

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

FERNANDA LUIZA ESPINOSA SPOSITTO

Reação em cadeia da polimerase – multiplex para diferenciação de
Mycobacterium tuberculosis e *Mycobacterium bovis* em secreção pulmonar

Maringá

2010

FERNANDA LUIZA ESPINOSA SPOSITTO

Reação em cadeia da polimerase – multiplex para diferenciação de
Mycobacterium tuberculosis e *Mycobacterium bovis* em secreção pulmonar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de
Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Biociências
Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosilene Fressatti Cardoso

Maringá
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S764r Sposito, Fernanda Luiza Espinosa
Reação em cadeia da polimerase - multiplex para
diferenciação de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium*
bovis em secreção pulmonar. / Fernanda Luiza Espinosa
Sposito. -- Maringá, 2010.
41 f. : il. figs.

Orientador : Prof^a. Dr^a. Rosilene Fressatti Cardoso.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas
à Farmácia, 2010.

1. *Mycobacterium tuberculosis* - Diagnóstico. 2.
Mycobacterium bovis - Diagnóstico. 3. PCR-Multiplex. 4.
Tuberculose - *Mycobacterium tuberculosis* x *Mycobacterium*
bovis. I. Cardoso, Rosilene Fressatti, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação
em Biociências Aplicadas à Farmácia. III. Título.

CDD 21.ed. 616.995

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDA LUIZA ESPINOSA SPOSITTO

Reação em cadeia da polimerase – multiplex para diferenciação de
Mycobacterium tuberculosis e *Mycobacterium bovis* em secreção pulmonar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Rosilene Fressatti Cardoso
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Thaís Gomes Verzignassi Silveira
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Lílían Cristiane Baeza
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Malaspina
Faculdade de Taquaritinga

Aprovada em: 18/02/2010

Local de defesa: Universidade Estadual de Maringá - UEM

DEDICATÓRIA(S)

À Deus pela vida, saúde e
força que me concede e à
meus pais pelo amor e apoio
incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sabedoria e força para superar os obstáculos;

Aos meus pais, Dirce e Oberdan, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim, obrigada por acreditarem na minha capacidade! Sem o apoio de vocês eu não conseguiria esta conquista;

À minha orientadora, Prof^a Rosilene, toda minha gratidão e admiração! Obrigada pela oportunidade de iniciar na pesquisa científica, por toda dedicação e confiança;

Aos amigos, estagiários e funcionários do LEPAC, principalmente do Laboratório de Bacteriologia Clínica, agradeço por todo apoio e compreensão;

Às amigas Paula, Luciana e Sara, por me ajudarem nos experimentos e pela amizade nos momentos fáceis e difíceis do mestrado!

Às amigas que dividem apartamento comigo, Dayanne, Maitê e Maira, obrigada pela compreensão nos meus dias de mau humor pós experimentos!

À todos, que de uma forma ou outra, colaboraram para a elaboração deste trabalho, meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

“A vitória cabe ao que mais persevera!”

(Napoleão Bonaparte)

Reação em cadeia da polimerase – multiplex para diferenciação de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* em secreção pulmonar

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que constitui um grave problema de saúde pública. A TB humana tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*, porém o *Mycobacterium bovis*, agente da TB bovina, pode ser importante patógeno humano, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde existe maior prevalência de TB no gado. A correta diferenciação entre estas espécies de micobactéria na amostra clínica permite o conhecimento da epidemiologia da TB, o controle da infecção bovina e principalmente a escolha apropriada do tratamento antituberculoso, uma vez que o *M. bovis* é intrinsecamente resistente a pirazinamida, um dos fármacos utilizado no tratamento da TB. A ausência de informações da incidência da TB bovina em humanos está relacionada às dificuldades diagnósticas. O diagnóstico usual da TB consiste na baciloscopia e cultura de escarro, mas para identificar *M. bovis* são necessárias técnicas direcionadas. Foi objetivo deste estudo padronizar uma técnica baseada na reação em cadeia da polimerase – multiplex (PCR-Multiplex) para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em secreção pulmonar, visando o diagnóstico rápido e específico da TB pulmonar. O resultado da pesquisa está no artigo: “Reação em Cadeia da Polimerase – Multiplex para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em secreção pulmonar”, que mostra como a PCR-Multiplex proposta pode contribuir para o diagnóstico da TB pulmonar, permitindo não só a detecção da micobactéria na amostra clínica, mas também a simultânea diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* por uma técnica rápida, sensível e específica.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium bovis*; PCR-Multiplex; Diagnóstico.

Polymerase chain reaction - multiplex for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* in pulmonary secretions

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease with serious public health problem. *Mycobacterium tuberculosis* is the etiologic agent of human TB, however *Mycobacterium bovis*, agent of bovine TB, can also be an important human pathogen, especially in underdeveloped and developing countries, where there is higher prevalence of TB in cattle. The correct differentiation between these species of mycobacteria in clinical samples will contribute to understand the epidemiology of TB, control animals infection and especially the appropriate choice of treatment to TB, since *M. bovis* is intrinsically resistant to pyrazinamide, one of drug used in the treatment of TB. The lack of information in the incidence of bovine TB in humans is related to diagnostic difficulties. The usual diagnosis of TB is carried out by acid fast smear and culture, however to identify *M. bovis* specific techniques are necessary. The objective of this study was standardize a technique based on polymerase chain reaction - multiplex (PCR-Multiplex) to differentiate *M. tuberculosis* and *M. bovis* in sputum, aimed at rapid and specific diagnosis of pulmonary TB. The research resulted the article: "Chain Reaction of Polymerase – Multiplex for the differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis* in sputum", that shows how the PCR-Multiplex proposal may contribute to the diagnosis of pulmonary TB, allowing not only detection of mycobacteria in clinical samples, but also the differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis* in a fast, sensitive and specific technique.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium bovis*; PCR-Multiplex; Diagnostic.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	11
1.1	Justificativa.....	15
1.2	Objetivos.....	15
1.3	Referências Bibliográficas.....	17
2	CAPÍTULO II.....	21
2.1	Reação em Cadeia da Polimerase – Multiplex (PCR-Multiplex) para diferenciação de <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. bovis</i> em secreção pulmonar	22
3	CAPÍTULO III.....	41
3.1	Conclusões.....	41
3.2	Perspectivas Futuras.....	41

CAPÍTULO I

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que constitui um grave problema de saúde pública principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. A doença acomete principalmente pessoas na faixa etária correspondente a plena capacidade produtiva, afetando os setores de mais baixa renda da população, vindo a acarretar enorme prejuízo econômico ao país ⁽¹⁾.

Os fatores que intensificam o crescimento desta doença são os aglomerados humanos, a desnutrição, a deterioração das condições sócio-econômicas, medidas de controle ineficazes, o aumento dos casos resistentes às drogas antituberculosas e a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ⁽²⁾. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorreram 9,2 milhões de novos casos e 1,32 milhões de mortes por TB no mundo em 2007, destes 1,37 milhões de casos e 456.000 mortes foram em pacientes co-infectados com HIV ⁽³⁾. O Brasil ocupa o 14º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo. Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 92.000 casos novos e 8.000 óbitos ocorrendo anualmente ⁽³⁾.

O agente etiológico da TB humana é o *Mycobacterium tuberculosis*, o qual pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, porém outras bactérias pertencentes a este complexo também podem infectar o homem, entre elas está o *Mycobacterium bovis*, que é responsável pela TB bovina ⁽⁴⁾.

A TB humana causada pelo *M. bovis* é clínica, patológica e radiologicamente indistinguível da TB causada pelo *M. tuberculosis* ^(5,6), por isso em locais onde existe tanto a TB bovina quanto a humana, a diferenciação das duas espécies na amostra clínica é importante para monitorar a transmissão do *M. bovis* entre o gado e destes para o homem ⁽⁷⁾. Em países desenvolvidos, a implantação de programas de erradicação da TB bovina e a pasteurização do leite têm diminuído a prevalência desta doença no gado e consequentemente sua transmissão para o homem, porém nos países em desenvolvimento, onde a TB bovina ainda está presente no gado, o *M. bovis* pode ser um potencial agente de infecção humana ^(5, 8).

A maioria dos casos de TB causada pelo *M. bovis* ocorre em crianças e pessoas jovens usualmente pelo consumo de leite não pasteurizado ou não fervido de animais infectados, sendo as formas extra-pulmonares mais frequentes ^(9, 10, 11). A TB bovina também é considerada um risco ocupacional para trabalhadores de abatedouros, onde a transmissão por inalação leva à TB pulmonar ⁽⁹⁾. Porém já existem evidências da

transmissão pessoa a pessoa do *M. bovis*, como pode ser observado em estudo realizado no Reino Unido, onde cinco pacientes apresentaram TB pulmonar e um faleceu devido a meningite por *M. bovis*. Todos apresentaram a mesma cepa de *M. bovis* de acordo com o perfil molecular obtido por spoligotyping e MIRU-VNTR e relataram nenhum contato recente com gado ou consumo de leite não pasteurizado, o que evidenciou a transmissão entre pessoas ⁽¹²⁾. Estudos relatam a transmissão, pessoa a pessoa, de cepas de *M. bovis* multidroga resistentes (MDR), o que agrava ainda mais a situação da TB humana por *M. bovis* ⁽¹³⁾, uma vez que o tratamento para cepas resistentes é menos efetivo e os medicamentos disponíveis são limitados e antigos ^(10, 14).

A presença de doenças imunossupressoras no paciente é considerada um fator de risco para o desenvolvimento e evolução de TB humana por *M. bovis*. Entre estas doenças está o diabetes mellitus, a desnutrição, infecções concomitantes e principalmente, a infecção pelo HIV, que devido a baixa na resistência imunológica, predispõe a infecção por micobactérias que geralmente não causariam doença no indivíduo sadio ^(6, 11).

A infecção por *M. bovis* é responsável por cerca de 2% e 8% de novos casos na América Latina de TB humana pulmonar e extra-pulmonar, respectivamente ⁽⁵⁾. Nas Américas, registraram-se 7.000 casos de TB humana por *M. bovis* no ano de 1992 ^(15, 16). Em estudo realizado em San Diego, Estados Unidos (EUA), cidade que faz fronteira com o México, onde a TB bovina ainda é comum, evidenciou-se que 10% dos casos de TB positivos pela cultura eram causados pelo *M. bovis* ⁽¹⁰⁾. Porém, há estudos que mostram que o problema não está somente nas regiões de fronteira com o México, uma vez que diagnosticaram 35 casos de TB por *M. bovis* na cidade de Nova York, entre 2001-2004 ⁽¹⁷⁾.

No México, vários estudos têm avaliado a incidência de *M. bovis* como agente de TB humana. Cícero *et al.* ⁽¹¹⁾ evidenciaram que 20% dos pacientes com TB extra-pulmonar tinham o *M. bovis* como agente etiológico sendo que um desses pacientes era HIV positivo e apresentou *M. bovis* com perfil de *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), cepa utilizada na vacinação contra TB, o que ressalta a importância de diferenciar a espécie de micobactéria na amostra clínica, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

No Brasil, entre 1989 e 1998, os dados de notificações oficiais indicaram uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados pelo *M. bovis* ⁽¹⁸⁾. Porém acredita-se que a prevalência da TB bovina no Brasil seja subnotificada, pois como esta

doença gera grandes prejuízos econômicos aos pecuaristas, ainda hoje se observa o abate clandestino de animais tuberculosos ⁽¹⁹⁾ e o comércio clandestino de leite como práticas comuns em várias regiões do Brasil ⁽⁷⁾. Segundo uma pesquisa realizada em 1998, uma média de 7,1% do rebanho bovino brasileiro estava infectado por *M. bovis*, variando de 2,8% no Centro-Oeste para 58,3% nas regiões do Norte ⁽¹⁶⁾. Como a vacinação obrigatória do gado brasileiro só foi implantada em 2001, a infecção por *M. bovis* ainda é uma importante doença veterinária no Brasil e consequentemente um fator de risco para transmissão de TB bovina ao homem ⁽¹⁸⁾.

De acordo com estimativas da OMS, em 1993, a infecção humana por *M. bovis* era responsável por 4.000 dos 80.000 casos de TB notificados a cada ano no Brasil ⁽²⁰⁾, no entanto atualmente não existem dados oficiais sobre a prevalência de TB humana por *M. bovis* no Brasil, seja pela falta de notificação às autoridades sanitárias ou pela não diferenciação do agente etiológico da TB humana a nível de espécie ⁽¹⁸⁾.

A falha na distinção desses bacilos leva a falsa impressão de que medidas de controle da TB em bovinos foram suficientes para considerar a doença humana por *M. bovis* quase extinta em muitos países desenvolvidos e em desenvolvimento ⁽²¹⁾, uma vez que existe uma correlação direta entre prevalência de TB de origem bovina em humano e TB no gado ⁽⁵⁾.

A ausência de informações da incidência da TB bovina em humanos está relacionada às dificuldades diagnósticas ⁽⁷⁾. O diagnóstico usual da TB humana consiste na baciloscopia e cultura de escarro, mas para identificar *M. bovis* técnicas direcionadas que atendam as exigências nutricionais do microrganismo são necessárias, como cultura em meio suplementado com piruvato de sódio e incubação sob tensão de CO₂. A observação microscópica de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), é um método rápido e de baixo custo, no entanto, apresenta baixa sensibilidade e não diferencia a espécie de micobactéria presente na amostra. A cultura, apesar de ser o “padrão ouro” para confirmação diagnóstica da TB humana, requer de quatro a oito semanas para um diagnóstico definitivo ⁽²²⁾ e o meio de cultura usualmente utilizado nos laboratórios (Lowestein-Jensen) não fornece condições nutricionais ideais para o crescimento de *M. bovis* ⁽²³⁾, além do fato da cultura ter seu uso reservado para situações especiais tais como suspeita de falha no tratamento e recidivas ⁽⁹⁾.

Outro fator importante para diferenciar *M.tuberculosis* de *M. bovis* na amostra de escarro é a resistência intrínseca do *M. bovis* à pirazinamida (PZA), uma droga de primeira escolha para o tratamento da TB ^(24, 25), além do fato de existir uma maior taxa

de mortalidade de pacientes com TB bovina tratados com o esquema convencional de fármacos antituberculosos ^(10, 26).

Desta forma, a correta diferenciação da espécie de micobactéria na amostra clínica permite a escolha apropriada do tratamento antituberculoso, o que é de grande importância no controle da infecção, o conhecimento da epidemiologia da TB e o controle da infecção bovina ^(25, 27). Consequentemente é importante desenvolver um método de diagnóstico específico, rápido e de baixo custo para detectar e diferenciar micobactérias em amostras clínicas ^(25, 28).

Novas metodologias são empregadas em centros de estudos, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e diminuir o tempo para a detecção de micobactérias em material clínico, bem como para caracterização dos isolados em estudos epidemiológicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta rápida e sensível que pode ser utilizada para detectar regiões específicas de DNA de agentes infecciosos em amostras clínicas em até 48 horas, mas a presença de inibidores da DNA polimerase pode interferir no desempenho da reação ^(11, 29, 30). Essa técnica amplifica sequências específicas do DNA de micobactérias, determinada pela escolha adequada de iniciadores (primers) que têm como alvo marcadores moleculares presentes no genoma da micobactéria ⁽³¹⁾. Na PCR convencional utiliza-se um par de iniciadores para a amplificação de uma sequência específica no DNA bacteriano, já na PCR-Multiplex utiliza-se mais de um par de iniciadores simultaneamente na reação de amplificação, o que permite detectar mais de um marcador molecular em apenas uma reação de amplificação.

Vários marcadores moleculares têm sido utilizados para detecção de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, entre eles, o mais utilizado é o elemento de inserção IS6110, por ser um marcador que apresenta várias cópias no genoma das micobactérias ^(32, 33, 34). Porém este marcador não é capaz de diferenciar os membros do complexo *M. tuberculosis* ⁽³⁵⁾. Para diferenciar as micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, alguns estudos têm utilizado marcadores que são específicos para determinada espécie de micobactéria ^(24, 36). Porém, a falta de sequências conservadas no genoma micobacteriano, que sejam capazes de diferenciar entre os membros do complexo, dificulta a seleção de iniciadores específicos para uma espécie de micobactéria ⁽²⁸⁾.

Entre os marcadores capazes de diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, está o gene *pncA*. Este gene está presente no *M. bovis* e no *M. tuberculosis* e codifica a enzima pirazinamidase, que é a enzima responsável pela ativação do pro-fármaco pirazinamida

(PZA) em ácido pirazinóico. Porém, o *M. bovis* possui uma mutação pontual no nucleotídeo 169 (G → C) do gene *pncA*, que impossibilita a ativação do fármaco, devido a inativação da pirazinamidase bacteriana conferindo uma resistência intrínseca do *M. bovis* à PZA. Este polimorfismo no gene *pncA* é uma ótima opção para o desenvolvimento de métodos para diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* visando o diagnóstico específico da TB^(24, 25).

Vários estudos têm utilizado a PCR-Multiplex para diferenciação de micobactérias presentes na amostra clínica, porém, na maioria, são utilizados isolados clínicos de cultura para a extração de DNA micobacteriano^(11, 28), o que torna a técnica demorada, uma vez que as micobactérias do complexo *M. tuberculosis* levam meses para crescer em meio sólido.

JUSTIFICATIVA

Com a atual situação da TB no mundo fica evidente a necessidade de medidas de controle mais efetivas, tanto para a TB humana quanto para a TB bovina, que levem em consideração a complexidade da doença *per se* e as limitações dos métodos diagnósticos em diferenciar as espécies de micobactérias na amostra clínica, além da importância da escolha de um tratamento apropriado.

Não se conhece em nossa região a real importância do *M. bovis* como agente de TB seja de caráter profissional ou não e sua transmissão à população através do consumo de leite e seus derivados contaminados.

O uso da PCR-Multiplex para a amplificação de sequência de DNA específica para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis* permite um diagnóstico rápido, sensível e específico da TB, possibilitando a diferenciação entre as espécies diretamente da amostra de escarro. Esta diferenciação levará a redução do tempo para o início do tratamento e implantação de medidas de controle da doença causada pelo *M. bovis* bem como o conhecimento da epidemiologia da TB causada por estas espécies em nossa região.

OBJETIVO GERAL

Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase – Multiplex (PCR-Multiplex) para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em secreção pulmonar, visando o diagnóstico rápido e específico da TB pulmonar.

Objetivos específicos

- Otimização da metodologia de extração de DNA micobacteriano em amostras de escarro;
- Padronização da metodologia PCR-Multiplex para detecção e diferenciação de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*;
- Determinação da especificidade da PCR-multiplex para diferenciar isolados clínicos de *M. bovis* de *M. tuberculosis*;
- Determinação da sensibilidade da PCR-multiplex para detectar micobactérias do complexo *M. tuberculosis* em amostras de escarros experimentalmente contaminados com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5;

REFERÊNCIAS

- 1- Barco P & Cardoso RF (2003) Tuberculose e Resistência a Drogas. Laes & Haes Fevereiro/Março p.130-144.
- 2- World Health Organization (2005) Global Tuberculosis Control, In: WHO Report 2005. http://www.who.int/tb/publications/global_report2005/summary/en/index.html Acessado em 30 Jun 2008.
- 3- World Health Organization (2009) Global Tuberculosis Control- Surveillance, Planning, Financing: WHO Report 2009 WHO/HTM/TB/2009.393
- 4- Cousins DV, Francis BR, Gow BL, Collins DM, McGlashan CH, Gregory A, Mackenzie R (1990) *M. Tuberculosis* in captive seals : bacteriological studies on an isolate belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Res Vet Sci 48:196-200.
- 5- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ et al (1998) Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. Emerg Infect Dis 4:59-70.
- 6- Grange JM (2001) *Mycobacterium bovis* infection in human beings. Tuberculosis 81:71-7.
- 7- Leite CQF, Anno IS, Leite SRA, Roxo E, Morlock GP, Cooksey RC (2003) Isolation and identification of Mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 98:319-323.
- 8- OIE, 2009. Bovine Tuberculosis, http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf Acessado em 19 Nov 2009.
- 9- Thoen C, Lobue P, Kantor I (2006) The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet Microbiol 112:339-345.
- 10- Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA (2008) Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in Binational Communities, United States. Emerg Infect Dis www.cdc.gov/eid 14:909-916.
- 11- Cicero R, Olivera H, Hernández-Solis A, Ramírez-Casanova E, Escobar-Gutiérrez A (2009) Frequency of *Mycobacterium bovis* as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV-positive and -negative Mexican patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28:455-460 doi 10.1007/s10096-008-0649-5.

- 12- Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RMM, Dale J, Innes JA, Hunt D, Tweddell A, Wood A, Anderson C, Hewinson RG, Smith NH, Hawkey PM, Sonnenberg P (2007) Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 369:1270–1276.
- 13- Hughes VM, Skuce R, Doig C, Stevenson K, Sharp JM, Watt B (2003) Analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* from three clinical samples from Scotland. *Int J Tuberc Lung Dis* 7:1191–1198.
- 14- Souza MVN & Vasconcelos TRA (2005) Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Quim Nova* 28:678-682.
- 15- Organización Panamericana de la Salud (1992) Reunión internacional para la erradicación de la tuberculosis bovina em lãs Américas. *Bol Oficina Sanit Panam* 113:357-360.
- 16- Ritacco V, Kantor IN (1992) Zoonotic tuberculosis in América Latina. [Letter;comment] *J Clin Microbiol* 30:3299-3300.
- 17- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2005) Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*—New York City, 2001–2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 54:605–608.
- 18- Brasil (2006) Ministério da Agricultura. Departamento de Defesa Animal (DDA). Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Brasília.
- 19- Abrahão RMCM (1999) Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. *Arch Vet Scienc* 4:5-15.
- 20- World Health Organization (1994) Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) 72:851-857.
- 21- Grange JM, Daborn C, Cosivi O (1994) HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. *Eur Respir J* 7:1564–1566.
- 22- Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL (1999) Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Revista de Saúde Pública* 33:281-286.
- 23- De La Rua-Domenech R (2006) Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86:77–109.

- 24- Shah DH, Verma R, Bakshi CS, Singh RK (2002) A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 214:39-43.
- 25- Bannalika AS, Verma R (2006) Detection of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of *hsp65* gene and *pncA* PCR. Indian J Med Res 123:165-172.
- 26- LoBue PA, Moser KS (2005) Treatment of *Mycobacterium bovis* infected tuberculosis patients: San Diego County, California, United States, 1994–2003. Int J Tuberc Lung Dis 9:333–338.
- 27- Niemann S, Richter E, Rüsch-Gerdes S (2000) 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 38:152-157.
- 28- Pérez-Martínez I, Ponce-de-león A, Bobadilla M, Villegas-Sepúlveda N, Pérez-García M, Sifuentes-Osorio J, González-y-Merchán JA, Estrada-García T (2008) A novel identification scheme for genus *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex, and seven mycobacteria species of human clinical impact. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 27:451-459.
- 29- Haddad N, Masselot M, Durand B (2004) Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. Res Vet Sc 76:1-18.
- 30- Singh RK, Verma R, Bakshi CS, Shah DH (2004) Molecular fingerprint of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from India by restriction fragment length polymorphism (RFLP). J Vet Sci 5:331- 335.
- 31- Forbes BA, Hicks KES (1993) Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Specimens in a Clinical Laboratory by Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol 31:1688-1694.
- 32- Flores LL, Pai M, Colford Jr JM, Riley LW (2005) In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression BMC Microbiol 5:55 doi:10.1186/1471-2180-5-55.
- 33- Pathak D, Chakravorty S, Hanif M, Tyagi J S (2007) Lysis of tubercle bacilli in fresh and stored sputum specimens: implications for diagnosing tuberculosis in

stored and paucibacillary specimens by PCR. BMC Microbiol 7:83 doi: 10.1186/1471-2180-7-83.

- 34- Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA (2008) Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. J Microbiol Met 75:1-11.
- 35- Van Soolingen D, Hermans PWM, Haas PEW et al (1991) Occurrence and Stability of Insertion Sequences in Mycobacterium tuberculosis Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. J Clin Microbiol 29:2578-2586.
- 36- Soo P-C, et al (2009) A simple gold nanoparticle probes assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* complex from clinical specimens, Molec and Cell Probes 23:240-246 doi:10.1016/j.mcp.2009.04.006

CAPÍTULO II

**Artigo: “REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – MULTIPLEX PARA
DIFERENCIAÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* E *Mycobacterium bovis* EM
SECREÇÃO PULMONAR.”**

**Reação em Cadeia da Polimerase – Multiplex para Diferenciação de
Mycobacterium tuberculosis e *Mycobacterium bovis* em Secreção Pulmonar**

**F. L. Espinosa Spositto, S. Macente, P. A. Zanetti Campanerut, L. Dias Ghiraldi,
C. Q. Fujimura Leite, M. H. Hirata, R. Fressatti Cardoso**

PCR - Multiplex para diferenciação de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium
bovis*

**F. L. Espinosa Spositto, S. Macente, P. A. Zanetti Campanerut, L. Dias Ghiraldi,
R. Fressatti Cardoso (✉)**

Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá. Avenida
Colombo 5790, Bloco J90 – Sala 05, 78020-900, Maringá, Paraná, Brasil E-mail:
rffcardoso@uem.br

Telefone 55 44 3261 4797; Fax 55 44 3261 4797

C. Q. Fujimura Leite

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade do Estado de São Paulo (UNESP),
Araraquara, São Paulo, Brasil.

M. H. Hirata

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo,
Brasil.

Resumo

Foi objetivo deste estudo padronizar uma técnica baseada na reação em cadeia da polimerase – multiplex para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em secreção pulmonar, visando o diagnóstico rápido e específico da TB pulmonar. A amplificação foi realizada com iniciadores específicos para o complexo *M. tuberculosis* TB1/TB2, que amplificam um fragmento de 123 pares de bases da sequência IS6110 e com iniciadores específicos para *M. bovis* *pnc*ATB-1.2/*pnc*AMB-2, que amplificam um fragmento de 185 pb do gene *pncA*. A PCR-Multiplex não apresentou amplificação para as cepas padrões de micobactérias não pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* utilizadas no presente estudo. A especificidade da PCR-Multiplex também foi observada pela amplificação com os DNAs obtidos dos isolados clínicos. Todos os 17 isolados clínicos de *M. bovis* e 30 de *M. tuberculosis* foram corretamente identificados pela técnica proposta. A PCR-Multiplex se mostrou específica para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em amostra clínica e apresentou sensibilidade semelhante a da cultura (500 bacilos/mL de escarro) quando utilizado DNA de *M. bovis* extraído diretamente de amostras de escarro. A PCR-Multiplex proposta pode contribuir para o diagnóstico da TB pulmonar, permitindo não só a detecção da micobactéria na amostra clínica, mas também a simultânea diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* por uma técnica rápida, sensível e específica.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium bovis*; PCR-Multiplex; Diagnóstico.

Introdução

A TB humana tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*, porém o *Mycobacterium bovis*, agente da TB bovina, também pode ser um importante patógeno humano, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde existe maior prevalência de TB no gado [1].

A TB humana causada pelo *M. bovis* é clínica, patológica e radiologicamente indistinguível da TB causada pelo *M. tuberculosis* [2, 3], por isso em locais onde existe tanto a TB bovina quanto a humana, a diferenciação das duas espécies na amostra clínica é importante para monitorar a transmissão do *M. bovis* entre o gado e destes para o homem [4]. A maioria dos casos de TB causada pelo *M. bovis* ocorre em crianças e pessoas jovens usualmente pelo consumo de leite não pasteurizado de animais infectados, onde as formas extrapulmonares são mais frequentes [5-7]. A TB bovina também é considerada um risco ocupacional para trabalhadores de abatedouros, onde a transmissão por inalação leva à TB pulmonar [5].

A presença de doenças imunossupressoras no paciente, principalmente a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), é considerada um fator de risco para o desenvolvimento e evolução de TB humana por *M. bovis* [3, 7].

No Brasil, entre 1989 e 1998, os dados de notificações oficiais indicaram uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados pelo *M. bovis* [8]. Porém acredita-se que a prevalência da TB bovina no Brasil seja subnotificada, pois como esta doença gera grandes prejuízos econômicos aos pecuaristas, ainda hoje se observa o abate clandestino de animais tuberculosos [9] e o comércio clandestino de leite como práticas comuns em várias regiões do Brasil [4].

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1993 a infecção humana por *M. bovis* provavelmente foi responsável por 4.000 dos 80.000 casos de TB notificados a cada ano no Brasil [10], no entanto atualmente não existem dados oficiais sobre a prevalência de TB humana por *M. bovis* no Brasil, seja pela falta de notificação às autoridades sanitárias ou pela não diferenciação do agente etiológico da TB humana a nível de espécie [8].

A ausência de informações da incidência da TB bovina em humanos está relacionada às dificuldades diagnósticas [4]. O diagnóstico usual da tuberculose humana consiste na baciloscopia e cultura de escarro, mas para identificar *M. bovis* é necessário cultura direcionada. A baciloscopia é um método rápido e de baixo custo, no entanto,

apresenta baixa sensibilidade e não diferencia a espécie de micobactéria presente na amostra. A cultura, apesar de ser o “padrão ouro” para confirmação diagnóstica da TB humana, requer de 4 a 8 semanas para um diagnóstico definitivo [11] e o meio de cultura usualmente utilizado nos laboratórios (Lowestein-Jensen) não fornece condições nutricionais ideais para o crescimento de *M. bovis* [12], além do fato da cultura ter seu uso reservado para situações especiais tais como suspeita de falha no tratamento e recidivas [5].

Outro fator importante para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis* na amostra de escarro é a resistência intrínseca do *M. bovis* à pirazinamida (PZA), uma droga de primeira escolha para o tratamento da TB [13, 14], além do fato de existir maior taxa de mortalidade de pacientes com TB bovina tratados com o esquema convencional de fármacos antituberculosos [6, 15]. A correta diferenciação entre estas espécies de micobactéria na amostra clínica permite o conhecimento da epidemiologia da TB, o controle da infecção bovina e principalmente a escolha apropriada do tratamento antituberculoso [13].

Entre os métodos moleculares, vários marcadores têm sido utilizados para detecção de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, e o mais utilizado é o elemento de inserção IS6110, por ser um marcador que apresenta várias cópias no genoma das micobactérias [16, 17, 18, 24, 27]. Porém este marcador não é capaz de diferenciar os membros do complexo *M. tuberculosis* [19].

Entre os marcadores capazes de diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, está o gene *pncA*, que codifica para uma enzima, a pirazinamidase, que é responsável pela ativação do pro-fármaco pirazinamida em ácido pirazinóico. Este gene possui uma mutação pontual no nucleotídeo 169 (G → C) em *M. bovis* que impossibilita a ativação do fármaco. Este polimorfismo é uma ótima opção para o desenvolvimento de métodos para diferenciação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* [13, 14, 20, 21].

Foi objetivo deste estudo padronizar uma técnica baseada na reação em cadeia da polimerase – multiplex para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em secreção pulmonar, visando o diagnóstico rápido e específico da TB pulmonar.

Materiais e Métodos

Cepas de Micobactérias e Extração de DNA

Foram utilizadas cepas de referência de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5, *M. avium* (ATCC 13.950), *M. smegmatis* (Laboratório Central - LACEN/PR), *M. kansasii*

(LACEN/PR cc 08.00), *M. fortuitum* (Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – LEPAC), *M. szulgai* (LACEN/PR cc 13.00), *M. massilienses* (LACEN/PR), *M. abscessus* (LACEN/PR), *M. chelonae* (LACEN/PR) e 17 amostras de *M. bovis* isolados de linfonodos de bovinos e 30 amostras de *M. tuberculosis* isolados de pacientes com TB pulmonar, cultivadas em meio de Lowenstein-Jensen (L-J).

O DNA cromossômico micobacteriano foi extraído como descrito por Cardoso *et al.*, (2004) [22]. Para a extração de DNA, foi adicionado solução de lise Cloridrato de Guanidina 6M (Gibco BRL, Life technologies, Germany) a uma alçada de micobactérias crescidas em meio L-J. O DNA foi purificado com uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 (v/v) e precipitado em etanol absoluto gelado. O DNA foi solubilizado em TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8,0) e estocado a -20°C até o momento de uso.

Extração de DNA de micobactérias em amostras clínicas

A extração de DNA micobacteriano em amostras de escarros foi realizada de acordo com a técnica descrita por Cardoso *et al.* (2004) [22] com algumas modificações. Para isto, aos escarros foram adicionados 250 µL de solução de N-Acetil-L-Cisteína-NaOH (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), agitado em vórtex e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos [23]. As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 5 minutos. Ao sedimento obtido foram adicionados 300 µL de solução de lise Cloridrato de Guanidina 6M. O DNA foi extraído por choque térmico realizando fervura por 10 minutos seguido de banho de gelo por 15 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes e as amostras deixadas à -20°C *overnight*. A purificação do DNA micobacteriano foi realizada utilizando mistura de Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1, v/v), precipitada em etanol absoluto gelado e deixado a -20°C *overnight*. O DNA foi solubilizado em TE e estocado a -20°C até o momento de uso.

Iniciadores e condições da PCR-Multiplex

A amplificação foi realizada com iniciadores específicos para o complexo *M. tuberculosis* TB1 (5' CCG GCG AGC GTA GGC GTC GG 3') e TB2 (5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') [24] que amplificam um fragmento de 123 pares de bases (pb) da sequência IS6110 e com iniciadores específicos para *M. bovis* *pncATB*-1.2 (5'-ATG CGG GCG TTG ATC ATC GTC-3') e *pncAMB*-2 (5'-CGG TGT GCC GGA GAA GCC G-3') [20, 14] que amplificam um fragmento de 185 pb do gene *pncA*.

Testes individuais de amplificação usando separadamente os iniciadores TB1/TB2 e *pncATB-1.2/pncAMB-2* foram realizados como previamente descrito [20, 24].

A PCR-Multiplex foi realizada com 1 µL de DNA em 24 µL da mistura de reação contendo 0,2 µM de cada iniciador TB1 e TB2 (Invitrogen - Integrated DNA Technologies, Inc. Coralville, USA), 0,4 µM de cada iniciador *pncATB-1.2* e *pncAMB-2* (Invitrogen - Integrated DNA Technologies, Inc. Coralville, USA) e PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PELKIN-ELMER Gene Amp PCR System 2400 (Waltham, Massachusetts, USA) utilizando um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos (cada um: 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 68°C; 1 minuto a 72°C), uma extensão final de 10 minutos a 72°C com posterior permanência a 4°C.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Biotools/M&B Laboratories, S. A., Uniscience do Brasil, São Paulo, Brasil) 2,0 % a 100 Volts durante 1 hora. A presença de amplificação foi observada em transiluminador Macrovue (Pharmacia Bioscience, Upsala, Suécia), sob luz UV após coloração do gel com solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL e fotodocumentados com sistema digital Power Shot S215 (Cannon, NY, USA). Marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a leitura da amplificação.

Especificidade e sensibilidade dos ensaios de PCR com DNA micobacteriano

A especificidade dos iniciadores TB1/TB2 e *pncATB-1.2/pncAMB-2* para detecção e diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* respectivamente foi avaliada utilizando DNA das cepas de referência e dos isolados clínicos previamente descritos.

A sensibilidade de cada par de iniciadores foi avaliada separadamente e por PCR-Multiplex utilizando diluições seriadas de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5, na concentração de 10 µg a 0,01 fg.

Sensibilidade da PCR-Multiplex em amostras clínicas

Para determinar a sensibilidade da PCR-Multiplex, em amostra de escarro, foi inicialmente preparado dois *pools* de escarros a partir de amostras clínicas que apresentavam resultado negativo para bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) pela baciloscopia e cultura em meio L-J. Na sequência foram preparadas suspensões

micobacterianas com as cepas de referência *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5 e padronizada com a escala de McFarland nº 1 (10^7 Bacilos/mL). A partir destas suspensões micobacterianas padronizadas foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-20}) e adicionado 50 µL de cada diluição bacteriana a amostras de 450 µL de escarros do *pool* previamente preparado.

A partir dos escarros, contaminados com as diluições micobacterianas, foi realizado a extração de DNA micobacteriano e em seguida a PCR-Multiplex, de acordo com as metodologias previamente descritas. Para cada diluição do escarro foi realizado um controle da ausência de inibidores da PCR adicionando-se 1 ng/µL de DNA de *M. bovis* AN5 a 25µL do extrato obtido.

Análise dos resultados

A PCR-Multiplex foi considerada positiva para *M. tuberculosis* pela presença de uma única banda de DNA de 123 pb, e positiva para *M. bovis* pela presença de duas bandas de DNA, uma de 123 e outra de 185 pb. Em todas as reações de amplificações foram incluídos dois controles positivos e um negativo. Nos controles positivos, foram adicionados à mistura de reação 1ng/µL de DNA extraído de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5 e no controle negativo foi acrescido aos reagentes da PCR 1 µL de TE.

Resultados

A amplificação utilizando os iniciadores TB1/TB2 e *pnc*ATB-1.2/*pnc*AMB-2 apresentou especificidade quando empregados separadamente na PCR convencional resultando produtos de tamanho de 123 pb para *M. tuberculosis* e 185 pb para *M. bovis*. Nenhuma amplificação foi observada com DNA das cepas de referência de micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* utilizadas no presente estudo (dados não mostrados).

Como esperado, a PCR-Multiplex apresentou especificidade para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* pela amplificação de um fragmento de DNA de 123 pb e de dois fragmentos de DNA com tamanhos de 123 e 185 pb respectivamente. Para as outras cepas de referência não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* não foi observado produto da PCR dos tamanhos específicos à *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Figura 1).

Todos os isolados clínicos de *M. tuberculosis* apresentaram banda única de tamanho de 123 pb pela PCR-Multiplex. Da mesma forma, com os isolados de *M. bovis*

que foram identificados bioquímica e molecularmente (amplificação com os iniciadores JB21 e JB22 [13] e caracterizados por *Spoligotyping*) todos apresentaram amplificação de dois fragmentos de DNA (123 e 185pb) (dados não mostrados).

Quando testados separadamente pela PCR convencional, com as diluições de DNA das cepas de referência, observou-se amplificação com os iniciadores TB1 e TB2 até a concentração 0,01 fg de DNA *M. tuberculosis* H37Rv e com os iniciadores *pncATB-1.2* e *pncAMB-2* até a concentração de 0,1 fg de DNA de *M. bovis* AN5 (dados não mostrados).

A sensibilidade analítica da PCR-Multiplex foi determinada usando diluições seriadas de DNA das cepas de referência *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5 como mostrado nas figuras 2 e 3. A PCR-Multiplex detectou a presença de DNA cromossomal maior ou igual a 0,01fg para *M. tuberculosis* H37Rv e foi capaz de detectar *M. bovis* AN5 em concentrações de DNA maior ou igual a 0,1 fg, no entanto foi capaz de diferenciar *M. bovis* quando da utilização de concentrações de DNA maior ou igual a 1 ng.

Quando a PCR-Multiplex foi aplicada para detecção de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em amostras de escarros contaminados com concentrações conhecidas dos microrganismos em estudo observou-se detecção nas concentrações de aproximadamente 500 bacilos/mL de escarro para *M. bovis* e de 10^{-4} bacilos/mL de escarro para *M. tuberculosis* após confirmada a ausência de inibidores da PCR (Figuras 4 e 5).

Discussão

A TB humana, na maioria das vezes, é causada pelo *M. tuberculosis*, no entanto o *M. bovis*, agente da TB bovina, também é um importante patógeno humano, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde existe maior prevalência de TB no gado [1]. Outro fator que devemos considerar, principalmente em imunocomprometidos, é a ocorrência de infecção mista, ou seja, infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis* simultaneamente, sendo que esta infecção por *M. bovis* geralmente é proveniente da cepa BCG utilizada na vacina contra TB [7; 25].

A correta diferenciação da espécie de micobactéria na amostra clínica permite a escolha apropriada do tratamento antituberculoso, o que é de grande importância no controle da infecção, assim como o conhecimento da epidemiologia da TB e o controle da infecção bovina [13, 26]. Consequentemente é importante desenvolver um método de

diagnóstico específico, rápido e de baixo custo para detectar e diferenciar micobactérias do complexo *M. tuberculosis* em amostras clínicas [14, 27].

A PCR-Multiplex proposta no presente estudo utilizando os iniciadores TB1/TB2 [24] e *pncATB-1.2/pncAMB-2* [20] mostrou ser uma técnica específica para detectar e também diferenciar duas espécies de micobactérias que podem causar TB. Esta técnica apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais de diagnóstico da TB, pois além de detectar *M. tuberculosis* e *M. bovis* também é capaz de diferenciar essas duas micobactérias, não só na amostra de escarro, mas também isolados clínicos a partir de cultura, quando as técnicas de identificação bioquímica não são capazes de fornecer resultados satisfatórios. Também apresenta a vantagem de ser uma técnica rápida, permitindo a liberação do resultado em dois a três dias.

A diferença na concentração de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5 detectável pela PCR utilizando os iniciadores TB1/TB2 separadamente e na PCR-Multiplex é explicada considerando o número de cópias da região gênica alvo dos iniciadores. Os iniciadores TB1 e TB2 fazem anelamento com a sequência IS6110 que apresenta até 20 cópias no genoma do *M. tuberculosis* H37Rv e até cinco cópias no genoma do *M. bovis* AN5 [19], o que explica a maior sensibilidade da PCR para detectar *M. tuberculosis* H37Rv (0,01fg de DNA) no presente estudo.

Outros estudos, que utilizaram PCR convencional, também evidenciaram que devido à sequência IS6110 estar presente em múltiplas cópias no genoma do *M. tuberculosis* H37Rv, há uma maior sensibilidade da PCR com estes iniciadores em comparação com aquelas que utilizam iniciadores no qual o alvo é uma única sequência no genoma micobacteriano (*oxyR*, 65 kDa, 38 kDa, MPB64) [20, 27].

A PCR-Multiplex proposta apresentou excelente sensibilidade para detectar a sequência IS6110 em *M. tuberculosis* e *M. bovis* em amostras de escarros e isolados clínicos, porém vale ressaltar que esta sequência não está presente somente nestas espécies de micobactérias, e sim em todas as pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* [16, 17, 18], o que pode também permitir a detecção das outras espécies do complexo *M. tuberculosis* na amostra clínica.

Já os iniciadores *pncATB-1.2* e *pncAMB-2* fazem anelamento com o gene *pncA*, que está presente em uma única cópia no genoma do *M. bovis* AN5 [14], o que explica sua menor sensibilidade para detectar e diferenciar *M. bovis* (1ng de DNA) na PCR-Multiplex quando comparado com a sensibilidade de detecção de *M. bovis* (0,1 fg de DNA) utilizando como alvo a sequência IS6110. Porém a sequência alvo dos

iniciadores *pncATB-1.2* e *pncAMB-2* tem se mostrado útil para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis* por métodos de PCR convencionais [14, 29, 30] e também por PCR-Multiplex [13, 21].

Embora a sensibilidade de diferenciação para *M. bovis* (1ng de DNA) tenha sido menor que a sensibilidade de detecção (0,1fg de DNA) deste microrganismo, a PCR-Multiplex proposta mostra ser uma ótima ferramenta para detecção e diferenciação de *M. bovis* na amostra clínica.

Foi observada uma menor sensibilidade da PCR-Multiplex quando aplicada em DNA extraído diretamente de amostra de escarro, provavelmente devido ao fato das micobactérias possuírem a capacidade de crescimento em forma de grumos na amostra clínica (*clumping*), dificultando assim a homogeneidade do bacilo na amostra como um todo [31]. Deve ser considerado também que o tratamento necessário para descontaminação inicial das amostras clínicas utiliza substâncias que podem inibir a Taq DNA Polimerase, como no caso do NALC-NaOH, utilizado no presente estudo no tratamento prévio à extração de DNA nas amostras de escarros [11]. Devemos ter também em mente que quando trabalhamos com amostras biológicas, esta pode conter inibidores da Taq DNA Polimerase que podem não ter sido totalmente retirados durante os procedimentos de extração do DNA e levar a resultados falso negativos [21, 32, 33]. A presença de inibidores na amostra clínica é um dos maiores obstáculos para o sucesso da reação de amplificação [21, 34, 35]. Com a finalidade de minimizar esses interferentes, foi incluído um controle interno da extração para cada diluição dos escarros contaminados, para avaliar a presença de inibidores na reação de amplificação.

Outro fator que devemos considerar é que por se tratar de uma PCR que utiliza mais de um par de iniciadores simultaneamente, o iniciador que tem como alvo uma região de melhor amplificação, por exemplo, sequência com várias cópias no genoma, pode influenciar negativamente o iniciador que tem como alvo uma única cópia no genoma [28, 36]. Isto explica porque quando utilizamos o DNA de *M. bovis* AN5 a sensibilidade de identificação da PCR convencional, com os iniciadores *pncATB-1.2* e *pncAMB-2*, é maior (0,1 fg de DNA) comparada com a PCR-Multiplex (1 ng de DNA), pois nesta última os iniciadores TB1/TB2 podem ter influenciado negativamente o anelamento do iniciador *pncATB-1.2* e *pncAMB-2* no DNA de *M. bovis* [36].

Para avaliar a sensibilidade da PCR-Multiplex que utilizava como um dos iniciadores o *pncATB-1.2* e *pncAMB-2*, Shah *et al.* (2002) [13] também realizaram diluições seriadas de DNA de *M. tuberculosis* e *M. bovis* e obtiveram sensibilidade

maior (20 pg de DNA) que a apresentada neste estudo (1ng de DNA) para *M. bovis*. Porém, Shah *et al.* (2002) [13] não utilizaram amostras de escarro para avaliar a sensibilidade e ambos os iniciadores utilizados possuíam apenas uma sequência alvo no genoma micobacteriano, o que pode ter impedido a competição entre os iniciadores durante a reação de amplificação [36].

Kidane *et al.* (2002) [21] também realizaram PCR-Multiplex para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em amostras de pacientes com linfadenite tuberculosa, e um dos iniciadores utilizados eram direcionados ao gene *pncA*. Nesse estudo, todos os pacientes infectados por *M. bovis* foram positivos pela PCR-Multiplex com os iniciadores *pncATB*-1.2 e *pncAMB*-2, porém Kidane *et al.* (2002) [21] não utilizaram a PCR-Multiplex diretamente em amostras de escarro, como proposto no presente estudo.

A PCR-Multiplex aplicada para detecção e diferenciação de *M. bovis* diretamente em amostras de escarros obteve uma sensibilidade semelhante à da cultura, mas com as vantagens de ser uma técnica mais rápida (três dias) do que as usualmente utilizadas na rotina laboratorial, não necessita de o microrganismo estar viável na amostra clínica para o cultivo uma vez que utiliza somente o DNA do microrganismo e relativamente barata e simples, pois apenas um tubo de reação é necessário para simultânea detecção e diferenciação das espécies de micobactérias. Embora a cultura seja o padrão ouro para diagnóstico da TB, o cultivo de *M. bovis* necessita de um meio de cultura suplementado com piruvato de sódio que não é usualmente empregado na rotina laboratorial, além da necessidade de um maior período de incubação (dois a três meses) e adição de CO₂ para crescimento do *M. bovis* [12].

Outra vantagem da PCR-Multiplex proposta, além de ser uma técnica sensível e específica, pode ser aplicada diretamente na amostra de escarro, pois a maioria dos estudos que diferenciam micobactérias na amostra clínica, utilizam DNA extraído de isolados clínicos de cultura [7, 13, 27], o que torna a técnica demorada, devido ao crescimento lento das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, e os estudos que utilizam amostras de escarro para a extração de DNA [17, 37, 38], geralmente não fazem a diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis*.

Estes estudos reforçam a utilização dos iniciadores *pncATB*-1.2 e *pncAMB*-2 em PCRs-Multiplex para detecção de DNA de *M. bovis*, porém há dificuldade na comparação da sensibilidade da PCR-Multiplex entre os diferentes estudos, devido a uma variação nos métodos de extração de DNA e variados tipos de amostras clínicas utilizadas [32].

Em conclusão, a PCR-Multiplex proposta oferece vantagens em relação aos métodos convencionais de diagnóstico da TB, pois se mostrou eficaz para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* diretamente na amostra de escarro, além de ser uma técnica rápida, sensível e específica. A PCR-Multiplex proposta é viável de ser aplicada na rotina laboratorial especialmente em regiões onde a TB bovina e humana coexistem permitindo assim a correta diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* para o monitoramento da infecção por *M. bovis* em humanos.

Agradecimentos

Esta pesquisa teve apoio financeiro da Coordenação de Capacitação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Figuras

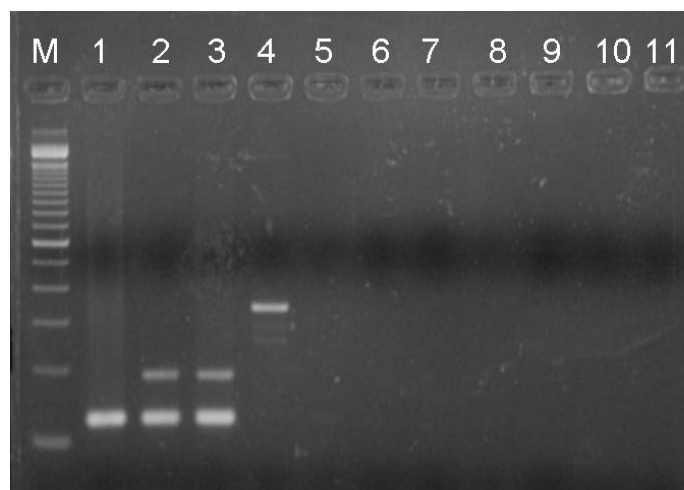


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose. PCR-multiplex com os iniciadores TB1/TB2 e *pncATB-1.2/pncAMB-2*, com DNA das cepas de referência. Linha M: Marcador de peso molecular de DNA (100 pb); Linha 1: *M. tuberculosis* H37Rv; Linha 2: *M. bovis* AN5; Linha 3: *M. bovis* BCG; Linha 4: *M. avium*; Linha 5: *M. kansasii*; Linha 6: *M. abscessus*; Linha 7: *M. chelonae*; Linha 8: *M. massiliense*; Linha 9: *M. szulgai*; Linha 10: *M. fortuitum*; Linha 11: Branco

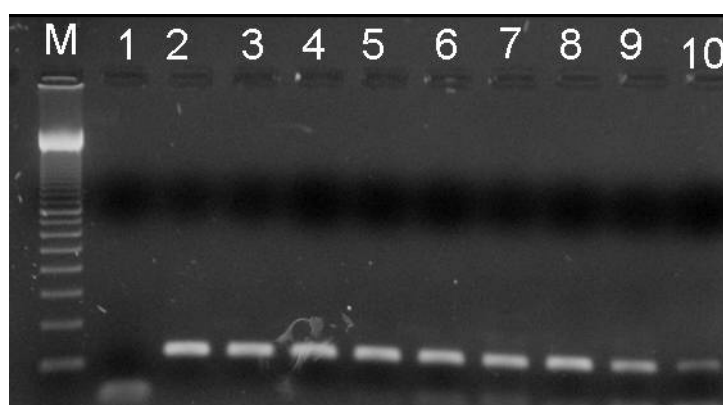


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose. PCR-multiplex com os iniciadores TB1/TB2 e *pncATB-1.2/pncAMB-2*, com diluições de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Linha M: Marcador de peso molecular de DNA (100 pb). Linha 1: Branco; Linhas 2-10 mostram os resultados usando 1µg, 10ng, 1ng, 10pg, 1pg, 10fg, 1fg, 0,1fg, 0,01fg de DNA respectivamente.

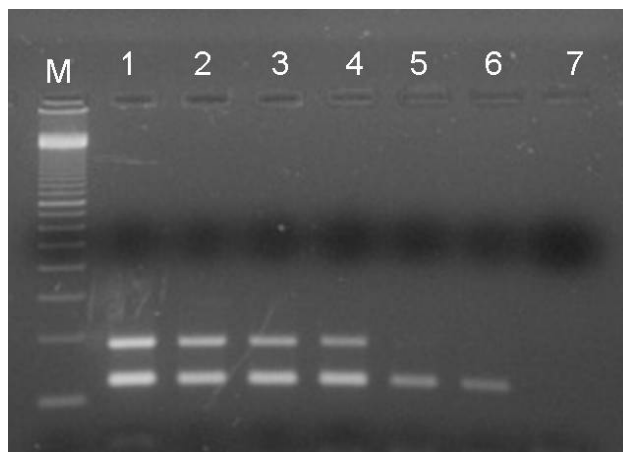


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose. PCR-multiplex com os iniciadores TB1/TB2 e *pncATB-1.2/pncAMB-2*, com diluições de DNA de *M. bovis* AN5. Linha M: Marcador de peso molecular de DNA (100 pb). Linhas 1-7 mostram os resultados usando 1µg, 100ng, 10ng, 1 ng, 100pg, 0,1fg, 0,01 fg de DNA respectivamente.

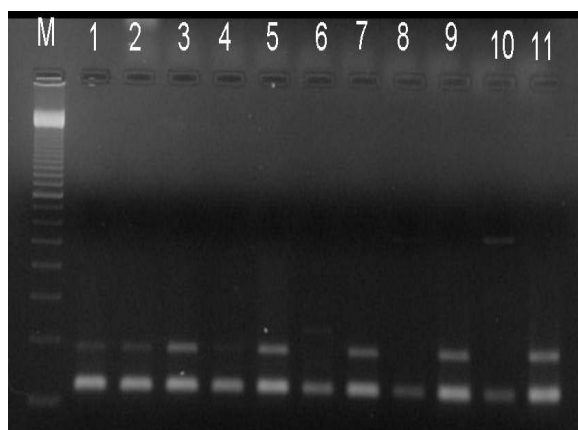


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose. PCR-multiplex com os iniciadores TB1/TB2 e *pncATB-1.2/pncAMB-2*, com DNA de *M. bovis* AN5 extraído de escarros contaminados com concentrações conhecidas do microrganismo. Linha M: Marcador de peso molecular de DNA (100 pb). Linha 1: 50.000 bacilos/mL; Linha 2: 5.000 bacilos/mL; Linha 3: controle de inibidor; Linha 4: 500 bacilos/mL; Linha 5: controle de inibidor; Linha 6: 50 bacilos/mL; Linha 7: controle de inibidor; Linha 8: 5 bacilos/mL; Linha 9: controle de inibidor; Linha 10: 5×10^{-1} bacilos/mL; Linha 11: controle de inibidor.

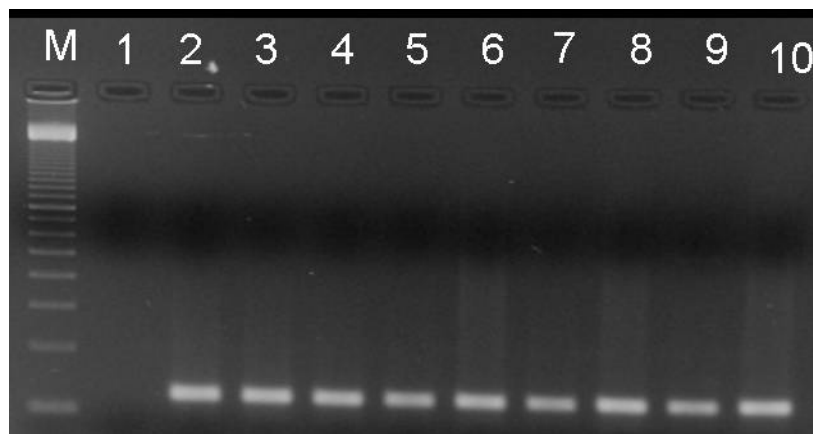


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose. PCR-multiplex com os iniciadores TB1/TB2 e *pncATB-1.2/pncAMB-2*, com DNA de *M. tuberculosis* H37Rv extraído de escarros contaminados com concentrações conhecidas do microrganismo. Linha M: Marcador de peso molecular de DNA (100 pb). Linha 1: Branco; Linha 2: 50.000 bacilos/mL; Linha 3: 5.000 bacilos/mL; Linha 4: 500 bacilos/mL; Linha 5: 50 bacilos/mL; Linha 6: controle de inibidor; Linha 7: 5 bacilos/mL; Linha 8: controle de inibidor; Linha 9: 10^{-4} bacilos/mL; Linha 10: controle de inibidor.

Referências

- 1- OIE, 2009. Bovine Tuberculosis,
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf Acessado em 19 Nov 2009.
- 2- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ et al (1998) Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerg Infect Dis* 4:59-70.
- 3- Grange JM (2001) *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* 81:71–7.
- 4- Leite CQF, Anno IS, Leite SRA, Roxo E, Morlock GP, Cooksey RC (2003) Isolation and identification of *Mycobacteria* from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:319-323.
- 5- Thoen C, Lobue P, Kantor I (2006) The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol* 112:339-345.
- 6- Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA (2008) Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in Binational Communities, United States. *Emerg Infect Dis* 14:909-916.
- 7- Cicero R, Olivera H, Hernández-Solis A, Ramírez-Casanova E, Escobar-Gutiérrez A (2009) Frequency of *Mycobacterium bovis* as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV-positive and -negative Mexican patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:455–460 doi 10.1007/s10096-008-0649-5.
- 8- Brasil (2006) Ministério da Agricultura. Departamento de Defesa Animal (DDA). Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Brasília.
- 9- Abrahão RMCM (1999) Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. *Arch Vet Scienc* 4:5-15.
- 10- World Health Organization (1994) Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) 72:851-857.
- 11- Bollela VR, Sato DN, Fonseca BAL (1999) Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Revista de Saúde Pública* 33:281-286.

- 12- De La Rua-Domenech R (2006) Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86:77–109.
- 13- Shah DH, Verma R, Bakshi CS, Singh RK (2002) A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 214:39-43.
- 14- Bannalikal AS, Verma R (2006) Detection of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of *hsp65* gene and *pncA* PCR. *Indian J Med Res* 123:165-172.
- 15- LoBue PA, Moser KS (2005) Treatment of *Mycobacterium bovis* infected tuberculosis patients: San Diego County, California, United States, 1994–2003. *Int J Tuberc Lung Dis* 9:333–338.
- 16- Flores LL, Pai M, Colford Jr JM, Riley LW (2005) In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression *BMC Microbiol* 5:55 doi:10.1186/1471-2180-5-55
- 17- Pathak D, Chakravorty S, Hanif M, Tyagi J S (2007) Lysis of tubercle bacilli in fresh and stored sputum specimens: implications for diagnosing tuberculosis in stored and paucibacillary specimens by PCR. *BMC Microbiol* 7:83 doi: 10.1186/1471-2180-7-83.
- 18- Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA (2008) Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J Microbiol Met* 75:1-11.
- 19- Van Soolingen D, Hermans PWM, Haas PEW et al (1991) Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29:2578-2586.
- 20- De Los Monteros LEE, Galán JC, Gutiérrez SS, Marín JFG et al (1998) Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intrasppecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J Clin Microbiol* 36:239-242.
- 21- Kidane D, Olobo JO, Habte A, et al (2002) Identification of the Causative Organism of Tuberculous Lymphadenitis in Ethiopia by PCR. *J Clin Microbiol* 40:4230–4234 doi: 10.1128/JCM.40.11.4230–4234.2002

- 22- Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite, CQF, Sato DN, Shikama ML, Mamizuka EM, Hirata RDC, Hirata MH (2004) Screening and characterization of mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antim Agents Chemoth* 48:3373-3381.
- 23- Kent PT, Kubica GP (1985) *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory*. U.S Department of Health and Human Services. CDC. Atlanta, Georgia.
- 24- Eisenach KD, Cave MD; Bates JH, Crawford JT (1990) Polymerase chain reaction of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 161:977-981.
- 25- Ritacco V, Kantor IN (2007) Simultaneous detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in human cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 45:684 doi: 10.1128/JCM.01682-06.
- 26- Niemann S, Richter E, Rüsche-Gerdes S (2000) 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* 38:152-157.
- 27- Pérez-Martínez I, Ponce-de-león A, Bobadilla M, Villegas-Sepúlveda N, Pérez-García M, Sifuentes-Osorio J, González-y-Merchán JA, Estrada-García T (2008) A novel identification scheme for genus *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex, and seven mycobacteria species of human clinical impact. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:451-459.
- 28- Ogusku MM, Salem JI (2004) Análise de diferentes *primers* utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no estado do Amazonas. *J Bras Pneumol* 30:433-439.
- 29- Barouni SA, Augusto CJ, Lopes MTP, Zanini MS, Salas CE (2004) A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes* 18:167–170 doi:10.1016/j.mcp.2003.11.006
- 30- Mignard S, Pichat C, Carret G (2006) *Mycobacterium bovis* Infection, Lyon, France *Emerg Infect Dis* 12:1431-1433.
- 31- Kocagöz T, Yılmaz E, Zkara E et al (1993) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Samples by Polymerase Chain Reaction Using a Simplified Procedure. *J Clin Microbiol* 31:1435-1438.

- 32- Wards BJ, Collins DM, Lisle GW (1995) Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 43:227-240.
- 33- Soo P-C, et al (2009) A simple gold nanoparticle probes assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* complex from clinical specimens. *Molec and Cell Probes* 23:240-246
doi:10.1016/j.mcp.2009.04.006
- 34- Clarridge 3rd JE, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB (1993) Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 31:2049–2056.
- 35- Nolte FS, Metchock B, McGowan JE et al (1993) Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Polymerase Chain Reaction and DNA Hybridization. *J Clin Microbiol* 31:1777-1782.
- 36- Henegariu O PCR and PCR multiplex guide – Topics for PCR optimization (<http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Guide.html>) acessado em 15 Abr 2009.
- 37- Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Noriega AR (1993) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in Clinical Samples by Using a Simple Lysis Method and Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 31:1019-1021.
- 38- Kim BJ et al (2008) Differentiation of mycobacteria in sputa by duplex polymerase chain reaction for mycobacterial *hsp65* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62:193-8
doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.013.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

A PCR-Multiplex mostrou ser um método de diagnóstico rápido, sensível e específico para diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis* diretamente de amostras de escarro, assim como de isolados clínicos.

A correta diferenciação destas espécies de micobactérias permite a escolha apropriada do tratamento antituberculoso, o que é de primeira importância no controle da infecção, o conhecimento da epidemiologia da TB e o controle da infecção.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante da atual situação da TB no mundo fica evidente a necessidade de medidas de controle mais efetivas, tanto para a TB humana quanto para a TB bovina, que levem em consideração a diversidade e as particularidades dos agentes etiológicos da TB, além das limitações das técnicas diagnósticas usualmente utilizadas.

Somado a isto, faz-se necessária a implantação de técnicas rápidas, sensíveis e específicas para o diagnóstico da TB na rotina laboratorial, visando a melhoria do diagnóstico, assim como a qualidade de vida do paciente, que poderá assim iniciar um tratamento direcionado e eficaz da TB.

Para confirmação da técnica de PCR-Multiplex proposta como método de diagnóstico e diferenciação, estudos adicionais com a aplicação da técnica em amostras clínicas de pacientes suspeitos de TB pulmonar são necessários para o aperfeiçoamento metodológico e para conhecimento da incidência e epidemiologia de TB humana causada por *M. bovis* na região de Maringá/PR.