

DETECÇÃO DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* NO LEITE PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE SEGUIDA DE ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO (PRA)

EDUARDO EUSTÁQUIO DE SOUZA FIGUEIREDO,¹ MARLEI GOMES DA SILVA,² LEILA DE SOUZA FONSECA,³ JOAB TRAJANO SILVA⁴ E VÂNIA MARGARET FLOSI PASCHOALIN⁵

1. M.Sc., doutorando do Programa Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro. E-mail: edufigueiredo@ufrj.br – autor correspondente.
2. Especialista., técnico de laboratório, Universidade Federal do Rio de Janeiro
3. D.Sc., professor titular, Universidade Federal do Rio de Janeiro
4. D.Sc., professor adjunto I, Universidade Federal do Rio de Janeiro
5. D.Sc., professor adjunto IV, Universidade Federal do Rio de Janeiro

RESUMO

Mycobacterium bovis é membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), grupo este composto por espécies com grande homologia genética. É o agente etiológico da tuberculose bovina, importante zoonose transmissível ao homem, principalmente através da inalação do bacilo e/ou pelo consumo de leite e derivados não-pasteurizados provenientes de vacas tuberculosas. O objetivo deste estudo foi padronizar a identificação de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* presentes no leite, por metodologia molecular. Fez-se a extração de DNA diretamente do leite contaminado e realizou-se a identificação molecular pela reacção em cadeia da polimerase seguida de análise de restrição do fragmento amplificado (PRA).

Utilizaram-se inagens de referência e leite cru artificialmente contaminado com *M. bovis* IP. Um fragmento de 441pb do gene *hsp65* foi amplificado, tratado com *BstEII* e *HaeIII* e empregou-se o perfil de restrição enzimática obtido para identificar o complexo *M. tuberculosis* no leite. Com a PRA foi possível detectar com especificidade e sensibilidade a presença de *M. bovis* em até 10 UFC/mL de leite. A metodologia padronizada poderá auxiliar os métodos microbiológicos e bioquímicos tradicionalmente usados na identificação do bacilo em alimentos suspeitos de contaminação, como, por exemplo, o leite proveniente de animais suspeitos de infecção por *M. bovis*.

PALAVRAS-CHAVES: Análise de perfil de restrição enzimática (PRA), complexo *Mycobacterium tuberculosis*, leite, *Mycobacterium bovis*, limite de detecção (PCR).

ABSTRACT

DETECTION OF *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX BY PCR-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS OF THE HSP65 GENE

Mycobacterium bovis is a member of the *M. tuberculosis* complex, a group composed by species with high genetic homology. The pathogen is the etiological agent of bovine tuberculosis, an important zoonosis that is mainly transmitted by inhalation of infectious droplet nuclei or by ingestion of milk and crude milk derivative products from tuberculosis cows. The definitive identification of *M. bovis*,

up to species level, is time consuming and difficult. In this work, the objective was to standardize a polymerase chain reaction followed by an enzyme restriction analysis in order to identify the *M. tuberculosis* complex in milk, without a microbiological isolation step. Reference strains and raw milk seeded with *M. Bovis*, were used as the starting material. A 441pb fragment of the *hsp65* gene was amplified

and digested by two restriction enzymes *Bst*EII and *Hae*III. The obtained profile was used to identify the *M. tuberculosis complex* in milk. The minimum limit of detection of *M. bovis* in milk was 10CFU/mL. PRA methodology proved to be

a specific and sensible method. It can be used to assist the microbiological and biochemical methods commonly used to identifying the bacilli in clinical samples, as milk

KEY WORD: Detection limit (PRA), *Mycobacterium tuberculosis complex*, milk *Mycobacterium bovis*, *Restriction Enzyme Analysis* (PCR),

INTRODUÇÃO

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) é composto pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, Bacille Calmette-Guérin (BCG), *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. O *M. tuberculosis* e o *M. bovis* se destacam por serem os agentes causadores da tuberculose humana e bovina, respectivamente. A cepa infectante bovina é a mais perigosa dentre as espécies deste complexo, sendo capaz de infectar muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem (O'REILLY & DABORN, 1995).

A tuberculose bovina é uma zoonose (doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem) transmissível do gado para humanos diretamente pela via aerógena, mediante a inalação do *M. bovis* suspenso no ar, e indiretamente, pelo consumo de leite e de produtos lácteos não fervidos ou pasteurizados, e com menor frequência pela ingestão de carne e produtos cárneos contaminados (WHO, 1993; GRANGE & YATES, 1994).

O controle da tuberculose bovina e os programas de erradicação (baseados no teste de tuberculina e sacrifício dos animais positivos), junto com a pasteurização do leite, diminuíram drasticamente a incidência de tuberculose bovina nos animais e nos humanos, nos países industrializados. Em países onde a prevalência da tuberculose bovina é elevada ou onde os programas de controle e erradicação não existem, ou ainda estão em fase de implantação, o leite e seus derivados não pasteurizados são considerados umas das principais fontes de transmissão da doença (ASHFORD, 2001). Em tais países, o leite contaminado com *M. bovis*, oriundo de vacas doentes, é a principal

causa de linfadenopatias cervicais (escrófula) e de outras formas da tuberculose extrapulmonar em humanos (MODA et al., 1996; COUSIVI et al., 1998).

O teste imunológico indireto de tuberculinização é o método diagnóstico-padrão de escolha para identificar os animais tuberculosos (OIE, 2000) e consiste na avaliação de uma reação de hipersensibilidade tardia deflagrada em animais previamente expostos ao bacilo da tuberculose, provocada em resposta à injeção intradérmica de tuberculina, avaliado após 72 horas. A sensibilidade do teste de tuberculinização varia entre 68%-95%, enquanto sua especificidade foi estimada entre 95%-99%. A sensibilidade pode ser afetada por fatores iatrogênicos (CORREA & CORREA, 1981) tais como desensibilização, imunossupressão pós-parto, intervalo pós-infecção (CORREA & CORREA, 1981), assim como por variação da dose e potência da tuberculina utilizada e da variabilidade na avaliação do edema pelo observador. A especificidade, por sua vez, é influenciada pela sensibilização que pode ocorrer pela exposição do animal a *M. avium*, *M. paratuberculosis* ou por micobactéria do meio ambiente (O'REILLY et al., 1992; MONAGHAN et al., 1994). Essas falhas no diagnóstico de tuberculose bovina provocam resultados falsos-positivos (animais sem doença) e falsos-negativos (animais tuberculosos com resultado da prova negativo). O diagnóstico confirmatório é feito após a morte do animal e requer o isolamento e a identificação de *M. bovis*, um procedimento trabalhoso e demorado, que pode levar até doze semanas (CORNER, 1994).

No Brasil, os índices oficiais de tuberculose bovina são de 1,3% do rebanho nacional infectado, o que representa cerca de 2,5 milhões de animais tuberculosos. Pesquisas recentes confirmam que a infecção se concentra em bovinos

leiteiros, mas principalmente naqueles rebanhos com algum grau de tecnificação, em que as taxas de infecção podem chegar a 15% de rebanhos com pelo menos um animal infectado (BRASIL, 2001). Mesmo nesses rebanhos tecnificados, o leite muitas vezes é distribuído *in natura* para o consumo humano. Estima-se que 50% a 60% do leite produzido no Brasil seja comercializado sem qualquer controle sanitário, impondo risco de transmissão de tuberculose, bem como de outras enfermidades, ao homem, através do consumo de leite e derivados crus (FIGUEIREDO, 2007; RUGGIERO, 2007).

Apesar de não haver estatísticas que quantifiquem as perdas econômicas impostas pela tuberculose bovina no Brasil, tampouco o comprometimento humano, o Ministério da Agricultura lançou em janeiro de 2001 sua campanha de combate a essa enfermidade. O Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) visa combater essas enfermidades, na população bovina e bubalina, diminuindo a incidência e prevalência destas, a fim de minimizar as perdas econômicas e oferecer garantias de inocuidade dos alimentos, considerando tanto a carne como o leite e derivados, ao consumo interno, e aumentar a competitividade dos nossos produtos no mercado internacional.

Segundo SINHA (1994), 31,3% das vacas em lactação, que se apresentam positivas ao teste de tuberculinização, eliminam o bacilo no leite, mas apenas 4% desses animais eliminam *M. bovis* em quantidade capaz de ser mensurada por cultura. Por outro lado, SINHA (1994) e ZANINI et al. (1998) demonstraram que vacas com infecção clínica e subclínica podem excretar de 5×10^2 a 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) de *M. bovis* por mL de leite. Além disso, o leite pode ser contaminado por bacilos exógenos provenientes de equipamentos de ordenha sujos e mal lavados (ABRAHÃO, 2005). Trata-se de discrepância que dramatiza a necessidade de se obter um método rápido, sensível, específico e seguro para identificar o bacilo bovino no leite.

A *Polimerase chain reaction Restriction enzyme Analysis* (PRA) é uma ferramenta molecular que juntamente com a PCR, o seqüenciamento de

DNA (PAI et al., 1997; MCNABB et al., 2004), os métodos de hibridização com sondas de DNA (ELLNER et al., 1988), as análises de perfis de ácidos micólicos (LEITE et al., 1998), a técnica de *microarrays* (FUKUSHIMA et al., 2003), vêm sendo utilizados para identificar de maneira mais precisa e rápida as espécies de micobactérias previamente isoladas.

Vários métodos baseados em PCR para identificação de *M. bovis* (WARDS et al., 1995; ZANINI et al., 1998 e 2001; COLLINS et al., 1991; SREEVATSAN et al., 2000; TAYLOR et al., 2001; ZANINI, et al. 2001; ZUMARRÁGA et al., and PEREZ et al., 2002) já foram descritos baseados na amplificação de diferentes genes tais como: *pncA* (BAROUNI et al., 2004; TRIGUI et al., 2004); *gyrB* (LEÃO et al., 2005), *oxyR* (SREEVATSAN et al., 1996) e *katG* (HAAS, 1997) e na seqüência *RvDIRv2031c* (RODRIGUEZ et al., 1995), a região *IS1081* que tem cinco ou seis cópias em *M. bovis* (WARDS et al., 1995; ZANINI et al., 1998), o gene *aspb70* (COLLINS et al., 1991 e WARDS et al., 1995), *IS6110* (NOLTE et al., 1993; PEREZ et al., 2002; TAYLOR et al., 2001; ZANINI et al., 2001; ZUMARRÁZA et al., 2001 e 2005) e o gene *hsp65* (SREEVATSAN et al., 2000; ZUMARRAGA et al., 2005).

Entretanto, para evitar a presença de possíveis inibidores presentes na amostra clínica que poderiam interferir com a performance da PCR (DE WIT et al., 1990; CLARRIDGE et al., 1993; NOLTE et al., 1993; LIÉBANA et al., 1996; MANGIAPAN et al., 1996), os pesquisadores incluem o isolamento prévio das micobactérias, para só então proceder à extração do DNA e à PCR. Esse procedimento aumenta a sensibilidade do método, mas requer que seja feito um tratamento inicial de descontaminação da amostra com NaOH concentrado (método de Petroff), sendo que cerca de 50 % das amostras clínicas tratadas dessa maneira não apresentam colônias viáveis.

Apesar da vasta utilização da PRA para identificar e caracterizar novas espécies de micobactérias, poucos estudos vêm sendo realizados para analisar a eficiência da PRA na identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em leite e tecidos. No Brasil, ARAÚJO, et al.

(2005) usaram a PRA para identificar a presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em quatro colônias isoladas de carcaças bovinas com lesões de tuberculose não identificados na PCR espécie-específica para *M. bovis* e os isolados foram identificados como pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, confirmando a suspeita de tuberculose. Um estudo semelhante foi realizado por KONUK et al. (2007), que identificaram, por PRA, diversas micobactérias atípicas isoladas de leite cru na Turquia, demonstrando a confiabilidade dessa técnica molecular, em comparação com a identificação bioquímica.

Neste estudo, empregou-se a PRA para analisar e detectar a presença de *M. bovis* em amostras de leite, identificando-o através do perfil de restrição do complexo *M. tuberculosis*. O método utilizado baseia-se na obtenção de amostras de DNA de micobactérias diretamente do leite, sem etapas de isolamento, seguida da amplificação de parte da sequência do gene *hsp65* (altamente conservada entre o gênero *Mycobacterium*) por PCR, e da digestão do fragmento amplificado com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* (TELENTI et al., 1993).

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismos utilizados e meios de cultura

Utilizaram-se três linhagens de referência para padronizar a metodologia: *M. bovis* (Instituto Pasteur - IP, Paris) representando o complexo *M. tuberculosis*, *M. avium* sorotipo 2 ATCC 73950 e *M. fortuitum* ATCC 6841. Mantiveram-se as colônias de *M. avium* e de *M. fortuitum* em meio de cultura Lowenstein-Jensen (LJ), enquanto que a de *M. bovis*, em meio LJ com piruvato de sódio (LJP).

Obtenção das amostras de leite

Escolheram-se vacas negativas ao teste de tuberculinização (não tuberculosas) para coleta de amostras de leite para a padronização do método. Após lavagem do úbere dos animais, foram coletados, assepticamente, cerca de 500 mL de leite, por ordenha manual, descartando-se os primeiros jatos.

Preparação do inóculo de *M. bovis*

Uma alçada contendo células de *M. bovis* IP em fase ativa de crescimento foi ressuspensa em 1mL de água destilada estéril em tubo falcon de 50 mL contendo perólas de vidro. Após agitação vigorosa ajustou-se a turbidez da suspensão a 1 pela escala McFarland, correspondendo a $3,0 \times 10^8$ UFC/mL (COUSINS et al., 1991; KOGAGOZ et al., 1993). Para conferir a concentração das células na suspensão-estoque, diluições seriadas de 1:10 foram preparadas, e inoculou-se 0,1 mL de cada diluição em LJP 0,47% sendo incubados a 37°C por até oito semanas. Empregou-se o número de colônias (UFC) obtidas para ajustar o número de células na suspensão-estoque. Diluições seriadas de 10^0 a 10^8 CFU foram preparadas, centrifugadas e o sedimento inoculado em 1mL de leite para posterior análise.

Extração de DNA de culturas puras

Obteve-se DNA genômico de cada uma das linhagens de *Mycobacterium* pelo método da lise térmica. Células crescidas em meio LP ou LPJ foram ressuspensas em 400µL tampão TET (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA com 1% Triton X-100, pH8,0). Submeteu-se a suspensão celular a três ciclos de choque térmico (dez minutos a 100°C, seguidos por dez minutos a -20°C), centrifugados a 14.000xg por cinco minutos, e utilizaram-se 5µL do sobrenadante como molde de DNA na PCR (SILVA et al., 2001).

Extração do DNA de *M. bovis* em leite artificialmente contaminado

Contaminaram-se artificialmente amostras de leite de vacas sadias (1 mL) com *M. bovis* IP (como descrito anteriormente), sendo utilizadas para a obtenção de moldes de DNA para as reações de PCR. A extração do DNA foi feita de acordo com modificação do método descrito por LEÃO et al. (2004). Resumidamente, centrifugaram-se amostras (1mL) previamente contaminadas a 10.000xg por cinco minutos, sendo descartado o sobrenadante obtido de cada uma delas, e o

sedimento lavado três vezes com tampão TE (100mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH 8,0), res-suspensão em 75µL de TE e 25µL de solução de lisozima (10mg/mL) e incubado por trinta minutos a 37°C. Três µL de proteinase K (20mg/mL), 20 µL de SDS 10% e TE foram adicionados até um volume final de 200 µL, incubados a 65°C por quinze minutos. A suspensão foi tratada com 300 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1v/v), centrifugada a 14.000xg por cinco minutos. Transferiu-se o sobrenadante aquoso para um tubo de microcentrífuga e 30 µL de acetato de sódio 3M pH 4,8, sendo 300 µL de isopropanol gelado adicionados a ele. Obteve-se o DNA por precipitação a -20°C por 18-24h após centrifugação a 14.000xg por quinze minutos. O DNA precipitado foi lavado com 300 µL de etanol a 70% e ressuspenso em 10 µL de água miliQ estéril. Empregaram-se 5 µL da suspensão na reação da PCR.

PCR – Restriction Enzyme Analysis (PRA)

A mistura de reação para PCR continha 5µL do molde de DNA, 50 pmol de oligonucleotídeos purificados e dessalinizados Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT) (Invitrogen) (TELENTI et al., 1993), 2,0mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxirribonucleosídeo trifosfato dNTPs (Pharmacia Biotech) e 2,5 U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen Life Technologies), 5µL do tampão da enzima 5x concentrado pH 8,1, em um volume final de 50µL. Procedeu-se à PCR em termociclador automático (Perkin Elmer Gene Amp PCR system 2400) nas seguintes condições: 95°C por dez minutos, 45 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto a 65°C (anelamento), um minuto a 72°C (extensão), e mais um ciclo de sete minutos a 72°C, para extensão final do fragmento. Os produtos de 441pb 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).

Incubaram-se quinze microlitros do produto de reação de PCR com 5U da enzima *BstEII*

(Bioagency) a 65°C por duas horas e outros 15 µL do produto com a enzima *HaeIII* (Bioagency) a 37°C, também por duas horas.

Identificação do Complexo *M. tuberculosis*

Realizou-se a análise da restrição enzimática em gel de agarose 4% e, com auxílio do padrão de fragmentos de 50pb (PROMEGA), compararam-se os resultados com dendogramas disponíveis na literatura (DEVALLOIS et al., 1997; LEÃO et al., 2004).

RESULTADOS

Identificação do complexo *M. tuberculosis* pela PRA

Para identificar o complexo *M. tuberculosis* (MTBC), foram realizadas PCRs usando os DNAs moldes obtidos das linhagens de referência como o *M. bovis* IP (controle positivo), *M. avium* sorotipo 2 ATCC 73950 e *M. fortuitum* ATCC 6841 (controles negativos), e os *primers* TB11 e TB12 para amplificar o gene *hsp65*, sendo que o fragmento amplificado foi digerido com duas endonucleases, *BstEII* e *HaeIII*.

Como pode ser observado na Figura 1A (raias 1, 2 e 3), ocorreu amplificação de um fragmento de 441bp quando o DNA das três espécies de *Mycobacterium* foi utilizado como molde na reação de PCR.

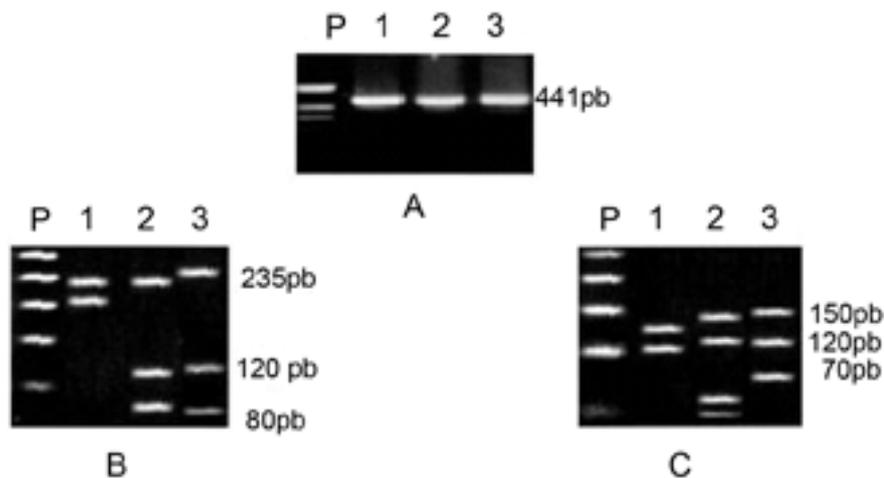
A clivagem do fragmento de 441pb do gene *hsp65* com as endonucleases *BstEII* e *HaeIII* amplificado do complexo *M. tuberculosis* deveria gerar dois conjuntos de fragmentos: (245pb, 120pb, 80pb) e (150pb, 120pb, 70pb), respectivamente (DEVALLOIS et al., 1997; LEÃO et al., 2004).

De fato, quando o fragmento de 441pb amplificado a partir do DNA molde de *M. bovis* foi tratado com as endonucleases *BstEII* e *HaeIII* (Figura 1B e 1C, raias 3) obtiveram-se os perfis de restrição esperados para o complexo *M. tuberculosis* (245pb, 120pb, 80pb) e (150pb, 120pb, 70pb), respectivamente, correspondentes ao complexo *M. tuberculosis*. Quando os amplificados obtidos do DNA de *M. avium* (Figuras 1B e 1C, raias 1) e

de *M. fortuitum* (Figuras 1B e 1C, raias 2) foram tratados com as endonucleases obtiveram-se dois conjuntos de fragmentos (235pb, 210pb) e de (140pb e 105pb) e (235pb, 120pb e 80pb) e de

(145pb, 120, 60pb e 55pb) como esperado para essas duas espécies (DEVALLOIS et al., 1997; LEÃO et al., 2004).

FIGURA 1. Identificação do complexo *M. tuberculosis* por PRA: PAINEL A – DNA obtido de três diferentes *Mycobacterium* sp. por lise térmica, amplificado com os oligonucleotídeos TB11 e TB12; fragmentos amplificados e visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. linha P: padrão de tamanho de fragmento 100pb (PROMEGA); linha 1, *M. avium* sorotipo 2 ATCC 73950 ; linha 2, *M. fortuitum* ATCC 6841; linha 3, *M. bovis* IP. 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*, *M. fortuitum* e *M. bovis*, respectivamente. PAINEL C – O perfil de bandas obtidos após digestão com a enzima *HaeIII* para os mesmos microrganismos.



Detecção pela PRA de *M. bovis* em leite artificialmente contaminado

Para verificar se seria possível identificar, por PRA, micobactérias do complexo *M. tuberculosis* que eventualmente seriam excretadas no leite de vacas tuberculosas, procedeu-se a uma adaptação da metodologia, como descrito antes, contaminando-se artificialmente amostras de leite cru com *M. bovis* IP em diferentes concentrações ($10^0 - 10^8$ UFC/mL de leite).

Preparou-se o DNA a partir de 1mL das amostras de leite contaminado, mediante método de extração com lizozima-SDS, anteriormente utilizado como molde de DNA nas reações de PCR para amplificação da seqüência do gene *hsp65*. O produto amplificado foi tratado com as endonucleases *BstEII* e *HaeIII* e os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4%.

Como mostrado na Figura 2A, foi possível obter DNA amplificável de micobactérias presen-

tes no leite sem a necessidade de isolar tais microrganismos. Como esperado, quando o amplificado de 441bp foi digerido com as endonucleases *BstEII* e *HaeIII* (Figura 2B raias: a - h e i - o), obteve-se o perfil de fragmentos de restrição (245pb, 120pb, 80pb; 150pb, 120pb, 70pb) correspondente a *M. bovis*. Além disso, estabeleceu-se que o limite mínimo de detecção de *M. bovis* com essa metodologia foi de 10 UFC/mL de leite (Figura 2A raia 8).

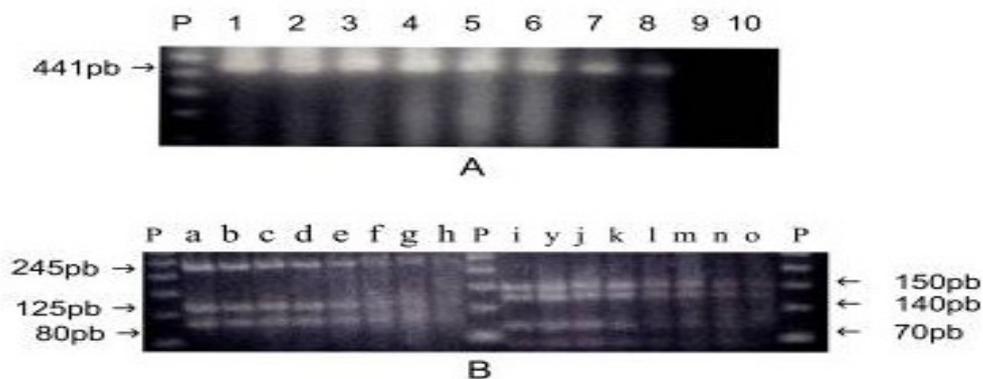
A PRA otimizada neste estudo é um método específico, sensível e rápido, que permitiu detectar membros do complexo *M. tuberculosis* no leite, sem a necessidade de fazer o isolamento de microrganismos.

Tanto a extração de DNA de micobactérias diretamente do leite quanto a amplificação desses moldes de DNA foram bem-sucedidos. O método utilizado neste estudo para isolar DNA das micobactérias contaminantes do leite permitiu extrair o DNA de micobactérias mesmo na presença de

minerais, proteínas, glóbulos de gordura e células epiteliais do hospedeiro presentes no leite, os quais poderiam reduzir a quantidade de DNA total passí-

vel de extração, ou ainda inibir a amplificação do DNA molde por inibição da DNA polimerase.

FIGURA 2. Limite de detecção de *M. bovis* em leite artificialmente contaminado. PAINEL A – 1 mL de leite cru, artificialmente contaminado com diluições de *M. bovis* 10⁸ a 10⁰ UFC/mL. DNA extraído pelo método de lisozima-SDS, amplificado e visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.



Linha P: padrão de tamanho de fragmento 100pb (PROMEGA); linha 1, 10⁸ UFC/mL; linha 2, 10⁷ UFC/mL; linha 3, 10⁶ UFC/mL; linha 4, 10⁵ UFC/mL; linha 5, 10⁴ UFC/mL; linha 6, 10³ UFC/m; linha 7, 10² UFC/mL; linha 8, 10¹ UFC/mL e linha 9, 10⁰ UFC/mL; linha 10, controle negativo (leite sem contaminação). PAINEL B – Análise dos fragmentos de digestão enzimática por eletroforese em gel de agarose 4% nas concentrações de 10⁸ a 10¹ UFC/mL: Linha P: padrão de tamanho de fragmento 50pb (Promega); Linhas a–h digestão com a enzima *Bst*EII (245pb, 125pb, 80pb) e linhas i–o com a enzima *Hae*III (150pb, 140pb, 70pb).

DISCUSSÃO

O método de diagnóstico mais confiável para doenças transmitidas por microorganismos é, sem dúvida, o isolamento e identificação do agente etiológico a partir de lesões oriundas dos animais doentes. No entanto, em tuberculose bovina, embora a cultura bacteriológica ainda represente o padrão-ouro de diagnóstico, a dificuldade de obtenção de amostras, a escassez de *M. bovis* nas secreções bovinas e o tempo necessário para se obter os resultados que muitas vezes podem resultar em falsos negativos (DUFFIELD et al., 1989), tornam pouco viável sua utilização rotineira. Em virtude da inexistência de eficientes métodos de diagnóstico direto que possam ser utilizados na análise de um grande número de amostras, alguns estudos vêm sendo feitos com o intuito de desenvolver métodos moleculares para detectar de forma direta a presença do *M. bovis* em amostras clínicas e assim identificar, de for-

ma mais precisa, animais e produtos de origem animal contaminados.

ROMERO et al. (1999), comparando a técnica de PCR com os testes de cultura e tuberculização, concluíram que o método molecular é mais específico e sensível para detectar infecções associadas com *M. bovis* em sangue, leite e muco nasal. A performance da PCR também já foi comparada com a necropsia e encontrou-se uma correlação de 100% com os testes em amostras de linfonodos (VITALE et al., 1998). A técnica de PCR foi também utilizada com sucesso na detecção de *M. bovis* em amostras de tecido (WARDS et al., 1995), mesmo quando embebidos em parafina (MILLER et al., 2002).

A identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras clínicas de bovinos tuberculosos é importante para os procedimentos veterinários, pois pode indicar a presença de *M. bovis* ou alguma outra espécie desse complexo capaz de causar doença ao homem. Entretanto, a diferenciação

entre as espécies do complexo *M. tuberculosis* não se faz necessária na maior parte dos procedimentos veterinários (COLLINS et al., 1994), uma vez que o *M. bovis* é o agente etiológico da tuberculose bovina, e a identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras clínicas se referirá à presença do bacilo bovino. A identificação do complexo em leite indica a presença de agente infeccioso capaz de causar doença (tuberculose extrapulmonar) ao homem.

Neste estudo, demonstrou-se experimentalmente que a análise de leite por PRA é uma técnica sensível, específica, de rápida execução e permite detectar e identificar a presença do *M. bovis* através do perfil característico dos fragmentos de restrição das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, mesmo quando presentes em concentrações muito baixas. Além disso, como demonstrado, não houve a necessidade de isolamento prévio dos microrganismos a serem analisados. O método de extração de DNA de micobactérias foi aplicado diretamente no leite, tendo sido obtidos moldes de DNA capazes de serem amplificados pela PCR.

Tais resultados mostram que é possível identificar *M. bovis* diretamente a partir de uma matriz complexa como o leite, tornando o processo de identificação rápido e eficiente. Isso porque se trata de método que não depende do procedimento de descontaminação da amostra, já que este, em até 50% dos casos, não é bem-sucedido. Além disso, com a metodologia de extração de DNA utilizada – barata e de fácil execução –, foi possível obter uma boa sensibilidade do método de PCR. Tais características são importantes na popularização da metodologia molecular para identificação de *Mycobacterium*.

CONCLUSÃO

A PRA padronizada para analisar leite permitiu a detecção de *M. bovis* em uma concentração mínima de 10 UFC/mL, em um dia de trabalho. Diante dos resultados apresentados, trata-se de técnica que permite auxiliar e/ou tornar-se uma alternativa aos trabalhosos e demorados métodos microbiológicos e bioquímicos de identificação

de *M. bovis*, durante estudos epidemiológicos, principalmente em regiões consideradas de alto risco de transmissão.

Esta técnica, empregada e otimizada em laboratório para identificar a presença *M. bovis* em leite proveniente de vacas PPD+, representa uma contribuição aos esforços feitos para a erradicação da tuberculose bovina no país.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ARAÚJO, C. P.; LEITE, C. Q. F.; PRINCE, K. A.; JORGE, K. S. G.; OSÓRIO, A. L. A. R. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 749-752, 2005.

ASHFORD, D. A.; WHITNEY, E.; RAGHUNATHAN, P.; COSIVI, O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics), v. 20, n. 1, p. 325-337, 2001.

BAROUNI, A. S.; AUGUSTO, C. J.; LOPES, M. T. P.; ZANINI, M. S.; SALAS, C. E. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 167-170, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose – PNCEBT, 2001. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 4 mar. 2008.

CLARRIDGE, J. E.; SHAWAR, R. M.; SHINNICK, T. M.; PLIKAYTIS, B. B. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2049-56, 1993.

COLLINS, D. M.; RADFORD, A. J.; LISLE, G. W.; BILLMAN, J. H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 83-94, 1994.

COLLINS, D. M.; STEPHENS, D. M. Identification of an

- insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 67, p. 11-15, 1991.
- CORNER, L. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 53-63, 1994.
- CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: Varela, 1981.
- 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.
- COUSIVI, O.; GRANGE, J.M.; DABORN, C.J.; RAVIGLIONE, M.C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R.A.; HUCHZERMEYER, H.F.; AK, D.E.; KANTOR, I.; MESLIN, F.X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 59-70, 1998.
- DE WIT, D.; STEYN, L.; SHOEMAKER, S.; SOGIN, M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n.11, p. 2437-2441, 1990.
- DEVALLOIS, A.; GOH, K. S.; RASTOGI, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2969-2973, 1997.
- DUFFIELD, B. J.; NORTON, J. H.; HOFFMAN, D. An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic mycobacteria from cattle in Northern Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, p. 307-330, 1989.
- ELLNER, P. D.; KIEHN, T. E.; CAMMARATA, R. & HOSMER, M. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 1349-1352, 1988.
- FIGUEIREDO, E.E.S.; GOLINELLI, L.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. *Mycobacterium bovis* e o Risco da transmissão da tuberculose bovina ao homem através do leite: um problema de saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, p. 33-39, 2007.
- FUKUSHIMA, M.; KAKINUMA, K.; HAYASHI, H.; NAGAI, H.; ITO, K.; KAWAGUSHI, R. Detection and Identification of *Mycobacterium* Species Isolates by DNA Microarray. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2605-2615, 2003.
- GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 137-51, 1994.
- HAAS, W.H.; SCHILKE, K.; BRAND, J.; AMTHOR B.; WEYER, K.; FOURIE, P.B.; BRETZEL, G.; STICHT-GROH, V.; BREMER, H.J. Molecular analysis of katG gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 7, p. 1601-3, 1997.
- KOCAGOZ, T.; YILMAZ, E.; OZKARA, S.; KOCAGOZ, S.; HAYRAN, M.; SACHEDEVA, M.; CHAMBERS, H. F. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1435-1438, 1993.
- KONUK, M.; KORCAN, E.; DÜLGERBAKI, S.; ALTINDIS M. Isolation and identification of mycobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 343-347, 2007.
- LEÃO, S.; MARTIN, A.; MEJIA, G. I.; PALOMINO, J. C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M. A. S.; PORTAELES, F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**, 2004, 164 p.
- LEÃO, S.C.; BERNARDELLI, A.; CATALDI, A.; ZUMARRAGA, M.; ROBLEDO, J.; REALPE, T.; MEJÍA, G. I.; DA SILVA, M. A.; CHIMARA, E.; VELAZCO, FERNANDEZ, M. J., RODRIGUES, P.; GUERRERO, M., LEO'N, C.; PORRAS, T.; RASTOGI N.; K. SENG GOH, SUFFYS, P.; DA SILVA ROCHA, A., D.; SANTOS NETTO, RITACCO, V.; BEATRIZ LO'PEZK, LUCIA BARRERAK; PALOMINOL, J. C.; MARTIN, A.; PORTAELS, F. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. **Journal of Microbiological Methods**, v. 61, p. 193-199, 2005.
- LEITE, C.Q.; DE SOUZA, C.W.; LEITE, S.R. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 801-805, 1998.
- LIEBANA, E.; ARANAZ, A.; FRANCIS, B.; COUSINS, D.;

Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 933-938, 1996.

MANGIAPAN, G.; VOKURKA, M.; SCHOULS, L.; CADRANEL, J.; LECOSSIER, D.; VAN EMBDEN, J.; HANCE, A.J. Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1209-15, 1996.

McNABB, A.; EISLER, D.; ADIE, K.; RAMOS, M.; RODRIGUES, M.; STEPHENS, J.; BLAK, W. A.; ISAAC-RENTON, J. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene (*hsp65*) for Routine Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Clinical Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3000-3011, 2004.

MILLER, J. M. ; JENNY, A.L. ; PAYEUR, J.B. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 15-23, 2002.

MODA, G.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M.; COSIVI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tubercle Lung Dis**, v. 77, p. 103-108, 1996.

MONAGHAN, M. L.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, J. D.; KAZDA, J. F.; QUINN, P. J.; The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 111-124, 1994.

NOLTE, F.S.; METCHOCK, B.; MCGOWAN, J.E.; EDWARDS, A.; OKWUMABUA, O.; THURMOND, C.; MITCHELL, P.S.; PLIKAYTIS, B.; SHINNICK, T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1777-82, 1993.

O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, p. 1-46, 1995.

O'REILLY, L.M. Specificity and sensitivity of tuberculin test. In: MOUSA, A.A.M.; LOTFI, O.; MAHAIR, S. et al. (Ed.). **Proceedings of the International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and the Middle East**. General Organization for Veterinary Services, Cairo, Egypt, 1992. p. 83-139.

OIE. ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL EPIZOITIAS. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. 2000. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00050.htm> Acesso em: 15 jul. 2006.

PAI, S.; ESEN, N.; PAN, X.; MUSSER, J.M. Routine rapid *Mycobacterium* species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*). **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 121, p. 859-864, 1997.

PEREZ, A.; RENIERO, A.; FORTEIS, A. et al. Study of *Mycobacterium bovis* in milk using bacteriological methods and polymerase chain reaction. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 34, p. 45-51, 2002.

RODRIGUEZ, J. G.; MEJIA, G. A.; PORTILLO, P. D.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, v. 141, p. 2131-2138, 1995.

ROMERO, R. E.; GARZON, D. L.; MEIJIA, G. A.; MONROY, W.; MURILO, P. 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.

RUGGIERO A.P.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A.; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, jan.-mar., 2007.

SILVA, C. F.; UEKI, M. S.Y.; GEIGER, P. D. C.; LEÃO, S. C. Hsp65 PCR-Restriction Enzyme Analysis (PRA) for identification of Mycobacteria in the clinical laboratory. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 25-28, 2001.

SINHA, R.N. **The significance of pathogenic microorganisms in raw milk**. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 1964. p. 117-167.

SREEVATSAN, S.; BOOKOUT, J. B.; RINGPIS, F.; PERUMAALLA, V. S.; FICHT, T. A.; ADAMS, L. G.; HAGIUS, S. D.; ELZER, P.H.; BRICKER, B.J.; KUMAR, G.K.; RAJASEKHAR, M.; ISLOOR, S.; BARATHUR R.R. A multiplex approach: to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2602-2610, 2000.

SREEVATSAN, S.; ESCALANTE, P.; PAN, X.; GILLIES, D.A.; SIDDIQUI, S.; KHALAF, C.N.; KREISWIRTH, B.N.; BIFANI, P.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.; PERUMAALLA, V.S.; CAVE, M.D.; VAN EMBDEN, J.D.; MUSSER, J.M. Identification of a polymorphic nucleotide in oxyR specific for *Mycobacterium bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 2007-10, 1996.

TAYLOR, M.I.; HUGHES M.S.; SKUCE R.A. Detection

of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1272-1278, 2001.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M. et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 175-178, 1993.

TRIGUI, M.; PULVIN, S.; TRUFFAUT, N.; THOMAS, D.; POUPIN, P. Molecular cloning, nucleotide sequencing and expression of genes encoding a cytochrome P450 system involved in secondary amine utilization in *Mycobacterium* sp. strain RP1. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 1-9, 2004.

VITALE, F.; CAPRA, G.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1050-1055, 1998.

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.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the Who meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) with the participation of FAO**. Geneva, 1993.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T., et al. *Mycobacterium bovis* polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and RFLP. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 809-813, 2001.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T.; MOTA, P.; SALAS, C. E. Detection of *Mycobacterium bovis* in Milk by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 45, p. 473-479, 1998.

ZUMARRAGA, M. J.; MEIKLE, V.; BERNARDELLI, A.; ABDALA, A.; TARABLA, H.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 32-238, 2005.

ZUMARRAGA, M. J.; PAOLICCHI, F.; GARBACCIO S.; et al. Aplicación de la PCR en la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejidos de terneros. **Veterinaria Argentina**, v. 179, p. 669-677, 2001.

Protocolado em: 18 jul.2007. Aceito em: 30 mar. 2008.