil, 2006). Uma das principais características do isolamento é a demora do resultado decorrente do crescimento lento do bacilo que pode demorar até quatro semanas. Após a detecção do crescimento das colônias, ainda é necessária a confirmação da espécie pelas provas bioquímicas. Devido à necessidade de elevado número de bactérias para a realização de todos os testes, muitas vezes é preciso iniciar um novo crescimento do *M. bovis*, atrasando em até três semanas o diagnóstico tradicional.

A lentidão do diagnóstico bacteriológico tem diversas implicações na bovinocultura, uma delas a proibição de exportação de carne bovina em estabelecimentos com suspeita de tuberculose. Metodologias que auxiliem na velocidade dessas provas são, portanto, consideradas um grande avanço na detecção do *M. bovis*. Uma das etapas a se considerar é a correta identificação do bacilo por métodos moleculares, substituindo as provas bioquímicas. Os métodos atuais são lentos e não são considerados 100% confiáveis devido a estirpes intermediárias como as variantes nos testes de T₂CH niacina de *M. tuberculosis* e a variante de pirazinamida do *M. bovis* (Nieman et al., 2000).

A semelhança genômica entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é um dos principais problemas na utilização dos métodos moleculares para diferenciação destes micro-organismos. A similaridade genômica entre estes micro-organismos alcança 99,95%, sendo as deleções as principais diferenças entre eles (Fleischmann et al., 2002; Garnier et al., 2003). A diferenciação precisa dos membros do MTC é clinicamente importante, em função de variações naturais *M. bovis* e *M. tuberculosis* a resistência para medicamentos anti tuberculose (Somoskovi

et al., 2009). Como tal, a capacidade de diferenciar entre os membros da MTC pode potencialmente permitir a vigilância da exposição zoonótica, além de fornecer informações epidemiológicas precisas para o clínico (Reddington et al., 2011).

As técnicas de biologia molecular podem ter grande aplicabilidade em laboratório de diagnóstico de doenças animais. O desenvolvimento de amplificação de segmentos de DNA abriu enormes perspectivas para detecção de agentes infecciosos. A PCR apresenta vantagens em comparação aos métodos tradicionais de diagnóstico, pois é altamente sensível, específica e rápida. Para se produzir um diagnóstico positivo são necessárias poucas células e estas não precisam estar viáveis, desta forma, amostras que são inadequadamente preservadas podem ser utilizadas (Phuerktes *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2001). A qPCR tem como vantagem entre elas a maior precisão, reprodutibilidade, melhor controle de qualidade no processo, menor risco de contaminação e descarta a necessidade do uso de eletroforese após a reação (Novais et al., 2004). Além disso, esta técnica reduz o tempo de análise para um ou dois dias, fato importante em um processo trabalhoso e demorado como o diagnóstico microbiológico de tuberculose. O atual trabalho tem como objetivo padronizar uma qPCR utilizando a tecnologia de agentes intercalantes do DNA para a correta identificação do *M. bovis*.

Material e método

Desenho dos Iniciadores

Os oligonucleotídeos desenhados no presente trabalho foram baseados no genoma completo do *M. bovis* (Garnier et al., 2003). Primeiramente as sequências de DNA do micro-organismo, presente no banco de dados GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram

alinhados no BioEdit (Hall, 1999), juntamente com uma sequência do *M. tuberculosis* (AL123456.3, acesso do GenBank). Desta foi possível encontrar uma região polimórfica entre os dois micro-organismo e esta foi utilizada em nossas análises. Os iniciadores foram desenhados no programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) e analisados no programa Oligo Analyser 3.1 (IDT, EUA) para verificação das estruturas secundárias e dos dímeros formados. A especificidade analítica *in silico* dos iniciadores foi testada com o programa o PrimerBlast (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) (Altschul et al., 1990).

A região escolhida para o diagnóstico específico de *M. bovis* foi do gene PE-PGRS 20, codificante da proteína da família PE-PGRS. Os iniciadores Mbovis-100-F: 5'GGC TGT GAT GCT GCT TCC3' (posição no genoma 205009-205026, BX248337.1 disponível no GenBank) e Mbovis-100-R: 5'ACG AGG CTC CGT GCT GTT3' (posição 205108-205091) amplificam um segmento de 100pb. As concentrações para a qPCR Mbovis-100 foram definidas como: 7,5 pmol/μL de cada iniciador (IDT, EUA), 1,5 U GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, EUA), 20% tampão GoTaq Incolor Hot Start 5x, 1,5 mM MgCl₂, 1 μL de Eva Green 20x (Biotium, EUA), 2 μL de Rox 10X (Biotium, EUA), 10 mM dNTP, para um volume final de 20 μL sendo deste 2 μL de DNA. Com um passo de 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 15s, 63°C por 20s e 72°C por 30s com leitura no ciclo de extensão. A curva de desnaturação foi realizada de 72°C a 99°C com intervalos de fluorescência a cada 1% do aumento de temperatura.

Amostras

A amostra padrão *M. bovis* AN5 CRNC 01 e *M. tuberculosis* H37Rv CRNC 23 foi

utilizada durante todo o processo de padronização e validação da PCR como controles. Além delas, toda rodada de reações contou com controles para se verificar contaminação na extração do DNA ou nos reagentes de PCR. Três micobacterias do complexo *M. tuberculosis* (MTC), três do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI), outras onze micobacterias MOTT (*mycobacteria other than tuberculosis*) e *Rhodococcus equi* CRC 09/01, *Corynebacterium pseudotuberculosis* CRC 09/02 e *Nocardia asteroides* CRC 10/01 foram utilizadas para verificar a especificidade analítica dos iniciadores.

Quatrocentas e trinta e seis amostras brasileiras isoladas e identificadas bioquimicamente pelo Laboratório de Diagnóstico de Doenças Bacterianas do Laboratório Nacional de Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (DDB/LANAGRO-MG), sendo 274 de *M. bovis* e 156 de *M. tuberculosis*, foram utilizadas na qPCR para teste de eficiência e especificidade.

Extração do DNA

Meios de cultura contendo as colônias bacterianas foram lavados com 1,5mL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As amostras foram inativadas por uma hora a 87,5°C. Após o processo de inativação 200µL da suspensão bacteriana foram utilizados no processo de extração. Nestas amostras acrescentou-se 60µL de Lizosima (10 mg/mL) e incubou as mesmas por duas horas a 37°C. Para quebra de proteínas adiciono-se 30µL de Proteinase K (10 mg/mL) e 60µL de SDS a 10%, incubou as amostras por quatro horas a 56°C. Para retirada das proteínas utilizou-se 400µL de fenol saturado pH 8,0 e 15µL de álcool isoamílico. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 678g por 5min a temperatura ambiente e o sobrenadante (fase aquosa) foi retirado e transferido para um novo tubo. O

DNA foi precipitado utilizando 275µL de etanol P.A. e 15µL de isopropanol. Em seguida o material foi centrifugado a 18.327g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500µL de etanol 70%. Após a lavagem, a amostra foi centrifugada a 18.327g por 10 min a 4°C, com o descarte do sobrenadante e imediata secagem do DNA. Após seco o DNA foi resuspendido em 50µL de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As amostras foram estocadas a 4°C até o momento de uso.

Crítérios

Os parâmetros para a validação foram realizados segundo o *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (OIE, 2010).

Padronização da PCR em tempo real (qPCR)

As qPCR foram padronizadas no instrumento Real Time 7500[®] (Applied Biosystems, EUA). Visando o ajuste das melhores concentrações dos reagentes da qPCR, os testes foram realizados empiricamente, de acordo com ajustes nas concentrações de iniciadores e na temperatura de anelamento. As amostras foram consideradas positivas somente com análise de curva de *melting* com picos de temperatura que não diferissem em mais de 1°C do controle positivo utilizado no mesmo experimento.

Eficiência da reação

A eficiência da reação foi testada a partir da diluição do DNA das amostras controle. Cada diluição foi testada em duplicatas tendo as concentrações estimadas por espectrofotômetra (Nanovue[®]; GE Healthcare, EUA). O número de cópias foi estimado de acordo com fórmula definida por Staroscik (2004). Após o cálculo do

número de cópias, uma série de curvas-padrão foi feita para determinação da melhor concentração de iniciadores definindo-se como R² mínimo de 0,99, eficiência mínima de 90% e eficiência máxima de 110%.

Limite de Detecção (LD)

A determinação do limite de detecção foi realizada a partir de diluição 1/10 do DNA da amostra controle. O LD foi determinado como a maior diluição em que todas as amostras fossem positivas. Para confirmação do resultado a diluição que apresentava o LD foi repetida vinte e uma vezes, com reprodutibilidade aceitável de 95%.

Repetitividade e Reprodutibilidade

A repetitividade foi estimada a partir dos resultados de sete amostras representativas do analito estando estas dentro da faixa de detecção dos testes. Foram extraídos o DNA das sete amostras durante três dias. Para todas as amostras foram feitas qPCR em triplicata. Para se obter uma repetitividade de 95%, ou seja, só haveria repetitividade se houvesse no máximo um erro em cada dia de PCR. Para verificar possíveis alterações no ensaio um segundo analista realizou a técnica utilizando os mesmos critérios e as mesmas amostras.

Vinte e uma amostras, os iniciadores e as condições da qPCR, foram enviadas para dois laboratórios com o objetivo de analisar a reprodutibilidade interlaboratorial desde a extração. A amostragem foi realizada segundo OIE (2010) com suspensões bacterianas de *M. bovis*, *M. tuberculosis* e MOTT. O primeiro laboratório, Escola de Veterinária da UFMG, realizou os testes de acordo com a metodologia padrão descrita nesse trabalho. O segundo, Lanagro/SP, realizou as mesmas qPCR, porém com diferentes extrações de DNA, uma primeira extração pela metodologia do Magne Pure[®] (Roche, Estados Unidos) e uma segunda

extração pela fervura da suspensão bacteriana por 90 °C por uma hora.

Robustez

As seguintes variáveis foram analisadas para abranger um maior número de reagentes e equipamentos, sem causar alterações, no diagnóstico da tuberculose bovina. Foram testados quatro kits de extração: Nucleospin Triprep[®] (MN, EUA), DNeasy Blood & Tissue Kit[®] (Qiagen, EUA), AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit[®] (Bioneer, EUA) e Genomic DNA Isolation Kit[®] (RBC, EUA). Para a realização da qPCR, foram testados os Kits de PCR Fast-Plus EvaGreen qPCR Master Mix[®] (Biotium, EUA), 2.0X RealQ-PCR Master Mix[®] com Sybr Green (Neobio, Brasil) e Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG[®] (Invitrogen, EUA). Foram utilizadas sete amostras que tiveram sua qPCR realizada em triplicata técnica no Real Time 7500[®] (Applied Biosystems, EUA). A pPCR original também foi testada no equipamento Rotor gene 3.000[®] (Qiagen, EUA).

Análise Estatística

Foi utilizado o teste de kappa e de McNemar, além da sensibilidade e especificidade diagnóstica (Kraemer, 1992).

O cálculo de incerteza atende aos critérios da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, parágrafo 5.4.6.2, tendo como referência nos cálculos o OGC 005 – Guia para estimativa de incerteza em ensaios microbiológicos emitidos pelo IPAC acreditação. Para o cálculo foi utilizado os resultados dos picos da temperatura de *melting* das amostras analisadas na reprodutibilidade e na repetitividade. Para tais dados foram calculadas o desvio padrão (DP) com o qual, foi calculado a incerteza (U) do método:

$$U = k \cdot \sqrt{DP^2}$$

$K = 2$ (a nível de confiança de 95%), de acordo com a tabela de distribuição de t de Student.

Resultados

Os alvos dos oligonucleotídeos estudados neste trabalho não foram amplificados em nenhuma das amostras de *Mycobacterium* MOTT e MAI, as MTC, com exceção do *M. bovis*, e outras espécies da ordem Actinomycetales. Todas as amostras de *M. bovis* foram amplificadas e nenhuma amostra de *M. tuberculosis* apresentou amplificação.

A média do pico da temperatura de *melting* para *M. bovis* foi de 92,06°C, com a incerteza 0,78°C (Figura 2). No entanto, foram observadas amostras positivas fora do intervalo de incerteza, máximo 92,83°C e mínima 91,12°C.

Eficiência da Reação

A qPCR apresentou eficiência de 90,969% com R^2 0,998 (Figura 3). O valor do *slope* foi de -3,559 e do *y-intersept* de 30,163.

Limite de Detecção

A maior diluição que apresentou amplificação dói $3,41 \times 10^4$ cópias de DNA/ μ L, sendo este considerado o limite de detecção do teste (Tabela 5).

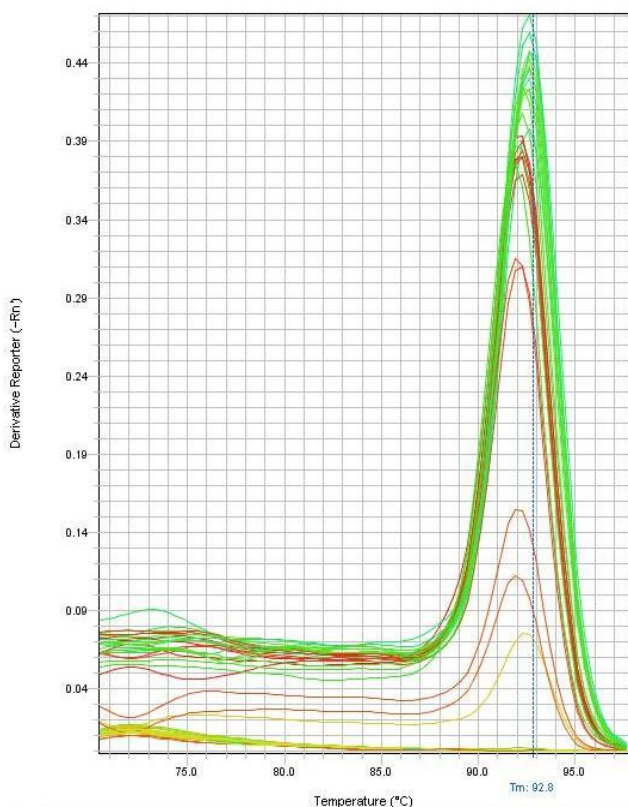


Figura 2 Derivada da curva de desnaturação (temperatura de *melting*) mostrando a variação específica da temperatura para a qPCR Mbovis-100, entre 91,58°C e 92,53° C.

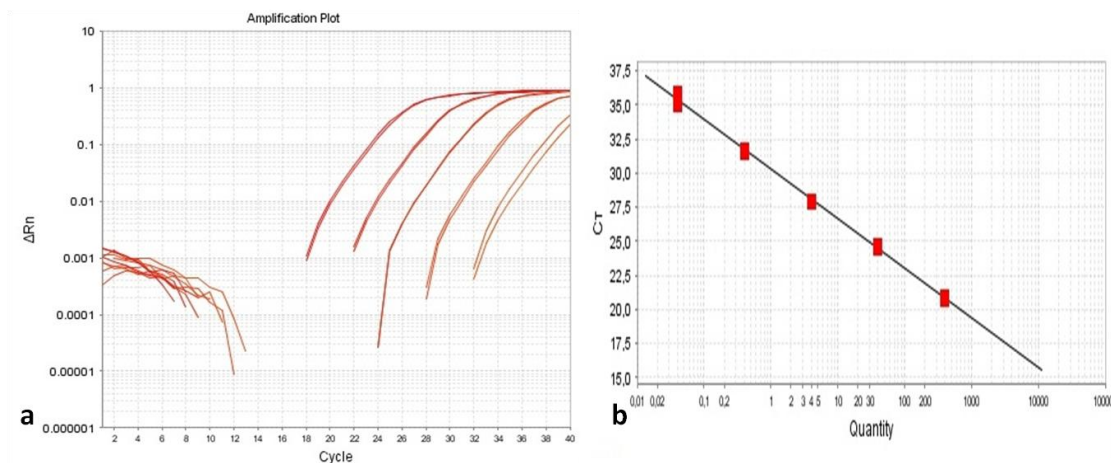


Figura 3 Curva de eficiência da qPCR Mbovis-100 produzida a partir da diluição em 1/10 da amostra controle *M. bovis* AN5 CRNC 02. a) Curva de amplificação das diluições do DNA; b) Disposição dos pontos da curva de eficiência em uma reta. Eixo x representando a quantificação do DNA e eixo y, o ciclo de *threshold* – ou linear (Ct).

Tabela 4 Resultado da média do ciclo de threshold (Ct), e seu respectivo desvio padrão (DP) para a curva de diluição em 1/10 da amostra controle *M. bovis* AN5 CRNC 02 da qPCR Mbovis-100.

<i>Cópias/μL</i>	<i>Ct Médio</i>	<i>DP</i>
$3,41 \times 10^7$	18,72	0,051
$3,41 \times 10^6$	22,12	0,003
$3,41 \times 10^5$	25,38	0,009
$3,41 \times 10^4$	28,44	0,402
$3,41 \times 10^3$	--	--

Repetibilidade e reprodutibilidade

Os valores médios da curva de *melting* por amostra nos testes de reprodutibilidade de

repetibilidade na qPCR Mb-100 estão descritos na Tabela 6. O desvio padrão foi de 0,02 e a incerteza de 0,03.

Tabela 5 Valores da média da curva de melting (md) para cada amostra, realizada em três dias consecutivos na qPCR Mbovis-100 para repetibilidade (1ª analista) e reprodutibilidade (2ª analista).

Amostra	Repetibilidade			Reprodutibilidade		
	md1 (°C)	md2(°C)	md3(°C)	md1(°C)	md2(°C)	md3(°C)
1	92,18	92,32	91,73	92,36	92,03	91,97
2	92,24	92,44	91,79	92,49	92,14	92,10
3	92,05	92,26	91,60	92,30	91,97	91,91
4	91,67	91,84	91,20	91,86	91,49	91,47
5	92,36	92,50	91,73	92,49	91,79	91,85
6	92,49	92,56	91,93	92,49	91,97	91,85
7	92,18	92,26	91,73	92,30	91,73	91,66

Robustez

Na Tabela 7 são mostradas as variações na temperatura de *melting* quando foi utilizado os kits de PCR “Fast-Plus

EvaGreen qPCR Master Mix” (Biotium, EUA) e “2.0X RealQ-PCR Master Mix com Sybr Green” (Neobio, Brasil) (Figura 4), e o equipamento Rotor gene 3000 (Qiagen, EUA).

Tabela 6 Variação da temperatura do pico de *melting* apresentados nos testes de robustez da qPCR Mbovis-100.

Amostra	Robustez							
	1	2	3	4	5	6	7	8
md (°C)	91,87	92,12	91,93	92,46	89,48	93,43	91,45	95,55
U	0,22	0,37	0,30	0,52	0,57	0,37	0,34	0,80
Máxima	92,09	92,49	92,30	92,48	90,06	93,81	91,79	96,36
Mínima	91,66	91,74	91,55	91,95	88,91	93,06	91,11	94,74

1 - AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, EUA); 2 - DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, EUA); 3 - Nucleospin Triprep (MN, EUA); 4 - Genomic DNA Isolation Kit (Real Biotech Corporation, EUA), 5 - “Fast-Plus EvaGreen qPCR Master Mix” (Biotium, EUA); 6 - “2.0X RealQ-PCR Master Mix com Sybr Green” (Neobio, Brasil); 7 - Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen, EUA). 8 - equipamento Rotor Gene 3000 (Qiagen, EUA), md: média do pico de *melting* encontradas para cada parâmetro analisado; U: incerteza, com nível de confiança de 95%, máxima: maior valor da curva da curva de *melting* encontrado para o parâmetro analisado; mínima: menor valor da curva da curva de *melting* encontrado para o parâmetro analisado.

Análise Estatística

O teste McNemar não mostrou diferença significativa entre a qPCR Mbovis-100 e isolamento microbiológico e o teste de Kappa mostrou concordância perfeita (1,0) entre os dois testes.

Discussão

Há uma vasta variação de genes que codificam as proteínas da família PE-PGRS e EPI (Cole et al., 1998). Embora apresentasse função desconhecida, existe agora um conjunto considerável de evidências que sugerem que pelo menos algumas destas proteínas são de superfície e desempenham um papel na adesão e modulação da resposta imune (Banu et al., 2002; Brennan et al., 2002). Entre *M. bovis* (AF2122/97) e *M. tuberculosis* (H37Rv) existem variação da sequência em genes que codificam 29 diferentes PE-PGRS e 28 proteínas resultantes de EPI gerando inserções e deleções. Aproximadamente

60% destas proteínas são diferentes (Garnier et al., 2003).

Os testes de especificidade analítica não contaram com três espécies do MTC: *M. canettii*, *M. africanum 1*, *M. africanum 2*. Análises *in silico* realizadas nas etapas finais desse trabalho constataram, no entanto, que a qPCR Mb-100 pode gerar amplicons específicos para essas bactérias. O problema foi detectado apenas posteriormente devido às atualizações recentes do genoma completo destas bactérias (HE572590.1 *Mycobacterium canettii* CIPT 140010059, FR878060.1 *Mycobacterium africanum* GM041182). Estes resultados não invalidam, no entanto, a utilização destas qPCR fora da África. *M. canettii* e *M. africanum* são causadoras de tuberculose humana, mas estão restritas à África ou a casos intimamente relacionados com esse continente (Kremer et al., 1999, Frothingham et al., 1999).

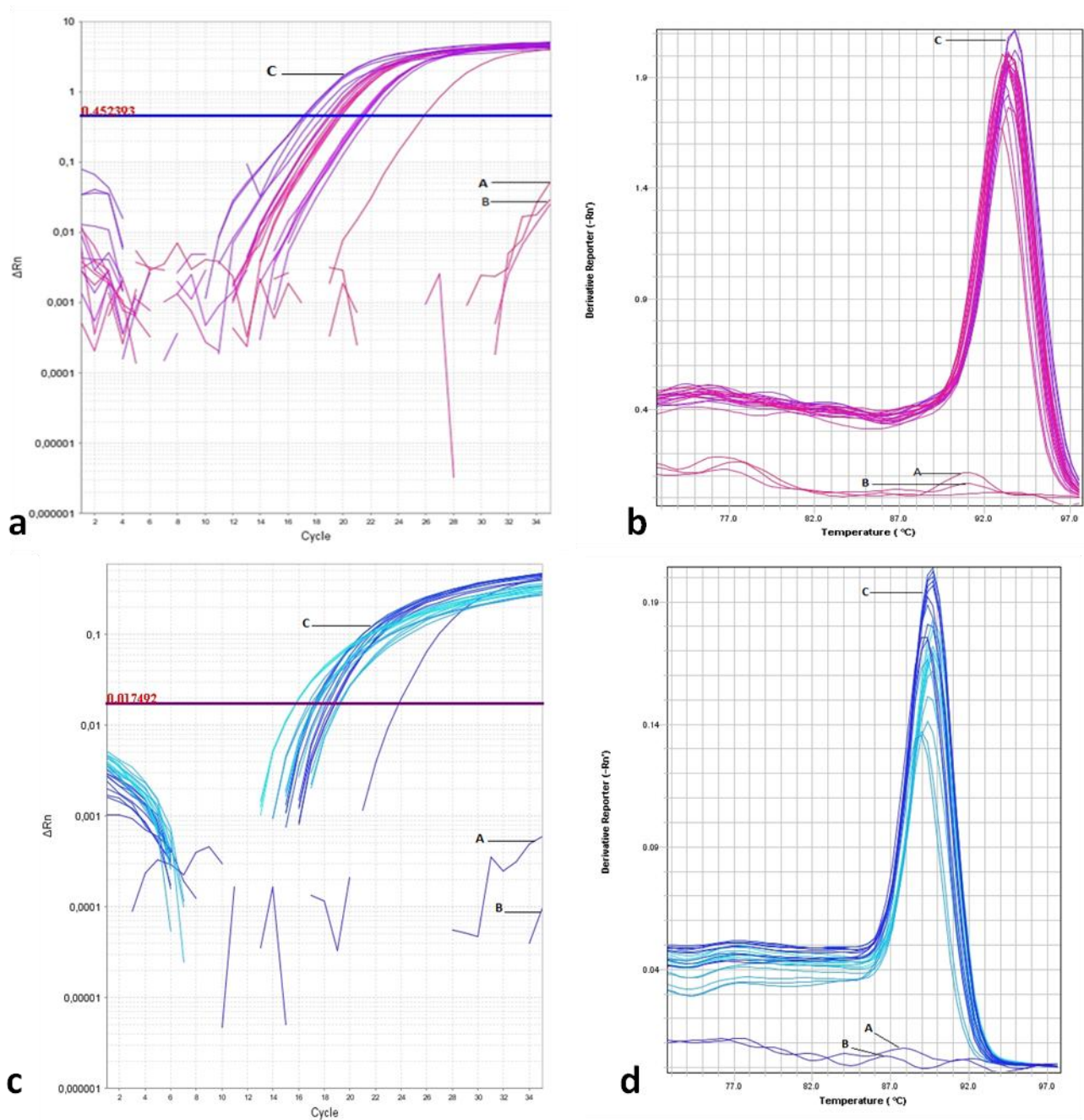


Figura 4 Curva de amplificação (a e c) e derivada da temperatura de melt (b e d) das qPCR Mbovis-100 com os Kits “2.0X RealQ-PCR Master Mix com Sybr Green” (Neobio, Brasil) (a e b) e “Fast-Plus EvaGreen qPCR Master Mix” (Biotium, EUA) (c e d). A: amostra de *M. tuberculosis*; B: NTC; C: amostras de *M. bovis*

A qPCR Mb-100 apresentou eficiências dentro dos parâmetros aceitáveis mesmo para a utilização em quantificação, sendo estas de 90,96% com R^2 maior do que 0,99 para a curva padrão. Quanto mais próximo de 100% o valor de eficiência, melhor a performance da qPCR, indicando que os produtos gerados praticamente dobram a cada ciclo. Apesar de amplificar uma região de baixa complexidade com porcentagem de G+C igual a 72%, a ausência de repetições de nucleotídeos permite melhor eficiência no anelamento específico dos iniciadores mesmo em temperaturas altas, como as utilizadas para aumento da especificidade das qPCR Mbovis-100.

A média de temperatura de dissociação para *M. bovis* foi de 92,06°C, com a incerteza 0,78°C. No entanto, foram observadas amostras positivas fora do intervalo de incerteza, máximo 92,83°C e mínima 91,12°C. A sequência PE-PGRS apresenta um conteúdo GC de aproximadamente 80% (72% na região amplificada) e se caracterizam pela presença de resíduos de glicina e alanina abundantes em seus domínios PGRS terminal. Regiões ricas em repetições de glicina podem gerar exclusões e inserções (Haddad et al., 2004). Tal fato poderia explicar a presença de amostras fora do limite de incerteza.

O LD da qPCR foi calculado com diluições sucessivas do DNA bacteriano puro. Pelo fato do micro-organismo possuir estrutura genômica estável e sem plasmídeos, foi possível utilizar a quantidade de DNA para calcular o número de cópias detectado. O LD foi de 0,16 ng/ μ L (equivalente a $3,41 \times 10^3$ cópias/ μ L). Os valores foram pelo menos dez vezes superiores a encontrado por outros trabalhos que também utilizaram a PCR para a identificação de *M. bovis* e detectam até 20 pg de DNA (Shah et al., 2002, Bakshi et al., 2005). É possível que as qPCR amplifiquem quantidades menores de DNA, pois o LD determinado neste trabalho, ao contrário dos outros, foi realizado para se

verificar a quantidade mínima do ácido nucleico detectado em 100% das amplificações. Quantidades menores podem gerar resultados falsos negativo. Caso seja necessário usar massa inferior ao LD, é aconselhável a utilização da amostra em triplicata e considerar qualquer amplificação com pico de desnaturação específico como positiva.

Os testes de reprodutibilidade foram realizados apenas para o *M. bovis*. Todas as amostras amplificaram em todas as repetições realizadas. Os baixos valores do desvio padrão e incerteza indicam a baixa variabilidade da técnica e garantem a reprodutibilidade da mesma dentro do laboratório, mesmo com diferentes analistas.

Os processos de repetitividade e reprodutibilidade de uma técnica precisam ser comprovados para garantir o uso da mesma no diagnóstico e identificação de microrganismos, além de ser exigência das normas de acreditação de laboratórios (Freitas et al., 2006). Os resultados encontrados nessa fase de validação da qPCR Mb-100 foram essenciais para evidenciar que os resultados são reprodutíveis, mesmo com variações de acordo com o dia ou o analista.

As fases de validação de um método incluem não apenas os testes dentro de um mesmo laboratório, mas a comprovação de desempenho da técnica em diferentes instituições. Sabe-se que a PCR muitas vezes passa por diferentes adaptações a ser implantada em um laboratório, seja por mudanças de equipamento, reagentes ou pela execução por diferentes analistas (Edmondson et al., 2007).

Os testes realizados no Escola de Veterinária da UFMG apresentaram resultados 100% concordantes com aqueles encontrados no Lanagro/MG. Houveram poucas variações na técnica, visto que foram utilizados

reagentes e equipamento de PCR semelhantes ao do Lanagro/MG. Os testes realizados no Lanagro/SP apresentaram um maior grau de divergência. A princípio com a extração feita pelo kit Magna Pure[®], houve a amplificação específica de apenas uma amostra, provavelmente decorrente à pequena quantidade de DNA extraído. A massa estimada de DNA foi de cerca de 0,06 ng/ μ L, fora da faixa de erro do equipamento Nanovue (GE Healthcare, EUA) utilizado na medição. É bem provável que muito pouco ou nenhum DNA tenha sido purificado. Quando a técnica foi executada pela segunda vez, agora com fervura das suspensões bacterianas, apenas três amostras discordaram (falso negativo). É bem provável que o excesso de proteínas ou a baixa quantidade de DNA tenham contribuído para inibição da qPCR. O excesso de proteínas pode influenciar negativamente na dinâmica da PCR (Demeke e Jenkins, 2010).

Os testes interlaboratoriais fazem parte das exigências para validação de um teste de diagnóstico (OIE, 2010). Os resultados para a qPCR testada demonstraram que pode ser executada seguramente em outros laboratórios, desde que repedidas as condições de utilização da mesma. A qPCR deve ser vista como um processo completo, desde a conservação da amostra, extração do DNA até avaliação do pico de desnaturação. Diferenças, como notado pela extração do DNA, podem acarretar em erros no resultado final. Certos métodos podem não ser ideais para gerar os moldes de amplificação, precisando ser adaptados conforme as condições do laboratório. O método de fervura é utilizado em outras publicações (Bakshi et al., 2005, Warren et al., 2006), mas é preciso ser avaliado para a presença de inibidores ou de baixo rendimento de ácidos nucleicos. Experiências em nosso laboratório com a utilização da fervura para quebra das células bacterianas e liberação do DNA levaram a resultados falso negativos em PCR já validadas para identificação

genética de outras bactérias (dados não mostrados), sendo esses facilmente corrigidos com a purificação do DNA conforme descrito nesse trabalho.

Os testes de reprodutibilidade interlaboratorial indicaram que certos desvios não são tolerados pela técnica, podendo gerar resultados inesperados, como os falsos negativos observados. Com o intuito de avaliar o comportamento da qPCR, foram avaliados a mudança de equipamento de qPCR, kit de extração de DNA e kits de amplificação. Todas as amostras amplificaram, gerado resultados positivos com picos de desnaturação específicos quando comparados ao controle positivo.

Os picos de desnaturação tiveram resultados bastante variáveis em todos os testes, no entanto essas mudanças já eram esperadas. O Rotorgene 3000 tem um sistema de detecção de fluorescência e de troca de calor diferente do Real Time 7500, o que gera resultados discrepantes nas temperaturas específicas de dissociação dos amplicons quando comparados entre si, no entanto, com pouca variação com as amostras rodadas no mesmo equipamento. Kits de extração geram resíduos diferentes durante a extração do DNA, muitos deles íons que influenciarão na dissociação do DNA.

Kits de amplificação de diferentes marcas possuem tampões com fatores que causam diferenças no ponto específico em que ocorre a desnaturação da dupla fita (Wittwer et al., 2001). Um dos kits utilizou até mesmo um agente intercalante diferente, o SYBR Green, que tem características de saturação da molécula de DNA diferente do Eva Green (Eischeid et al., 2011). O fato de os resultados não terem sido alterados demonstra a robustez da qPCR. Nenhum desses fatores invalidou os resultados ou impediu que esses reagentes fossem utilizados com a qPCR Mb-100.

Conclusão

A PCR em tempo real Mbovis-100 é uma alternativa confiável para a substituição dos testes bioquímicos na caracterização do *M. bovis*. Os testes mostraram que a PCR apresenta repetitividade, reprodutibilidade quando são utilizados os utilizados os parâmetros originais de extração e amplificação.

Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- BAKSHI, C.S., SHAH, D.H., VERMA, R. et al. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Vet Microbiol.*, v. 109, n. 3-4, p. 211-216, 2005.
- BANU, S., HONORE, N., SAINT-JOANIS, B. et al. Are the PE -PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol.*, v. 44, n. 1, p.9-19, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT. Brasil: MAPA/DAS/DAS, 2006. 184p. (Manual Técnico).
- BRENNAN, M.J., DELOGU, G. The PE multigene family: a 'molecular mantra' for mycobacteria. *Trends Microbiol.* v. 10, n.5, p. 246-9, 2002.
- COLE, S.T., BROSCHE, R., PARKHILL, J. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* v. 393, n. 6685, p. 537-44, 1998. Erratum in: *Nature* v. 396, n. 6707, p. 190, 1998.
- DEMEKE, T., JENKINS, G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem.*v. 396, n. 6, p. 1977-90, 2010.
- EDMONDSON, M.A., GIVENS, M.D., WALZ, P.H. et al. Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples. *J Vet Diagn Invest.* v. 19, n. 4, p. 376-81, 2007.
- EISCHEID, A.C. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Res Notes.* v. 28, n. 4, p. 263, 2011.
- FLEISCHMANN, R.D., ALLAND, D., EISEN, J.A. et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol.*, v. 184, n. 19, p. 5479-5490, 2002.
- FREITAS, E.I., LEMOS, A.A., MARIN, V.A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. *Ciênc. saúde coletiva*, v.11, n.4, p. 1073-1083, 2006.
- FROTHINGHAM, R., STRICKLAND, P.L., BRETZEL, G. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from West Africa. *J Clin Microbiol.* v. 37, n. 6, p.1921-6, 1999.
- GARNIER, T., EIGLMEIER, K., CAMUS, J.C. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, 2003.
- HADDAD, N., MASSELOT, M., DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Res Vet Sc* v. 76, p. 1-18, 2004.

- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HERNANDEZ, J., BACA, D. Effect of tuberculosis on milk production in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, v. 213, n. 6, p. 851-854, 1998.
- KRAEMER, H.C. *Evaluating Medical Tests*. Newbury Park, CA: Sage. 1992.
- KREMER, K, VAN SOOLINGEN, D., FROTHINGHAM, R. et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.* v.37, p.2607-18, 1999.
- LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 22, n. 4, p. 145-151, 2000.
- MARTINEZ, G., HAREL, J., GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. *Can. J. Vet. Res.*, v. 65, p. 68-72, 2001.
- NIEMANN, S., RICHTER, E., RÜSCHGERDES, S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol.* v.38, n.1, p.152-7, 2000.
- NOVAIS, C.M., PIRES-ALVES, M., SILVA, F.F. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento*. Ed. 33, jun-dez 2004.
- OIE (World Organization for Animal Health). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. cap. 1.1.4/5, p. 1-18. In: ____, *Terrestrial Manual*. França: Paris Office International des Epizooties, 2010.
- PHUERKTES, P., MANSELL, P.D., BROWNING, G.F. *Multiplex Polymerase Chain Reaction* assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci.*, n. 84, p. 1140-1148, 2001.
- REDDINGTON, K., O'GRADY, J., DORAI-RAJ, S. et al. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. *PLoS One*. v.6, n. 8, p. e23481, 2011.
- SHAH, D.H., VERMA, R., BAKSHI, C.S. et al. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* v. 214, p. 39-43, 2002.
- SOMOSKOVI, A., DORMANDY, J., MAYRER, A.R. et al. "*Mycobacterium canettii*" isolated from a human immunodeficiency virus-positive patient: first case recognized in the United States. *J Clin Microbiol.* v. 47, n. 1, p. 255-7, 2009.
- STAROSCIK, A. *Calculator for determining the number of copies of a template*. Available online: <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>, 2004 (accessed on December 2011).
- UNTERGASSER, A., NIJVEEN, H., RAO, X. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, p. W71-W74, 2007.
- VAN SOOLINGEN, D., HOOGENBOEZEM, T., DE HAAS, P.E. et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex,

Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.* v. 47, n. 4, p. 1236-45, 1997.

WARREN, R.M., GEY VAN PITTIUS, N.C., BARNARD, M. et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of

difference. *Int J Tuberc Lung Dis.* v. 10, n. 7, p. 818-22, 2006.

WITTEW, C.T., HERRMANN, M.G., GUNDRY, C.N. et al. Real-time multiplex PCR assays. *Methods.* v. 25, n. 4, p. 430-42, 2001.

Capítulo 4

PCR em tempo real para caracterização de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de suspensão bacteriana.

Resumo

O *Mycobacterium tuberculosis* é o principal causador da tuberculose em humanos. Com a ocorrência do HIV o bacilo ganhou destaque, apresentando-se como uma importante infecção oportunista, associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O atual trabalho teve como objetivo desenvolver uma PCR em tempo real utilizando a tecnologia SYBR Green para o diagnóstico do *M. tuberculosis* em amostras de suspensão bacteriana. Os iniciadores foram desenhados para gene *Rv151*. Foram testadas 99 amostras de *M. tuberculosis* e 60 amostras de *M. bovis*, nenhuma amostra do bacilo bovino apresentou amplificação. Testes estatísticos mostraram que não há diferença significava entre a qPCR e a microbiologia junto com os testes bioquímicos.

Palavras chaves: *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, gene *Rv151*, suspensão bacteriana.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma das mais graves e antigas doenças conhecidas. Estudos utilizando DNA encontrados em ossos de bóvidos da América do Norte e datado de 17.000 anos a.C. demonstraram a presença de um organismo do complexo *M. tuberculosis* (Rothschild et al., 2001). Na Grécia em 460 a.C. Hipócrates fez descrições da doença. Durante a Revolução Industrial, inúmeros casos de tuberculose surgiram pela aglomeração de trabalhadores e as condições precárias de saúde e de vida da época (Costa, 1985). No início do século XX, a doença desencadeava um terror na

Europa, principalmente na primeira metade do século, onde o diagnóstico significava uma sentença de morte para 50% dos doentes, na maioria crianças e jovens (Daniel et al., 1994).

Esperava-se que a tuberculose fosse erradicada até o ano 2000 nos países desenvolvidos, porém a ocorrência de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) provocou uma mudança na tendência epidemiológica da TB que, com isso, voltou a apresentar-se como uma importante infecção oportunista, associada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Carvalho et al., 2006). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que, a cada ano, faz adoecer 8 milhões de pessoas e mata 2,9 milhões de pessoas. Dos 8 milhões de casos anuais, 95% ocorrem em países em desenvolvimento (Brasil, 2002). A co-infecção TB/HIV constitui, atualmente, um sério problema de saúde em muitos países (Brasil, 1999). A tuberculose pulmonar, no passado, era utilizada como indicador de desenvolvimento periférico, mas hoje, com a pandemia da AIDS, tornou-se a terceira doença oportunista mais frequente em pacientes HIV positivo (Job et al., 1998; Campos e Pianta, 2001).

O agente causador da tuberculose humana é o *Mycobacterium tuberculosis*. A transmissão é de pessoa a pessoa, a partir de um indivíduo portador de TB respiratória bacilífera (pulmonar e/ou laringea) e por meio da via respiratória (tosse, espirro, fala, canto e respiração). A tuberculose causada por *Mycobacterium bovis*, causador da tuberculose bovina, é clinicamente

indistinguível da causa pelo *M. tuberculosis*. A baciloscopia do escarro, metodologia empregada usualmente no Brasil para o diagnóstico da doença, é ineficaz para distinguir o bacilo humano do bovino. Essa discriminação somente se torna possível pelo emprego de meios de cultivo específicos e posteriormente provas bioquímicas (Ruggiero et al., 2007).

Do ponto de vista diagnóstico, uma das principais desvantagens da cultura de micobactérias é o tempo necessário entre a semeadura e o surgimento de colônias macroscopicamente visíveis (Koneman et al., 2001). Dentre os principais problemas na identificação quanto à espécie estão à diversidade de técnicas e testes que são necessários, além do tempo para identificação completa (Telenti et al., 1993). Entretanto conjuntamente, estes testes podem ser lentos, trabalhosos, imprecisos, não reprodutíveis, podendo gerar um resultado ambíguo e necessitam de instalações adequadas, com alto nível de biossegurança (Huard et al., 2003).

As técnicas de biologia molecular podem ter grande aplicabilidade em laboratório de diagnóstico de doenças infecto contagiosas. O desenvolvimento de amplificação de segmentos de DNA abriu enormes perspectivas para detecção dos agentes infecciosos. A PCR apresenta vantagens em comparação aos métodos tradicionais de diagnóstico: é altamente sensível, específica e rápida. Para se produzir um diagnóstico positivo, são necessárias poucas células e estas não precisam estar viáveis, dessa forma, amostras que são inadequadamente preservadas podem ser utilizadas (Abrahão, 1999; Narayanan, 2004). A PCR em tempo real (qPCR) tem como vantagem, entre elas, a maior precisão, reprodutibilidade, acurácia, melhor controle de qualidade no processo, menor risco de contaminação e descarta a necessidade do uso de eletroforese após a reação (Novais et al., 2004). Além disso, essa técnica reduz o

tempo de análise para três ou quatro dias, fato importante em um processo trabalhoso e demorado como o diagnóstico microbiológico de tuberculose.

É de grande importância clínica a liberação mais rápida do diagnóstico da tuberculose humana. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma PCR em tempo real utilizando a tecnologia Eva Green® para amostras de suspensão bacteriana para ser uma alternativa em relação aos testes bioquímicos.

Material e Método

Desenho dos Iniciadores

Os oligonucleotídeos desenhados no presente trabalho foram baseados no genoma completo do *M. tuberculosis* (Cole et al., 1999). Primeiramente as sequências de DNA do micro-organismo, presente no banco de dados GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram alinhados no BioEdit (Hall, 1999), juntamente com uma sequência do *M. bovis* (BX248333.1, acesso do GenBank). Desta foi possível encontrar uma região polimórfica entre os dois micro-organismo e esta foi utilizada em nossas análises. Os iniciadores foram desenhados no programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) e analisados no programa Oligo Analyser 3.1 (IDT, EUA) para verificação das estruturas secundárias e dos dímeros formados. A especificidade analítica *in silico* dos iniciadores foi testada com o programa o PrimerBlast (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) (Altschul et al., 1990).

A região escolhida para o diagnóstico específico de *M. tuberculosis* foi do gene *Rv1510*. Os iniciadores Mtub-115-F: 5'TTC GAT ATT CGC GGT GTT TT3' (318446-318465, referente a sequência BX842576.1

disponível no GenBank) e Mtub-115-R: 5' CGC AAC TAT TTG GGT GGA G3' (318542-318560) amplificam um segmento de 115pb. As concentrações para a qPCR Mtub-115 foram definidas como: 10 pmol/μL de cada iniciador (IDT, EUA), 1,5 U GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, EUA), 20% tampão GoTaq Incolor Hot Start 5x, 1,5 mM MgCl₂, 1 μL de Eva Green 20x (Biotium, EUA), 2μL de Rox 10X (Biotium, EUA), 10 mM dNTP, para um volume final de 20 μL sendo deste 2μL de DNA. A reação passa por um período de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 10 s, 60°C por 15 e 72°C por 20 s com leituras de fluorescência no ciclo de extensão. A curva de desnaturação foi realizada com os seguintes parâmetros: 45s a 72°C e 3s por grau até 99°C.

Amostras

A amostra padrão *M. tuberculosis* H37Rv CRNC 23 e *M. bovis* AN5 CRNC 01 foi utilizada durante todo o processo de padronização e validação da qPCR como controles, positivo e negativo, respectivamente. Além delas, toda rodada de reações contou com controles para verificar contaminação na extração do DNA ou nos reagentes da qPCR. Três micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (MTC), três do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI), outras onze micobactérias MOTT (*mycobacteria other than tuberculosis*) e *Rhodococcus equi* CRC 09/01, *Corynebacterium pseudotuberculosis* CRC 09/02 e *Nocardia asteroides* CRC 10/01 foram utilizadas para verificar a especificidade analítica dos iniciadores.

Cento e cinquenta e nove amostras isoladas no Brasil pelo Laboratório de Diagnóstico de Doenças Bacterianas do Laboratório Nacional de Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (DDB/LANAGRO-MG) foram utilizadas na

qPCR para teste de eficiência e especificidade, sendo que destas 99 de *M. tuberculosis* e 60 de *M. bovis*. Todas as amostras testadas foram previamente caracterizadas bioquimicamente.

Extração do DNA

Meios de cultura contendo as colônias bacterianas foram lavados com 1,5mL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As amostras foram inativadas por uma hora a 87,5°C. Após o processo de inativação, 200μL da suspensão bacteriana foram utilizados no processo de extração. Nestas amostras acrescentou-se 60μL de Lizosima (10 mg/mL) e incubou as mesmas por duas horas a 37°C. Para quebra de proteínas adicionou-se 30μL de Proteinase K (10 mg/mL) e 60μL de SDS a 10% e as amostras foram incubadas por quatro horas a 56°C. Para retirada das proteínas utilizou-se 400μL fenol saturado pH 8,0 mais 15μL de álcool isoamílico. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 678g por 5min a temperatura ambiente. O sobrenadante (fase aquosa) foi retirado e transferido para um novo tubo. A precipitação do DNA foi realizada utilizando 275μL de etanol P.A. mais 15μL de isopropanol. Após homogeneização por inversão, os tubos foram centrifugados a 18.327g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500μL etanol 70%. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 18.327g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado. Após seco o DNA foi resuspenso em 50μL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As amostras foram estocadas a 4°C até o momento de uso.

Critérios

Os parâmetros para a validação foram realizados segundo o *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (OIE, 2010).

Padronização da PCR em tempo real (qPCR)

As qPCR foram padronizadas no instrumento Rotor Gene 3.000 (Qiagen, EUA). Visando o ajuste das melhores concentrações dos reagentes da qPCR, os testes foram realizados empiricamente, de acordo com ajustes nas concentrações de iniciadores e na temperatura de anelamento. As amostras foram consideradas positivas somente com análise de curva de *melting* com picos de temperatura que não diferissem em mais de 1°C do controle positivo utilizado no mesmo experimento.

Eficiência da reação

A eficiência da reação foi testada a partir da diluição do DNA das amostras controle. Cada diluição foi testada em duplicatas tendo as concentrações estimadas por espectrofotômetro (Nanovue®; GE Healthcare, EUA). O número de cópias foi estimado de acordo com fórmula definida por Starosick (2004). Após o cálculo do número de cópias, uma série de curvas-padrão foi feita para determinação da melhor concentração de iniciadores definindo-se como R² mínimo de 0,99, eficiência mínima de 90% e eficiência máxima de 110%.

Limite de Detecção (LD)

A determinação do limite de detecção foi realizada a partir de diluição 1/10 do DNA da amostra controle. O LD foi determinado como a maior diluição em que todas as amostras fossem positivas. Para confirmação do resultado a diluição que apresentava o LD foi repetida vinte e uma vezes, com reprodutibilidade aceitável de 95%.

Repetitividade e Reprodutibilidade

A repetitividade foi estimada a partir dos resultados de sete amostras de *M.*

tuberculosis e três amostras clínicas de *M. bovis*, estando estas com a concentração de DNA dentro da faixa do limite de detecção da qPCR. Foram extraídos os DNA das amostras durante três dias. Para se obter uma repetitividade de 95%, ou seja, só haveria repetitividade se houvesse no máximo um erro em cada dia de PCR. A reprodutibilidade foi realizada por um segundo analista utilizando os mesmos critérios e as mesmas amostras da repetitividade, durante um dia.

Robustez

Foram utilizadas cinco amostras de *M. bovis* e cinco amostras de *M. tuberculosis* na análises de robustez. Possíveis alterações que uma pipeta e um termociclador descalibrados geraria no diagnóstico da tuberculose humana. Foi realizada uma qPCR com aumento em 1°C da temperatura de anelamento, 10% a menos da enzima GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, EUA), de MgCl₂ e dos iniciadores. A segunda qPCR foi realizada diminuindo em 1°C a temperatura de anelamento, 10% a mais da enzima GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, EUA), de MgCl₂ e dos iniciadores.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste de kappa e de McNemar, além da sensibilidade e especificidade diagnóstica (Kraemer, 1992).

Resultados

A média do pico da temperatura de *melting* para *M. tuberculosis* foi de 94,11°C, com a incerteza 1,31°C (Figura 5). No entanto, foram observadas amostras positivas fora do intervalo de incerteza, máximo 95°C e mínima 93°C.

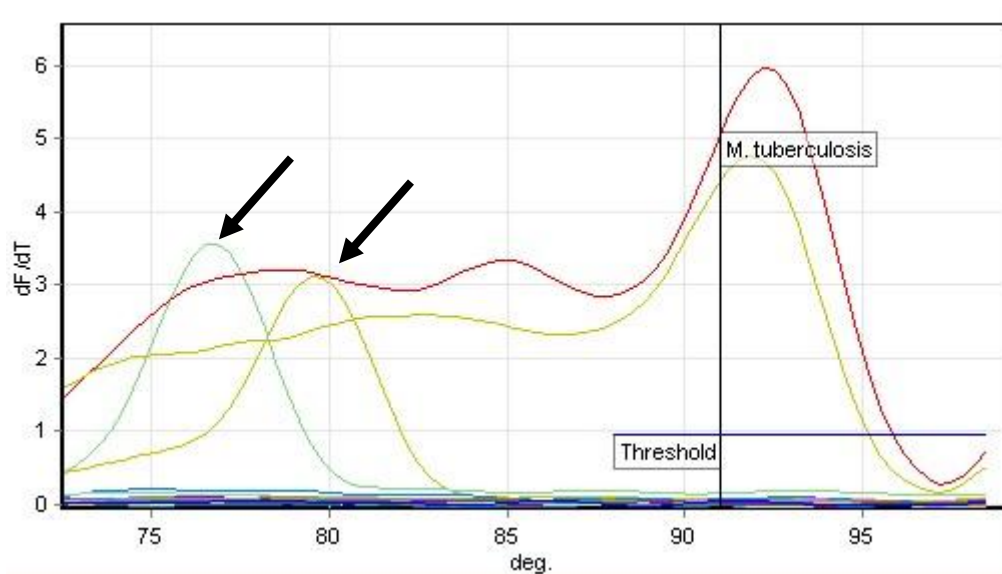


Figura 5 Derivada da curva de desnaturação (curva de melting) mostrando a variação específica da temperatura para a qPCR Mtb-115. As setas indicam amostras de *M. bovis* com picos inespecíficos.

Limite de Detecção

A maior diluição que apresentou amplificação foi $9,88 \times 10^3$ cópias de DNA/ μL , sendo este considerado o limite de detecção do teste (Tabela 8).

Tabela 7 Resultado da média do ciclo de threshold (Ct), e seu respectivo desvio padrão (DP) para a curva de diluição em 1/10 da amostra controle *M. bovis* AN5 CRNC 02 da qPCR Mbovis-100.

Cópias/ μL	Concentração (ng/ μL)	Ct Médio	DP
$9,88 \times 10^7$	470,5	29,27	2,04
$9,88 \times 10^6$	47,0	20,56	0,64
$9,88 \times 10^5$	4,7	24,03	0,24
$3,41 \times 10^4$	0,47	29,95	0,48
$3,41 \times 10^3$	0,047	32,64	0,41
$3,41 \times 10^2$	0,0047	--	--

Repetitividade e reprodutibilidade

reprodutibilidade estão descritos na Tabela 9.

Os valores médios dos Cts em cada dia de qPCR Mtb-115 para repetitividade e

Tabela 8 Valores da média da curva de melting (md) para cada amostra, realizada em três dias consecutivos na qPCR Mtuberculosis-115 para repetibilidade (1ª analista) e reprodutibilidade (2ª analista).

Espécie	Amostras	Repetitividade			Reprodutibilidade
		md 1	md 2	md 3	md 1
<i>M. tuberculosis</i>	1	94,7	94,7	94,5	94,8
	2	94,7	94,5	94,5	94,8
	3	94,5	94,5	95,3	95,0
	4	94,7	94,7	95,0	95,0
	5	94,7	94,7	94,5	94,8
	6	94,5	94,5	94,3	94,8
	7	94,8	94,5	95,5	94,8
<i>M. bovis</i>	1	---	---	---	---
	2	---	---	---	---
	3	---	---	---	---

Robustez

Na Tabela 10 e Figura 6 são mostradas as variações na temperatura de

desnaturação e no Ct quando foram utilizadas as variações na pipetagem de reagentes e na temperatura de anelamento.

Tabela 9 Variação da temperatura do pico de *melting* apresentados nos testes de robustez para qPCR-Mtub-115.

Espécie	Amostras	Robustez 1		Robustez 2	
		Ct	<i>Melting</i>	Ct	<i>Melting</i>
<i>M. tuberculosis</i>	1	12,95	94,4	19,44	94,1
	2	18,31	94,4	29,44	94,5
	3	16,30	94,5	26,73	94,4
	4	17,37	93,56	24,88	93,63
	5	19,36	94,43	31,76	93,6
<i>M. bovis</i>	1	---	---	---	---
	2	---	---	---	---
	3	---	---	---	---
	4	---	---	---	---
	5	---	---	---	---

Robustez 1: aumento em 1°C a temperatura de anelamento, 10% a menos da enzima GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, EUA), de MgCl₂ e dos iniciadores; Robustez 2: diminuição em 1°C a temperatura de anelamento, 10% a mais da enzima GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, EUA), de MgCl₂ e dos iniciadores.

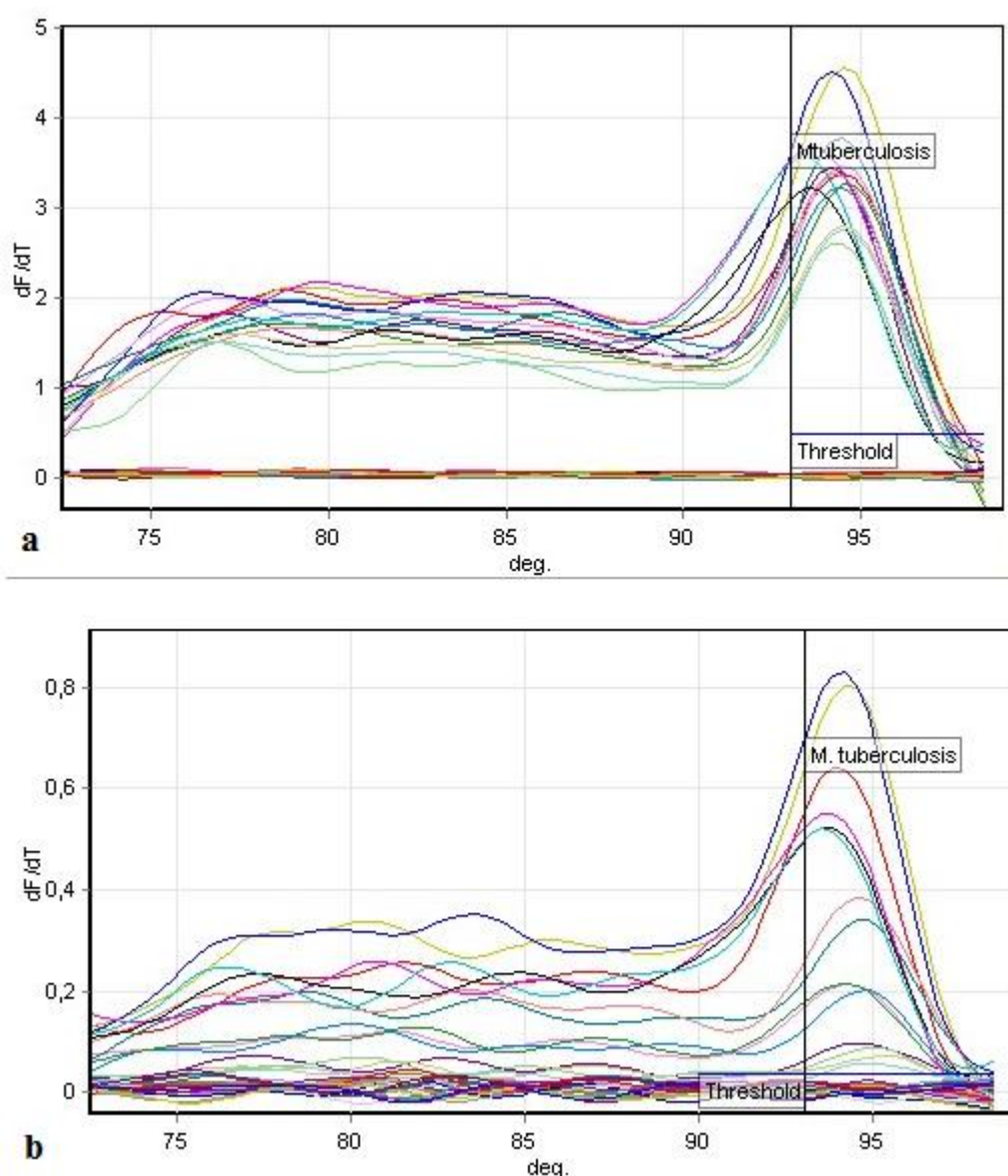


Figura 6 Derivada da curva de desnaturação (dF/dT versus Temperatura) das amostras positivas e negativas utilizadas na Robustez 1 (a) e Robustez 2 (b) para a qPCR-Mtub-115.

Análises estatísticas

O teste McNemar não mostrou diferença significativa entre a qPCR-Mub-115 ($p=0,3173$) e isolamento microbiológico e o teste e Kappa mostrou concordância perfeita (0,9867) entre os dois testes.

A curva, construída com a amostra padrão diluída, mostrou uma eficiência de 78% com coeficiente de reprodutibilidade R^2 de 0,99.

Discussão

A qPCR-Mtub-115 não amplificou quaisquer das amostras MOTT utilizadas nos testes de especificidade analítica, obtendo resultados positivos para as estirpes utilizadas como controles positivos. Os testes de especificidade analítica não contaram com três espécies do MTC: *M. Canettii*, *M. africanum 1*, *M. africanum 2*. Análises *in silico* realizadas nas etapas finais desse trabalho constataram, no entanto, que a qPCR-Mtub-115 podem gerar produtos amplificados específicos para essas bactérias. O problema foi detectado apenas posteriormente devido às atualizações recentes do genoma completo dessas bactérias em 2011 (HE572590.1 *Mycobacterium canettii* CIPT 140010059, FR878060.1 *Mycobacterium africanum* GM041182). Esses resultados não invalidam, no entanto, a utilização desta qPCR fora da África. Uma vez que, apesar de *M. canettii* e *M. africanum* serem também causadoras de tuberculose humana, estão restritas à África ou a casos intimamente relacionados com esse continente (Kremer et al., 1999, Frothingham *et al.*, 1999). Mb-100 (capítulo 3) não gera resultados positivos para *M. tuberculosis*, portanto as duas qPCR em conjunto poderiam ainda ser utilizadas em conjunto mesmo em casos epidemiologicamente relacionados com o continente africano.

A eficiência para qPCR-Mt-115 foi de 78% indicando a presença de inibidores na reação, provavelmente em decorrência da formação de dímeros de iniciadores ou formação de estruturas secundárias no amplicon. De fato, os oligonucleotídeos Mt-115 apresentam diversas repetições de nucleotídeos o que aumenta a possibilidade de reações inespecíficas. A região amplificada é rica em guaninas e citosinas (G+C = 64%), o que pode dificultar a dissociação dos amplicons e dificultar a formação de novos amplicons devido à formação de estruturas secundárias (Raso et

al., 2011). Dessa forma esta qPCR não é recomendada para quantificação de amostras, no entanto, mostrou-se eficiente para o diagnóstico do *M. tuberculosis*.

O LD da qPCR foi calculado com diluições sucessivas do DNA bacteriano puro. Devido ao fato de os bacilos possuírem estrutura genômica estável e sem plasmídeos, foi possível utilizar a quantidade de DNA para calcular o número de cópias detectado. O LD foi de $9,88 \times 10^3$ cópias de DNA/ μL . Os valores foram maiores do que outros testes utilizados para a identificação de *M. tuberculosis* descritos por Drosten et al. (2003) e Kumar et al. (2009), que utilizaram outras tecnologias como o FRET e Molecular Beacons, respectivamente. Foi mostrado neste trabalho de amostras com concentrações de DNA acima de 50 ng/ μL inibem a qPCR-Mtub-115. É possível que as qPCRs amplifiquem quantidades menores de DNA, pois o LD determinado nesse trabalho, ao contrário dos outros, foi realizado para se verificar a quantidade mínima do ácido nucléico detectado em 100% das amplificações. Quantidades menores podem gerar resultados falsos negativos, diminuindo a credibilidade da técnica. Caso seja necessário usar massa inferior ao LD, é aconselhável a utilização da amostra em triplicata considerar qualquer amplificação com pico de desnaturação específico como positiva.

Os processos de repetitividade e reprodutibilidade de uma técnica precisam ser comprovados para garantir o uso da mesma no diagnóstico e identificação de microrganismos, além de serem exigência das normas de acreditação de laboratórios (Freitas *et al.*, 2006). Os resultados encontrados nessa fase de validação da qPCR-Mtub-115 foram essenciais para se provar que os resultados podem ser reproduzidos mesmo com variações de acordo com o dia ou o analista.

Os testes de robustez mostraram é essencial à utilização de equipamentos como micropipetas e termocicladores, calibrados no laboratório. Comparando os resultados e os gráficos da robustez 1 e 2 foi possível observar uma diminuição na sensibilidade e uma pior qualidade na formação da curva de melting na robustez 2. A robustez 1 mostrou um bom desempenho, no entanto, não é aconselhado diminuir a temperatura de anelamento pois pode gerar ligações inespecíficas com o *M. bovis*.

Conclusão

A PCR Mtuberculosis-115 é uma alternativa para o diagnóstico de *M. tuberculosis*, em colônias bacterianas, em substituição as testes bioquímicos. Devido à baixa eficiência como PCR quantitativa, esta PCR não deve ser utilizada na quantificação de amostras.

Referencia

ABRAHÃO, R.M.C.M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. *Arch. Vet. Sci.* v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Vigilância epidemiológica de doenças e agravos específicos: tuberculose*. Rio de Janeiro, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica* / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde Departamento de Atenção Básica. . 6. ed. rev. e ampl. . Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

CAMPOS, R.; PIANTA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. *Bol. da Saúde*, v. 15, n. 1, p. 61-71, 2001.

CARVALHO, L.G.M., BUANI, A.Z., ZOLLNER, M.S.A.C. et. al.; Co-infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e vírus da imunodeficiência humana: uma análise epidemiológica em Taubaté – SP; *Jornal Bras. de Pneumologia*; v. 32; n. 5; p. 424-429; 2006.

COLE, S.T., BROSCH, R., PARKHILL, J. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. v. 393, n. 6685, p. 537-44, 1998. Erratum in: *Nature* v. 396, n. 6707, p.190, 1998.

COSTA, D.C. Consideracoes sobre a tendencia da tuberculose no Brasil. *Cad. Saude Publica*, v. 1, n. 3, p. 313-326, 1985.

DANIEL, T.M., BATES, J.H., DOWNES, K.A. History of tuberculosis, in "Tuberculosis: Pathogenesis, Prevention and Control" (B. R. Bloom, Ed.), *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, DC. 1994.

DROSTEN, C.; PANNING, M.; KRAMME, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR using pan-mycobacterial primers and a pair of fluorescence resonance energy transfer probes specific for the *M. tuberculosis* complex. *Clin Chem*. v. 49, n. 10, p. 1659-61, 2003.

- FROTHINGHAM, R., STRICKLAND, P. L., BRETZEL, G. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from West Africa. *J. Clin. Microbiol.* v. 37, p. 1921–1926, 1999.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HUARD, R.C., LAZZARINI, L.C., BUTLER, W.R. et al. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol.*, v. 41, n. 4, p. 1637-50, 2003.
- JOB, J.R.P.P., PRADO, P.E.B.S., VRANJAC, S. et al. Comparação de dados epidemiológicos da tuberculose pulmonar em Sorocaba, SP, Brasil, em uma década (1986-1996). *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 596-597, 1998.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., LANDA, W.M. et al. *Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p.
- KRAEMER, H.C. *Evaluating Medical Tests*. Newbury Park, CA:Sage. 1992.
- KREMER, K, VAN SOOLINGEN, D., FROTHINGHAM, R. et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.*v.37, p.2607-18, 1999.
- KUMAR, P., NATH, K., RATH, B. et al. Visual format for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* in clinical samples using molecular beacons. *J Mol Diagn.* v. 11, n. 5, p. 430-8, 2009.
- NARAYANAN, S. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* v. 120, p. 233-247, 2004.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento*. ed. 33, jun-dez 2004.
- RASO, A.; MASCELLI, S.; NOZZA, P.; UGOLOTTI, E.; VANNI, I.; CAPRA, V.; BIASSONI, R. Troubleshooting fine-tuning procedures for qPCR system design. *J Clin Lab Anal.* v. 25, n. 6, p. 389-94, 2011.
- ROTHSCHILD, B. M.; MARTIN, L. D.; LEV, G.; BERCOVIER, H.; BAR-GAL, G. K.; GREENBLATT, C.; DONOGHUE, H.; SPIGELMAN, M.; BRITAIN, D. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Infect Dis.* v. 33, n. 3, p. 305-11, 2001.
- RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. *Arquivo do Instituto de Biologia*, v.74, n. 1, p. 55-65, 2007.
- STAROSCIK, A. *Calculator for determining the number of copies of a template*. Available online: <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>, 2004 (accessed on December 2011).
- TELENTI, A., MARCHESI, F., BALZ, M. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.*, v. 31, n. 2, p. 175-8, 1993.
- UNTERGASSER, A., NIJVEEN, H., RAO, X. et al. Primer3Plus, an enhanced web

interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, p. W71–W74, 2007.

VAN SOOLINGEN, D.,
HOOGENBOEZEM, T., DE HAAS, P.E. et
al. A novel pathogenic taxon of the
Mycobacterium tuberculosis complex,
Canetti: characterization of an exceptional
isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.* v.
47, n. 4, p.1236-45, 1997.