

## FERRAMENTA MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium bovis* ISOLADO A PARTIR DE TECIDO DE BOVINOS

FURLANETTO, L.V.<sup>1\*</sup>; CARVALHO, R.C.T.<sup>1</sup>; FIGUEIREDO, E.E.S.<sup>2</sup>;  
SILVESTRE F.G.<sup>2</sup> LILENBAUM, W.<sup>3</sup>; FONSECA, L.S.<sup>4</sup>; SILVA J.T.<sup>4</sup>;  
PASCHOALIN, V.M.F.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduandos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC; <sup>2</sup> Universidade de Cuiabá - UNIC, <sup>3</sup>Universidade Federal Fluminense - UFF, <sup>4</sup>Universidade Federal Rio de Janeiro - UFRJ

### Resumo

*Mycobacterium bovis* é o agente causador de uma importante zoonose, a tuberculose bovina, como sua identificação por microbiologia convencional é trabalhosa e demorada, objetivamos identificar por métodos moleculares os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) isolados a partir de tecido de bovinos coletados durante necrópsia. Um rebanho bovino leiteiro de 50 animais da cidade de Macaé (RJ) com histórico clínico de TB foi testado por tuberculinização intradérmica, dos quais 34 animais foram considerados reativos e então abatidos. Durante a necropsia, 91 amostras de apresentando lesões foram coletadas. As amostras foram descontaminadas por Petroff, inoculadas em meio Lowenstein-Jensen com piruvato de sódio e incubadas por 90 dias a 37°C. Após crescimento, os bacilos álcool ácido resistente (BAAR) foram submetidos a m-PCR. Dois pares de oligonucleotídeos foram usados para amplificação simultânea de duas regiões internas das seqüências IS6110 (245 pb) e RvD1Rv2031c (500 pb). Das 91 amostras coletadas e processadas juntas por animal, 17 colônias foram isoladas e as duas regiões alvo foram amplificadas em 15 (88,24%). As duas amostras negativas (11,76%) foram confirmadas como micobactérias não-tuberculosas por PCR-RFLP. Concluímos que a m-PCR desenvolvida no presente estudo demonstrou-se uma técnica rápida e reprodutível, podendo ser uma valiosa ferramenta para a identificação dos BAAR isolados de lesões sugestivas de TB.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*, PCR - múltipla, tuberculose bovina

### Introdução

O *Mycobacterium bovis* é o agente causador da tuberculose bovina. Esta enfermidade é uma zoonose (doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem) de evolução crônica e efeito

debilitante, cujo hospedeiro primário é o bovino. Entretanto, diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem, são também susceptíveis ao bacilo bovino principalmente por via aerógena, consumo de leite e derivados não pasteurizados e ingestão de carnes contaminadas (BRASIL, 2004)

As espécies do gênero *Mycobacterium* são divididas em dois grandes grupos: as micobactérias que fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) e as micobactérias não-tuberculose (MNT). O complexo *M. tuberculosis* é composto pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, Bacille Calmette-Guérin (BCG), *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. A diferenciação dos membros deste complexo depende de características fenotípicas, mas por causa da alta homologia do genoma, a identificação precisa de certos membros do complexo se torna trabalhosa e difícil (EISENACH, 1990).

Devido as necessidades de se investir em novos métodos de diagnóstico para auxiliar no combate a tuberculose bovina, o objetivo deste estudo foi identificar por métodos moleculares as culturas puras de isolados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) provenientes de tecidos de bovinos coletados durante a necropsia. Foi utilizada uma PCR múltipla onde dois conjuntos de oligonucleotídeos permitiram detectar simultaneamente as seqüências IS6110 (HERMANS, 1990) e RvD1Rv2031c (RODRIGUEZ, 1999) visando à identificação rápida e específica das bactérias pertencentes ao CMT, além de distinguir o *M. bovis* dos outros membros desse complexo.

## Metodologia

Um rebanho leiteiro de 50 animais (Macaé – RJ), com prévio histórico de tuberculose, incluindo casos clínicos foi testado por tuberculinização intradérmica de acordo com os padrões oficiais nacionais (BRASIL, 2004). Entre os 50 animais adultos, trinta e quatro (34) animais foram considerados reativos e em seguida abatidos. Durante a necropsia, noventa e uma (91) amostras de tecidos dos 34 animais foram coletadas e enviadas sob refrigeração ao laboratório.

Os tecidos de cada animal foram processados juntos, sendo descontaminados pelo método de Petroff, inoculados em meio Lowenstein-Jensen com piruvato de sódio e incubadas por 90 dias a 37°C. As colônias isoladas foram submetidas a coloração de ZIEHL-NEELSEN para a seleção dos Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR). O DNA genômico dos BAAR foi extraído através de uma lise enzimática (lisozima e proteinase K) e precipitação com isopropanol (MEICKLE, 2007) e utilizado como molde na reação de m-PCR realizada com volume final de 50 µL (20 mM Tris, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTP, 20 pmoles de primers e 1,25 U Taq polimerase ) As condições de amplificação foram 94°C por 5 min , 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), 68°C por 1 min (anelamento), 72°C por 1 min (extensão), e mais um ciclo de 72°C por 10 min para extensão final do fragmento. Os produtos

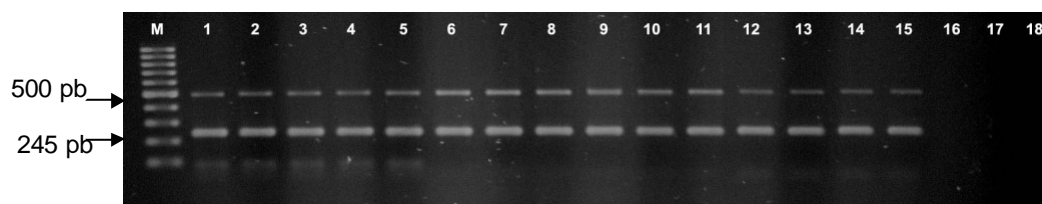
amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio (10µg/mL) e visualizados em transluminador de U.V (302nm).

A m-PCR foi capaz de realizar uma co-amplificação de diferentes segmentos de DNA em uma única reação de PCR usando dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação simultânea de duas regiões internas a seqüência IS6110 (245 pb) INS1: (5' CGTGAGGGGCATCGAGGTGGC-3') e INS2: (5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA – 3') (HERMANS, 1990) presente somente nos membros do CMT e RvD1Rv2031c (500 pb) Jb21: (5'-TCGTCCGCTGATGCAAGTGC – 3') e Jb22: (5'-CGTGAACGTAGTCGCCTGC -3') (RODRIGUEZ, 1999) presente somente em *M. bovis*.

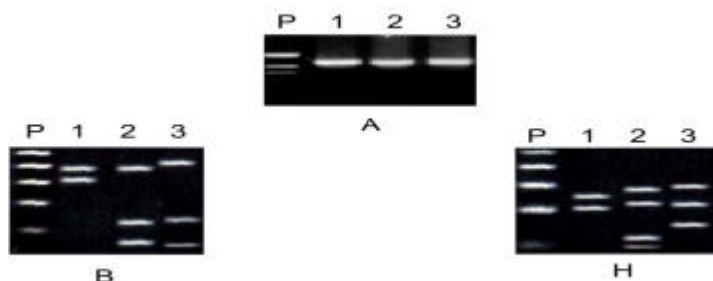
Os BAAR não-amplificados pela m-PCR foram identificados por PRA técnica baseada em amplificação de um determinado fragmento de DNA, seguida de digestão do fragmento amplificado com uma ou mais enzimas de restrição. As espécies podem ser discriminadas pela existência de polimorfismos gerados por substituições em sítios de restrição. Foi usado como alvo o segmento de 441 pb do gene *Hsp65* presente em todas as micobactérias. A amplificação foi realizada com os oligonucleotídeos Tb11: ACCAACG ATGGTGTGTCCAT e Tb12: CTTGTCTGAACCGCATACCCT seguida de digestão com as enzimas de restrição *BstE* II e *Hae*III nas mesmas condições estabelecidas por TELENTI (1993).

## Resultados & Discussão

Colônias de micobactérias foram isoladas de 17 (50%) das 34 amostras processadas juntas. A m-PCR amplificou as duas regiões alvo em 15 (88,24%) dos 17 BAAR isolados (Figura 1). Os BAAR das linhas 16 e 17 negativos na m-PCR (11,76%) foram identificados como *M. avium* e *M. fortuitum* (MNT) respectivamente pela PRA (Figura 2).



**Figura 1. Identificação de BAAR por m-PCR.** O DNA extraído de 17 BAAR foi usado como molde na m-PCR para a amplificação das seqüências RvD1Rv2031c e a IS6110. Os produtos da m-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo (10 µg/mL). Linha M: Padrão de peso molecular 100 pb (Fermentas®); linhas 1-17 produto da m-PCR dos BAAR isolados de lesões sugestivas de TB; linha 18 controle negativo. As setas indicam a posição dos fragmentos de 500 pb (diagnóstico para *M. bovis*) e 245 pb (diagnóstico para membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*).



**Figura 2: Identificação BAAR por PRA:** PAINEL A - DNA obtido de 3 diferentes BAAR por lise enzimática foi amplificado com os oligonucleotídeos TB11 e TB12, e os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. linha P: padrão de tamanho de fragmento 100 pb (PROMEGA); linha 1, BAAR (amostra 16) ; linha 2, BAAR (amostra 17); linha 3, *M. bovis* IP (controle positivo). PAINEL B - Análise dos fragmentos de digestão enzimática por eletroforese em gel de agarose 4% dos amplicados obtidos no painel A: linha P: padrão de tamanho de fragmentos (50pb); linhas de 1 a 3 perfil de bandas após a digestão com a enzima BstEII para *M. avium* (235 pb, 210 pb), *M. fortuitum* (235 pb, 115 pb, 85 pb) e *M. bovis* (245pb, 125 pb, 80 pb) respectivamente. PAINEL C – O perfil de bandas obtidos após digestão com a enzima HaeIII para *M. avium* (130 pb, 105 pb), *M. fortuitum* (145 pb, 120 pb, 60 pb, 55 pb), *M. bovis* (150pb, 140pb, 70pb).

A PCR baseada na amplificação da sequência RvD1Rv2031c usando os oligonucleotídeos JB21/JB22 é considerada altamente confiável na identificação de isolados de *M. bovis*, apresentando 100% de concordância com o método microbiológico convencional (RODRIGUEZ, 1999). Entretanto, a absoluta especificidade de JB21/JB22 foi contestada por estudos que relataram que 13,3% (4/30) de isolados de *M. bovis* falharam na amplificação do fragmento de 500pb. Usando oligonucleotídeos para a sequência IS6110, os isolados negativos para os 500pb foram identificados como pertencentes ao CMT, levando os autores a sugerir que esses isolados podem ter perdido o alvo genômico de JB21/22. Como essa característica genotípica pode não ser tão infreqüente, o uso de apenas um par de oligonucleotídeos pode produzir resultados falso-negativos (SECHI, 2000). Assim, um par adicional de oligonucleotídeos com alvo em outra sequência gênica, como na m-PCR apresentada, minimiza a ocorrência destes resultados falso-negativos.

Uma vez que foram obtidos resultados negativos no último teste de tuberculização realizado seis meses antes deste estudo, acreditamos que esses animais apresentaram uma recente infecção, onde lesões visíveis nem sempre estão presentes e a carga bacteriana é baixa. Considerando-se o método empregado na descontaminação, dos tecidos, é esperado que a obtenção de isolados das amostras seja prejudicada em algumas delas no entanto, é preciso esclarecer que a observar que a presença de algumas culturas positivas é suficiente para caracterizar o surto de tuberculose neste rebanho.

## Conclusão

A m-PCR demonstrou ser uma técnica rápida, reprodutível e altamente específica para ser usada na identificação de *M. bovis* entre os BAAR isolados de lesões sugestivas. A m-PCR aqui descrita pode ser uma alternativa diagnóstica aos trabalhosos e demorados métodos bioquímicos de identificação. Essa técnica pode ser considerada uma ferramenta valiosa durante estudos epidemiológicos principalmente em regiões consideradas de alto risco de transmissão, permitindo uma maior eficiência no diagnóstico da tuberculose bovina.

## Referências bibliográficas

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, *Instrução normativa SDA 6/2004*.

EISENACH, K.D.; CAVE, M.D.; BATES, J.H.; CRAWFORD, J.T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 161:977-81, 1990.

HERMANS, P. W.; VAN SOOLINGEN, D.; DALE, J. W.; SCHUITEMA, A. R.; MCADAM, R. A.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J. D. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 28(9): 2051-2058, 1990.

Meikle, V.; Schneider, M.; Azenzo, G.; Zumárraga, M.; Magnano, G.; Cataldi, A. Individual animals of a cattle herd infect with the same *Mycobacterium bovis* genotype shows important variations in bacteriological, histopathological and immune response parameters. *Zoonoses and Public Health* 54: 86-93, 2007.

Rodríguez, J.G.; Fissanoti, J.C.; Del Portillo, P.; Patarroyo, M.E.; Romano, M.I.; Cataldi, A. Amplification of a 500-basepair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37: 2330-2332, 1999.

Sechi L.A.; Dupre, I.; Leori, G.; Fadda, G.; Zanetti, S. Distribution of a specific 500-base-pair fragment in *Mycobacterium bovis* isolates from Sardinian cattle. *J Clin Microbiol* 38: 3837-3839, 2000.

Telenti, A.; Marchesi, F.; Balz, M.; Bally, F.; Bottger, E.C.; Bodmer, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31: 175-178, 1993.