

USO DA PCR PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROBACTÉRIAS A PARTIR DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE BOVINOS

(PCR use for detection and identification of mycobacterias from bovine clinical samples)

FUVERKI, R. B. N.¹; MURAKAMI, P. S.²; BIONDO, A. W.³; BARROS FILHO, I. R.³

¹ Aluna do curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná

² Médica Veterinária, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Paraná

³ Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná

RESUMO – A infecção de bovinos por micobactérias, causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis*, tem grande importância devido às enormes perdas econômicas e os riscos à saúde pública relacionados ao seu elevado potencial zoonótico. O objetivo deste trabalho foi testar um protocolo de detecção molecular das subespécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) a partir de cultura bacteriana. Amostras de órgãos de cinco bovinos suspeitos para a infecção foram submetidas ao cultivo bacteriano e à PCR para a pesquisa de *Mycobacterium sp.* O DNA bacteriano foi extraído das colônias formadas para a realização de PCR com sete pares de primers: 16S rRNA, Rv0577, IS1561, Rv1510, Rv1970, Rv3877/8 e Rv3120. A reação foi positiva para todos os animais e os resultados mostraram que o perfil da PCR foi adequado para identificar *M. bovis*, estabelecendo especificidade de detecção, enquanto a cultura determina apenas o gênero *Mycobacterium*. Esse diagnóstico mais específico, sensível e rápido oferece vantagens para o controle e erradicação da tuberculose bovina no Brasil, em particular no diagnóstico *post-mortem* da doença, e contribui com a avaliação de suas implicações na saúde do homem, pelo consumo de alimentos contaminados e por ser um perigo ocupacional em frigoríficos e fazendas.

Palavras-chave: PCR; micobactéria; tuberculose; bovino.

ABSTRACT – Mycobacterial infections in bovines, mainly caused by *Mycobacterium bovis*, have great importance because of economic losses and public health risks related to its elevated zoonotic potential. The objective of this work was to test a molecular protocol for detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MtbC) subspecies from bacterial culture. Organ samples from five bovines with suspicion of infection were submitted to bacterial culture and PCR

for *Mycobacterium sp.* Bacterial DNA was extracted from growing colonies to carry out PCR with seven primer pairs: 16S rRNA, Rv0577, IS1561, Rv1510, Rv1970, Rv3877/8 and Rv3120. Reactions were positive to all tested animals and results showed that the PCR pattern was adequate to identify *M. bovis*, establishing detection specificity while culture only identifies the genre *Mycobacterium*. This more specific, sensitive and rapid diagnosis offers advantages on bovine tuberculosis eradication and control in Brazil, particularly on *post-mortem* disease diagnosis, and contributes to the evaluation of its implications on public health by consumption of contaminated food and as an occupational risk in slaughterhouses and farms.

Key words: PCR; micobacterium; tuberculosis; bovine.

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium bovis*, uma micobactéria da família Mycobacteriaceae que, juntamente com *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii* e *M. microti*, forma o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (HUARD *et al.*, 2003). O *M. bovis* apresenta ocorrência mundial (NEILL *et al.*, 1994) e dados oficiais indicam uma prevalência média deste patógeno em 1,3% dos rebanhos do território brasileiro (BRASIL, 2006), representando a infecção de mais de 2 milhões de bovinos no país.

A enfermidade nos bovinos apresenta caráter crônico e é caracterizada por lesões granulomatosas localizadas predominantemente no trato respiratório e linfonodos associados (NEILL *et al.*, 1994), caracterizadas por infiltrados de células mononucleares, como macrófagos e linfócitos (POLLOCK *et al.*, 2001). Dentre as principais conseqüências da infec-

ção, estão a morte de animais, diminuição da eficiência produtiva, eliminação de animais de alto valor zootécnico e condenação de carcaças ao abate, além da perda de credibilidade da propriedade onde ocorreu a infecção, o que acarreta enormes perdas econômicas à produção (BRASIL, 2006).

Além dos prejuízos gerados na produção animal, a tuberculose bovina é uma relevante zoonose cuja transmissão aos humanos pode ocorrer por meio da inalação de partículas infecciosas ou pela ingestão de leite não fervido ou não pasteurizado (THOEN *et al.*, 2006). O *M. bovis* é classificado como um patógeno de risco 3 para a saúde pública (OIE, 2005) e estima-se que, dentre 100 mil casos de tuberculose em seres humanos descritos anualmente no Brasil, 4 mil estão relacionados à infecção por este microorganismo (LEITE *et al.*, 2003).

O diagnóstico *post-mortem* da tuberculose causada por *M. bovis* baseia-se geralmente em exames histológicos e bacteriológicos realizados a partir de amostras teciduais. No entanto, a detecção microscópica de bacilos álcool-ácido resistentes pode falhar em sensibilidade e só funciona em tecidos com concentrações de 10.000 bactérias/mL ou superiores. Ainda, estes testes determinam apenas o gênero *Mycobacterium*. A identificação definitiva da espécie de micobactéria cultivada só é possível por meio de testes bioquímicos e de sensibilidade à drogas (WARDS *et al.*, 1995), os quais demandam um longo tempo e podem apresentar inespecificidade.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido descrita como um método eficiente na determinação da espécie de micobactéria. Pesquisadores têm relatado o uso desta técnica para a detecção de seqüências específicas de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, (COUSINS *et al.*, 1991; ROMERO *et al.*, 1999; ZANINI *et al.*, 2001) apresentando boa sensibilidade de determinação a partir de culturas bacterianas. HUARD *et al.* (2003) desenvolveram um teste de PCR capaz de diferenciar os membros do CMT com base em deleções genômicas, utilizando *primers* específicos para estas regiões, o que permite a identificação rápida, simples e eficaz da espécie de micobactéria envolvida na infecção.

O objetivo deste trabalho foi testar, aperfeiçoar e padronizar um protocolo de PCR para a diferenciação das espécies de micobactérias do CMT a partir colônias isoladas de cultivos bacterianos, estabelecendo um método rápido e preciso para a classificação e identificação destes microorganismos.

Material e Métodos

Amostras de órgãos de cinco bovinos que apresentaram suspeita clínica de tuberculose foram avaliadas para a presença de lesões granulomatosas

características da infecção. Fragmentos de órgãos contendo nódulos caseosos, como pulmão e linfonodos, foram utilizados para o cultivo bacteriano. As amostras foram homogeneizadas e descontaminadas com solução de NaOH 4%, com posterior neutralização com solução de HCl 1,0 N. Após esse procedimento, os sedimentos gerados foram submetidos à cultura em tubos contendo meio Lowestein-Jensen, a 37°C em estufa bacteriológica.

O crescimento bacteriano foi acompanhado semanalmente por até 60 dias para a presença de colônias características de micobactérias, de aspecto rugoso e coloração creme-amarelada. Quando presentes, o DNA bacteriano foi extraído utilizando-se o método de choque térmico, o qual consistiu em três ciclos de 30 minutos a 94°C e 30 minutos a -20°C para inativação do agente e liberação do material genético.

As reações de amplificação pela PCR foram preparadas com 5 µL de DNA extraído, 5 µL de tampão 10X Taq DNA polimerase, MgCl₂ a 1,5 mM, 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 pmoles de cada *primer*, 0,25 U de enzima Taq polimerase e água ultra pura em quantidade suficiente para completar um volume final de 50 µL.

O protocolo de amplificação baseou-se no método descrito por HUARD *et al.* (2003), que permite a tipificação específica das espécies do CMT pelo uso de sete conjuntos de primers que amplificam as regiões 16S rRNA, Rv0577, IS1561, Rv1510, Rv1970, Rv3877/8 e Rv3120, produzindo fragmentos de DNA de 543, 786, 943, 1033, 1116, 999 e 404 pares de base, respectivamente. O programa de amplificação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, com ciclo final de extensão por 10 minutos a 72°C. Os produtos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 mg/mL), com posterior visualização das bandas em transiluminador de luz ultravioleta. Um marcador de peso molecular de 100 pb foi utilizado como parâmetro de determinação do tamanho das bandas geradas.

Resultados e Discussão

A cultura em meio Lowestein – Jensen apresentou crescimento bacteriano em todas as amostras, produzindo colônias características do gênero *Mycobacterium*. A PCR realizada a partir de material genético extraído das colônias também foi positiva para os cinco animais, com amplificação dos fragmentos relativos às regiões 16S rRNA, Rv0577, IS1561 e Rv3877/8. De acordo com os painéis de tipificação molecular de micobactérias determinados

por HUARD *et al.* (2003), o padrão de amplificação verificado produziu um perfil eletroforético compatível com a identificação de *Mycobacterium bovis* como a espécie infectante, verificando-se ainda que outros microorganismos do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* não foram detectados nas amostras estudadas. Assim, enquanto a cultura foi capaz de determinar apenas o gênero *Mycobacterium*, a PCR permitiu estabelecer especificidade de detecção para *M. bovis*, possibilitando estabelecer um perfil epidemiológico da doença entre os indivíduos afetados. Esse resultado está de acordo com os estudos de TIWARI *et al.* (2007) que demonstraram limitações quanto à especificação do patógeno utilizando apenas o cultivo bacteriano.

A PCR realizada mostrou-se eficaz na determinação da espécie de micobactéria a partir de cepas isoladas de cultivo bacteriano. Em estudo semelhante, utilizando amostras de órgãos de bovinos provenientes do estado de São Paulo, NASSAR *et al.* (2007) obtiveram sucesso na identificação de micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* utilizando uma PCR-multiplex com os *primers* JB e *primers* específicos para o gene que codifica para a pirazinimidase (*pncA*), o qual permite a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*. O grupo obteve 100% de detecção de *M. bovis* utilizando a PCR a partir das colônias isoladas do meio de cultivo.

MURAKAMI *et al.* (2007a; 2007b), utilizando o mesmo protocolo de PCR descrito neste trabalho, obtiveram sucesso na detecção de micobactérias em quatis (*Nasua nasua*) e antas (*Tapirus terrestris*), determinando a presença de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, respectivamente, a partir de colônias isoladas em meio de cultivo. Este resultado demonstra a viabilidade de aplicação da técnica para o controle da enfermidade também em animais selvagens, visto sua importância no risco de manutenção do patógeno em rebanhos e possível transmissão ao homem.

O uso da PCR também é possível para a detecção direta em órgãos com lesões suspeitas de tuberculose demonstrando a versatilidade da técnica, bem como sua eficiência em detectar o microorganismo mesmo em amostras que se apresentam negativas em cultivo bacteriano. TAYLOR *et al.* (2007) realizaram um estudo de comparação da eficiência de detecção de micobactérias entre a PCR direta em amostras de órgãos e a cultura bacteriana para micobactérias. A PCR foi capaz de detectar o microorganismo em 7 de 9 amostras negativas para o cultivo bacteriano, demonstrando a sensibilidade do método, e mostrou-se ainda mais sensível que a histologia, além de o resultado ser disponibilizado em menor prazo em comparação com as técnicas rotineiramente utilizadas.

A crescente disponibilidade de seqüenciamentos de genomas bacterianos tem proporcionado um melhor levantamento de dados e avanços sem precedentes no diagnóstico, genotipagem e determinação da virulência de patógenos, revolucionando os campos da bacteriologia e doenças infecciosas (FOURNIER *et al.* 2007). Essas vantagens oferecidas pelo uso de métodos moleculares, como a PCR, proporcionam a melhor interpretação e determinação da epidemiologia de doenças como a tuberculose bovina, contribuindo com a maior acurácia no estabelecimento de dados sobre a enfermidade no país.

A tuberculose bovina ainda representa um importante problema econômico para a agricultura e indústria em muitos países (POLLOCK e NEILL, 2002). A transmissão da doença entre bovinos ocorre principalmente pela excreção respiratória e inalação de *M. bovis*, e sugere-se que a infecção com este microorganismo pode ocorrer mesmo por um único bacilo que alcance a superfície alveolar nos pulmões (MENZIES e NEILL, 2000). Essas informações demonstram a importância da identificação de animais infectados para o controle e erradicação da doença, a qual deve basear-se em um método confiável para a determinação de atitudes precisas frente a rebanhos positivos para a doença.

O projeto teve como base fundamental a importância de se estabelecer um método diagnóstico eficaz, sensível e específico para a tuberculose em bovinos, por ser esta uma doença que tem causado grande impacto na saúde animal e pública do país. O caráter zoonótico da enfermidade oferece enormes riscos principalmente a pacientes imunocomprometidos, seja por quimioterapia, transplantes de órgãos, ou portadores do vírus da AIDS (THOEN *et al.*, 2006). EVANS *et al.* (2007) relataram a transmissão entre seres humanos da tuberculose causada por *M. bovis*, o que representa um agravo à disseminação do patógeno e ao risco zoonótico. Existe ainda o risco ocupacional da doença, comprometendo a saúde de trabalhadores que têm grande chance de contato com o microorganismo (DE LA RUA-DOMENECH, 2006), como funcionários de frigoríficos e propriedades rurais. A possibilidade de transmissão do agente através de produtos alimentícios derivados de bovinos (ETTER *et al.*, 2006) também é outro fator de risco que colabora com a crescente necessidade de se desenvolver uma metodologia segura e eficiente na detecção de *Mycobacterium* spp. a partir de amostras clínicas de bovinos.

CONCLUSÕES

O diagnóstico por meio da pcr, sensível e rápido de *Mycobacterium* spp; pode ser utilizado para

ações pontuais da defesa sanitária animal com o intuito de controlar e erradicar a doença no país, em particular no rastreamento de produtos derivados de bovinos e no diagnóstico *post-mortem* da doença. Ainda, a determinação da espécie de micobactéria contribuiu com o estabelecimento da epidemiologia molecular da doença no país, colaborando assim com a efetividade do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Os resultados demonstraram que a PCR é um método adequado para identificar amostras de *M. bovis* a partir de colônias isoladas em meio de cultivo diagnóstico no Brasil, e a sua implantação em centros de diagnóstico é de grande valia, servindo como eficaz ferramenta de identificação de focos da infecção em rebanhos nacionais. Em conclusão, o uso da PCR torna possível o diagnóstico definitivo em amostras *post-mortem* e em produtos de origem animal, possibilitando atitudes sanitárias em menor prazo frente aos bovinos infectados e à população humana sob risco de infecção.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária-Departamento de Saúde Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (Pncebt). Brasília: MAPA/SDA/DIA, 2006, 188p.
- COUSINS, D.V.; WILTON, S.D.; FRANCIS, B. R. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 27, p. 187-195, 1991.
- DE LARUA-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, n. 2, p. 77-109, 2006.
- ETTER, E.; DONADO, P.; JORI, F.; CARON, A.; GOUTARD, F.; ROGER, F. Risk analysis and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, p. 61-73, 2006.
- EVANS, J. T.; SMITH, E. G.; BANERJEE, A.; SMITH, R. M. M.; DALE, J.; INNES, J. A.; HUNT, D.; TWEDDELL, A.; WOOD, A.; ANDERSON, C.; HEWINSON, R. G.; SMITH, N.H.; HAWKEY, P. M.; SONNENBERG, P. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. **The Lancet**, v. 369, n. 956, p. 1270-1276, 2007.
- FOURNIER, P. E.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n.11, p.711-723, 2007.
- HUARD, R. C.; LAZZARINI, L. C. O.; BUTLER, W. R.; VAN SOOLINGEN, D.; HO, J. L. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p.1637-1650, 2003.
- LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and Milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.
- MENZIES, F. D.; NEILL, S. D. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. **The Veterinary Journal**, v. 160, p. 92-106, 2000.
- MURAKAMI, P. M.; BROCKELT, S. R.; BIESDORF, S. M.; NAKATANI, S. M.; RIEDIGER, I. N.; FUVERKI, R. B. N.; BIAVA, J.; VILANI, R. G. O. C.; BARROS FILHO, I. R.; BIONDO, A. W. Diagnóstico molecular de *Mycobacterium sp.* em quatis (*Nasua nasua*) do Centro de Triagem de Animais Silvestres de Tijuca do Sul, PR. In: **Anais** do II Congresso de Saúde Pública, Fortaleza, Brasil, 2007a.
- MURAKAMI, P. M.; JAVOROUSKY, M. L.; BONAT, M.; LACERDA, O.; BROCKELT, S. R.; BIESDORF, S. M.; NAKATANI, S. M.; RIEDIGER, I. N.; FUVERKI, R. B. N.; BIAVA, J.; VILANI, R. G. O. C.; BARROS FILHO, I. R.; CAVAZZANI, L. F.; BIONDO, A. W. Molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in tapirs (*Tapirus terrestris*) from the Curitiba Zoo, Paraná. In: **Anais** do Congresso "Todos pela Conservação", São Paulo, Brasil, n. 365, p. 68, 2007b.

NASSAR, A. F.; MIYASHIRO, S.; OLIVEIRA, C. G.; PACHECO, W. A.; OGATA, R. A. Isolation and identification of bovine tuberculosis in a Brazilian herd (São Paulo). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 639-642, 2007.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 41-52, 1994.

OIE – Organização Internacional de Epizootias, 2005. **Bovine tuberculosis**. Disponível em: < http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf >. Acesso em: 07nov2007.

POLLOCK, J.M.; NEILL, S.D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, v. 163, p. 115-127, 2002.

POLLOCK, J. M.; MCNAIR, J.; WELSH, M. D.; GIRVIN, R. M.; KENNEDY, H. E.; MACKIE, D. P.; NEILL, S. D. Immune responses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, p. 103-107, 2001.

ROMERO, R. E.; GARZON, D. L.; MEJIA, G. A.; MONROY, W.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 101-106, 1999.

TAYLOR, G. M.; WORTH, D. R.; PALMER, S.; JAHANS, K.; HEWINSON, R. G. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**, v. 3, p. 3-12, 2007.

TIWARI, R. P.; HATTIKUDUR, N. S.; BHARMAL, R. N.; KARTIKEYAN, S.; DESHMUKH, N. M.; BISEN, P. S. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead. **Tuberculosis**, v. 87, n. 3, p. 193 - 201, 2007.

THOEN, C.; LOBUE, P.; DE KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 339-345, 2006.

WARDS, B. J.; COLLINS, D. M.; de LISLE, G. W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 227-240, 1995.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T. P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIORAVANTE, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis* polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by apolygotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 809-813, 2001.

Recebido para publicação: 12/12/2007
 Aprovado: 05/05/2008