

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO DE *NESTED* PCR PARA A
DETECÇÃO DE DNA DE MEMBROS DO COMPLEXO
Mycobacterium tuberculosis
EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS**

Cristina Pires de Araújo

Campo Grande, MS
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO DE *NESTED* PCR PARA A
DETECÇÃO DE DNA DE MEMBROS DO COMPLEXO
Mycobacterium tuberculosis
EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS**

Development of a nested PCR to detect DNA of members of the
Mycobacterium tuberculosis complex in tissues of cattle and buffaloes

Cristina Pires de Araújo

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo

Tese apresentada à Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Doutor em Ciência
Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

Campo Grande, MS 2014

Certificado de aprovação

CRISTINA PIRES DE ARAUJO

Desenvolvimento de nested PCR para a detecção de DNA de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de bovinos e bubalinos

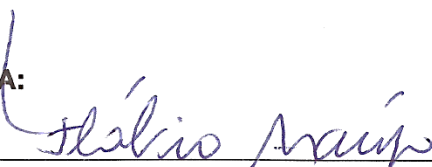
Development of a nested PCR to detect DNA of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in tissues of cattle and buffaloes

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

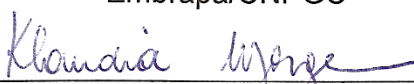
Aprovado (a) em: 20/02/2014

BANCA EXAMINADORA:


Doutor Flávio Ribeiro de Araújo
(Embrapa) - (Orientador)


Doutor Walter Lilenbaum
UFF


Doutor Carlos Alberto do Nascimento Ramos
Embrapa/CNPGC


Doutora Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge
UFMS


Doutora Ana Luiza Alves Rosa Osório
UFMS

Para minha linda família bípede e quadrúpede

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo.

À Profa.Dra. Ana Luíza Alves Rosa Osório.

Ao Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos.

À Dra. Kláudia dos Santos Gonçalves Jorge.

Ao Antonio Francisco de Souza Filho.

Às “irmãs” de laboratório (Elaine, Ana Beatriz, Ingrid e Letícia).

A todos os colegas e funcionários da Embrapa Gado de Corte.

À Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal - IAGRO.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Acredite que você pode, assim você já está no meio do caminho.
Theodore Roosevelt

Resumo

ARAÚJO, C.P. Desenvolvimento de *nested* PCR para a detecção de DNA de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de bovinos e bubalinos. 2014. 58f. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

A tuberculose bovina causada por *Mycobacterium bovis*, um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), é uma enfermidade crônica que acomete, além dos bovinos e bubalinos, também animais silvestres e o homem. A enfermidade é endêmica no Brasil, e seu controle se tornou alvo de exigências sanitárias internacionais. Atualmente vários sistemas de diagnóstico molecular, especialmente aqueles baseados na tecnologia de PCR em tempo real, têm sido desenvolvidos por serem mais rápidos e apresentarem maiores possibilidades de automação. Técnicas de PCR em tempo real aplicadas diretamente a tecidos ainda são pouco exploradas e na maioria dos casos as reações carecem de validação. O objetivo deste trabalho foi desenvolver duas *nested* PCR a partir de PCR convencional seguida de PCR em tempo real para identificar bactérias do CMT e *M. bovis* em tecidos de bovinos e bubalinos. No primeiro estudo, a *nested* PCR baseada no alvo *rv2807* apresentou 100% de especificidade analítica para CMT quando testada com DNA de cepas de referência de micobactérias não-tuberculosas estreitamente relacionadas com Actinomycetales. A sensibilidade clínica da *nested* PCR foi de 76,7% detectada com tecidos de amostras positivas para CMT (confirmadas por PCR convencional de colônias). Evidenciou-se especificidade clínica de 100% com DNA de amostras de tecidos de bovinos, com resultados negativos no teste cervical comparativo (TCC). No segundo estudo uma *nested* PCR tendo como alvo a região *TbD1* alcançou sensibilidade clínica de 76,0% em amostras de tecido de animais que apresentavam resultados positivos em TCC, assim como daqueles com lesões compatíveis com tuberculose (LCT), que apresentaram culturas positivas. Detectou-se especificidade clínica de 100% em amostras de tecido de animais com resultados negativos no TCC, sem lesões visíveis (SLV) e com cultura negativa. Não foram encontradas diferenças significativas entre *nested* PCR e cultura para detectar animais positivos ao TCC com LCT ou SLV. A utilização dos ensaios de *nested* PCR para detectar CMT e *M. bovis* em homogeneizados de tecidos permitiu rápido diagnóstico da tuberculose bovina e bubalina.

Palavras-chave: tuberculose bovina; *nested* PCR; *M. bovis*

Abstract

ARAÚJO, C.P. Development of a nested PCR to detect DNA of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in tissues of cattle and buffaloes. 2014. 58f. Doctoral dissertation – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil, 2014.

Bovine tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), is a chronic disease that affects not only cattle and buffaloes, but also humans and wild animals. The disease is endemic to Brazil, but its control has become the focus of international sanitary requirements. Several molecular diagnostic systems have been developed, particularly those based on real-time PCR, given their faster results and higher potential for automation. However, real-time PCR techniques performed directly from tissues remain largely unexplored, and in most cases have not been validated. The purpose of this investigation was to develop nested PCR approaches using conventional PCR followed by real-time PCR to identify MTC bacteria and *M. bovis* in cattle and buffalo tissues. In a first study, nested PCR based on target *rv2807* exhibited 100% analytical specificity for MTC when tested with DNA from reference strains of non-tuberculous mycobacteria closely related to Actinomycetales. Clinical sensitivity was 76.7% for tissue samples positive for MTC (as validated by conventional colony PCR). Clinical specificity of 100% was observed for DNA from cattle tissue samples negative on comparative cervical intradermal tuberculin test (CITT). In a second study, nested PCR using target *TbD1* achieved 76.0% clinical sensitivity on tissue samples from CITT positive animals, as well as from culture positive animals with tuberculosis compatible lesions (TCLs). Clinical specificity of 100% was found for tissue samples from CITT negative, culture-negative animals with non-visible lesions (NVLs). No significant differences between nested PCR and culture were found in the detection of CITT positive animals with TCLs or NVLs. The use of nested PCR to detect MTC organisms and *M. bovis* in tissue homogenates ensured rapid diagnosis of bovine and buffalo tuberculosis.

Keywords: bovine tuberculosis; nested PCR; *M. bovis*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	11
3 OBJETIVOS.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
ARTIGO 1 DETECÇÃO DIRETA DO COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS POR NESTED PCR.....	18
ARTIGO 2 DETECÇÃO DIRETA DE <i>Mycobacterium bovis</i> EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS COM NESTED PCR PARA TbD1.....	38

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa crônica, causada por *Mycobacterium bovis*, que afeta além dos bovinos, bubalinos, animais domésticos e algumas espécies de silvestres. A transmissão para os seres humanos constitui um problema de saúde pública (MEDEIROS et al., 2010; STEWART et al., 2013).

As espécies causadoras da tuberculose em mamíferos fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), um grupo de micobactérias intimamente relacionadas, constituído por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii* (BROSCH et al., 2002), *M. caprae* (ARANAZ et al., 2003), *M. pinnipedii* (COUSINS et al., 2003), *M. mungi* (ALEXANDER et al., 2010), *Mycobacterium orygis* (VAN INGEN et al., 2012).

A doença causa danos substanciais para o setor pecuário e ocorre principalmente em países em desenvolvimento (COSTA et al., 2013). Nestes países a sua prevalência é maior e o conhecimento do problema é limitado.

Atualmente com o controle mundial da febre aftosa acredita-se que a tuberculose e a brucelose bovina sejam as próximas doenças a serem consideradas barreiras sanitárias internacionais. Este fato é comprovado pela restrição imposta pela União Aduaneira onde propriedades com animais positivos não podem ser comercializados para este mercado (BRASIL, 2012).

O programa de controle e erradicação da tuberculose bovina e bubalina implantado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) teve início em 2001 e estudos sobre a prevalência atual de tuberculose bovina estão sendo executados (BRASIL, 2006).

Uma das dificuldades encontradas nos programas de controle é o longo tempo para o diagnóstico definitivo para tuberculose. Lesões encontradas em frigoríficos demandam diagnóstico rápido, o que não é possível com o método atualmente preconizado pelo MAPA (cultura). A disponibilidade de testes confirmatórios que permitam detectar rapidamente a presença de micobactérias tuberculosas em tecidos de animais suspeitos seria uma grande vantagem para melhorar a eficiência dos programas de erradicação da tuberculose bovina e assim diminuir os custos econômicos associados (COSTA et al., 2013).

Abordagens moleculares como PCR e PCR tempo real são mais rápidas e confiáveis e assim permitem maior agilidade na tomada de decisões. Tais técnicas

apresentam melhorias na especificidade, sensibilidade, limite de detecção e redução no tempo de diagnóstico quando comparado com a cultura (FURLANETTO et al., 2012). Embora muitos sistemas de PCR e PCR tempo real já tenham sido descritas para detectar tuberculose de amostras biológicas humanas, o diagnóstico direto de tecidos animais ainda é pouco explorado (COSTA et al., 2013).

Vários pesquisadores que, utilizaram homogeneizados de tecido, aplicaram em sua maioria iniciadores para a região IS6110 (*insertion sequence*) que embora presente em várias cópias no genoma de bactérias do CMT também está presente em micobactérias ambientais (COROS et al., 2008; COSTA et al., 2013) o que pode confundir o diagnóstico correto. Face a estes estudos, sobre a identificação direta do agente da tuberculose em tecidos, percebe-se que existe demanda por testes que explorem novos genes alvo e possam diagnosticar amostras paucibacilares.

Genes como *rv2807*, presente em bactérias do CMT, a região TbD1, presente em *Mycobacterium bovis* e cepas ancestrais de *Mycobacterium tuberculosis*, podem ser promissores quando aplicados em técnicas de *nested* PCR se comparados com métodos tradicionais utilizados no diagnóstico da tuberculose bovina e podem proporcionar ainda uma redução significativa no tempo de confirmação da presença do agente em homogeneizados de tecidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diagnóstico Molecular

Métodos moleculares para diagnóstico de tuberculose bovina em tecidos têm sido usados em aplicações de investigação em alguns países (FURLANETTO et al., 2012), mas sem impacto significativo sobre os procedimentos de diagnóstico em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil.

O interesse pelos métodos moleculares tem se intensificado devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da tuberculose em animais, principalmente pelas limitações quanto à sensibilidade e especificidade do teste de reação cutânea e o longo período para a confirmação da presença do agente etiológico pelos métodos bacteriológicos de rotina (COSTA et al., 2013).

Para a utilização das técnicas moleculares como PCR e PCR tempo real vários oligonucleotídeos têm sido desenhados com o objetivo de diagnosticar

bactérias do CMT, como por exemplo, os iniciadores que amplificam segmentos do elemento IS6110 (EISENACH et al., 1990; HERMANS et al., 1990).

O desenvolvimento de um fragmento genômico espécie-específico para *M. bovis* foi idealizado em 1995 por Rodriguez e colaboradores, com um produto final de 500 pares de base, contido na região RvD1Rv2031c, JB-21 e JB-22 (RODRIGUEZ et al., 1995). Em estudos posteriores, RODRIGUEZ et al. (1999), ao ampliarem a amostragem, observaram que algumas amostras da espécie estreitamente relacionada, *M. tuberculosis*, também apresentam uma banda de 500 pares de bases, quando submetidas a amplificação por PCR, o que não diminui o potencial do ensaio, indicando a presença do agente infeccioso a partir do CMT.

Apesar dos avanços significativos no desenvolvimento de novos ensaios de diagnóstico molecular com identificação mais rápida e precisa do CMT em amostras humanas, apenas alguns ensaios foram descritos para detecção de CMT em homogeneizados de tecidos de bovinos (TRACKER et al., 2011; COSTA et al., 2013).

Em um dos primeiros estudos com tecidos, Wards; Collins; De Lisle (1995) testaram 110 amostras de tecidos animais submetidos a isolamento em cultura, com diferentes técnicas de extração de DNA e PCR com iniciadores para o gene que codifica a proteína MPB70 e em sequência com IS1081. A PCR identificou 53 positivos em 58 tecidos que apresentaram cultura positiva.

Com o advento da PCR em tempo real (ou *quantitative* PCR - qPCR) a qual permite a detecção e visualização em tempo real da amplificação de fragmentos de DNA a cada ciclo, mediante o uso de marcadores fluorescentes, Taylor et al. (2001) avaliaram 38 amostras de tecidos bovinos com lesões compatíveis de tuberculose e encontraram 93% de sensibilidade, quando comparado com cultura, além da redução significativa do tempo de diagnóstico, cerca de 9 horas, a cultura levaria em média 90 dias.

Em uma pesquisa, comparando-se os métodos de cultivo e PCR com 109 amostras de tecido bovino (com lesão visível), 98 (89,9%) foram positivas na cultura e destas, 69 (70%) positivas na PCR tendo como alvo IS1081. Em outras 95 amostras de tecido bovino com lesão visível, 86 foram positivos em cultivo, e destas amostras o diagnóstico por PCR detectou 78 (90%) resultados positivos. Os autores relatam a dificuldade em extrair DNA de *M. bovis* de tecidos e quando aplicaram

modificações no método de extração a técnica se mostrou mais sensível 90% (TAYLOR et al., 2007).

Parra et al. (2008) testaram dois métodos diferentes de extração de DNA (manual e mecanizada) de 125 amostras de tecido bovino (TCC+) utilizando qPCR com iniciadores para a região 16S-23S rDNA e encontraram alta especificidade e sensibilidade maior para a extração manual. A sensibilidade variou de 61,11% para as amostras sem lesões visíveis a 80,64% para lesões crônicas, com sensibilidade média de 73,87% quando se utiliza o sistema de extração manual e 47,74% quando utilizou-se o modelo mecanizado. Mas neste estudo, os autores não encontraram amplificação (por PCR) em amostras sem lesões visíveis e negativas em cultura.

Em estudo utilizando PCR multiplex com oligonucleotídeos direcionados para as sequências genômicas RvD1Rv2031c e IS6110, específicas para *M. bovis* e complexo *Mycobacterium tuberculosis* (respectivamente), de colônias isoladas a partir de lesões sugestivas de tuberculose bovina, 88,24% das colônias foram identificadas como *M. bovis* (FIGUEIREDO et al., 2009).

Ao avaliar 30 homogeneizados de tecido bovino, previamente identificados como *M. bovis* em cultura, Thacker et al. (2011) identificaram 20/30 (66,6%) amostras positivas para *M. bovis* com iniciadores para IS6110 e IS6110_T (este último desenhados pelos autores). Com a técnica utilizada não houve amplificação em 18 controles negativos. Neste estudo qPCR teve uma menor sensibilidade quando comparada com a cultura, mas o número limitado de amostras é um fator a ser considerado.

Furlanetto et al. (2012) utilizaram métodos complementares de diagnóstico (histopatológicos, bacteriológicos e moleculares) em amostras de tecido 198 bovinos com lesões suspeitas de tuberculose, observadas em frigoríficos. *M. bovis* foi isolado em três amostras (1,5%) e quando utilizaram um sistema de PCR multiplex, direcionados para as sequências genômicas RvD1Rv2031c e IS6110, detectou-se a presença desta bactéria em 14/198 amostras (7%), incluindo as três amostras positivas no cultivo.

Em uma pesquisa buscando concentrar e isolar (por separação imunomagnética com anticorpos monoclonais) *M. bovis* antes do cultivo e PCR com IS6110 em 280 linfonodos de bovinos (206 com lesões e 74 sem lesões visíveis) coletados no momento do abate, Stewart et al. (2013) encontraram 62,1% amostras positivas na cultura e 57,8% por PCR.

Há evidências de taxas maiores de detecção de *M. bovis* usando abordagens para concentrar as células de micobactérias antes da extração de DNA aumentando a sensibilidade da amostra para PCR. No entanto, estas etapas geralmente envolvem mais passos na técnica além do material de consumo e equipamentos (COSTA et al., 2013).

Em estudo recente, utilizando extração de DNA de tecido bovino com *kit* comercial *QIAamp Mini* (Qiagen) e diagnóstico por *nested* PCR e cultivo de 69 bovinos, Costa et al. (2013) descreveram sensibilidade de 100% e especificidade de 97,7% com *nested* PCR. Os resultados do cultivo apresentaram 37,7% de amostras positivas para *M. bovis*. de Nessa pesquisa, iniciadores foram desenhados para IS6110. O grupo também relata a amplificação por *nested* PCR de 08 amostras sem lesões compatíveis com tuberculose e que foram negativas na cultura. O tempo para o diagnóstico foi de aproximadamente 6 horas, o que possibilita sua realização antes que a carcaça seja liberada para comercialização.

Comparações no genoma de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, evoluíram para dois subtipos de um ancestral comum, cerca de 40.000 anos atrás: subtipos definidos pela presença ou ausência de *M. tuberculosis* deleção 1 (TbD1) (WIRTH et al., 2008). Os dados sugerem que os dois subtipos surgiram em seres humanos, com TbD1- subtipo 1 co-evolução principalmente nos seres humanos e TbD1+ subtipo 2 co-evoluindo em seres humanos, ruminantes, e em outras espécies (WATERS et al., 2011).

Até o presente, métodos moleculares para o diagnóstico da tuberculose bovina têm sido realizados a partir de PCR convencional e tempo real dirigidas ao CMT. Acredita-se que a alternativa para identificação rápida e específica de *M. bovis* em fragmentos de tecido de bovinos e bubalinos com suspeita de tuberculose, seria a abordagem por meio de ensaios de *nested* PCR, aumentando a sensibilidade e reduzindo o tempo de diagnóstico (COSTA et al. 2013).

Face aos estudos realizados sobre a identificação direta do agente da tuberculose em tecidos de bovinos e bubalinos, percebe-se que existe demanda por testes mais específicos e sensíveis, que explorem novos genes alvo e possam diagnosticar amostras paucibacilares. Assim, este estudo propôs o desenvolvimento de um sistema de *nested* PCR, com combinação de PCR convencional e PCR em tempo real, para detectar complexo *Mycobacterium tuberculosis* (artigo 1) e a espécie *Mycobacterium bovis* (artigo 2) em homogeneizados de tecidos.

Adicionalmente, especificidade e sensibilidade analítica e clínica das técnicas de *nested* PCR foram analisadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Detectar o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e a espécie *Mycobacterium bovis* diretamente de homogeneizados de tecido de bovinos e bubalinos por *nested* PCR.

3.2 Específicos

- ✓ Desenhar oligonucleotídeos iniciadores e sondas para amplificação de DNA de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (alvo *rv2807*) e *Mycobacterium bovis* (região TbD1);
- ✓ Descrever o desenvolvimento e avaliação de dois sistemas de *nested* PCR, com combinação de PCR convencional e PCR em tempo real, para detectar DNA de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e da espécie *Mycobacterium bovis* em homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, K. A. et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 08, p. 1296-1299, 2010.
- ARANAZ, A. et al. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 16, p. 785-1789, 2003.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento **Norma Interna SDA 02/2012**: Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, 2012. 04p.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**: Brasília; Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. 184p.
- BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.
- COROS A, et al. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.9, p. 3408-3410, 2008.
- COSTA, P. et al. Enhanced Detection of Tuberculous *Mycobacteria* in Animal Tissues Using a Semi-Nested Probe-Based Real-Time PCR. **Plos One**, v.8, n.11 e81337, 2013.
- COUSINS, D. V. et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1305-1334, 2003.
- EISENACH, K. D. et al. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 5, p. 977-981, 1990.
- FIGUEIREDO, E. E. S. et al. Identification of *Mycobacterium bovis* Isolates by a multiplex PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n. 2, p.231-233, 2009.
- FURLANETTO, L. V. et al. Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1138-1144, 2012.
- HERMANS, P. W. M. et al. Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1204-1213, 1990.

MEDEIROS, L. S. et al. Potential Application of New Diagnostic Methods for Controlling Bovine Tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v.41, n. 3, p. 531-541, 2010.

PARRA, A. et al. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 3-4, p. 315-324, 2008.

RODRIGUEZ, J. G. et al. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, v.141, p. 2131-2138, 1995.

RODRÍGUEZ, J. G., et al. Amplification of a 500-base pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2330-2332, 1999.

STEWART, L. D. et al. Improved Detection of *Mycobacterium bovis* Infection in Bovine Lymph Node Tissue Using Immunomagnetic Separation (IMS)-Based Methods. **Plos One**, v. 8, n. 3, e58374, 2013.

TAYLOR, G. M. et al. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**, 3:12, 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/3/12>>. Acesso em: 09 de abril de 2014.

TAYLOR, M. J. et al. 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, n. 4, p. 1272–1278, 2001.

THACKER, T. C. et al. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. **BMC Veterinary Research**, 7:50, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/50>>. Acesso em 09 de Abril de 2014.

VAN INGEN, J. et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n. 4, p. 653-655, 2012.

WARDS, B. J.; COLLINS, D. M., DE LISLE, G. W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 43, n. 2-3, p. 227-240, 1995.

WATERS, W. R. et al. Tuberculosis Immunity: Opportunities from Studies with Cattle. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3004413/>>. Acesso em: 09 de Abril de 2014.

WIRTH, T. et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 9, e1000160, 2008.

ARTIGO 1

DETECÇÃO DIRETA DO COMPLEXO
Mycobacterium tuberculosis
EM TECIDOS DE BOVINOS E BUBALINOS POR
NESTED PCR

**Detecção direta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de
bovinos e bubalinos por *nested* PCR**

**Cristina Pires de Araújo¹; Ana Luiza Alves Rosa Osório¹; Kláudia dos Santos Gonçalves
Jorge¹; Carlos Alberto do Nascimento Ramos²; Antonio Francisco de Souza Filho¹;
Carlos Eugênio Soto Vidal³; Agueda Palmira Castagna Vargas³; Eliana Roxo⁴; Adalgiza
Rocha⁵; Philip Suffys⁵; Antônio Augusto Fonseca Júnior⁶; Marcio Roberto Silva⁷; José
Diomedes Barbosa Neto⁸; Valéria Duarte Cerqueira⁸; Flávio Ribeiro de Araújo^{9/*}**

¹Programa de Pós-graduação em Ciência Animal FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS,
Brasil;² Bolsista DTI- CNPq, Campo Grande, MS, Brasil; ³PPGMV-UFSM, Santa Maria, RS,
Brasil; ⁴Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ⁵Fundação Oswaldo Cruz, Rio
de Janeiro, RJ, Brasil; ⁶Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, MG, Brasil;
⁷Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; ⁸UFPA, Castanhal, PA; ⁹Embrapa Gado de
Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

*Autor Correspondente endereço: Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, 830, CEP 79106-
550, Campo Grande, MS, Brasil. Tel.: +55 67 3368-2069. E-mail: flabio.araujo@embrapa.br (Flávio
R. Araújo).

Resumo

O diagnóstico *post-mortem*, a cultura bacteriana e os testes bioquímicos específicos são atualmente realizados para caracterizar o agente etiológico da tuberculose bovina. As culturas podem levar até 90 dias para se desenvolver. O diagnóstico por testes moleculares, tais como PCR podem proporcionar resultados rápidos e confiáveis, reduzindo significativamente o tempo de confirmação. No presente estudo, um sistema de *nested* PCR baseado no alvo *rv2807*, realizado com PCR convencional seguido por PCR em tempo real, foi desenvolvido para detectar bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) diretamente de homogeneizados de tecidos. A sensibilidade e a especificidade das reações foram avaliadas com amostras de DNA extraídas de micobactérias tuberculosas e não tuberculosas, bem como outras espécies de Actinomycetales e amostras de DNA obtidas diretamente de homogeneizados de tecidos da espécie bovina e bubalina. Os valores de sensibilidade analítica por *nested* PCR foram 1,5 pg de DNA de *M. bovis* cepa AN5 e 6,1 pg de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. O sistema de *nested* PCR apresentou 100% de especificidade analítica para CMT, quando testado com DNA de cepas de referência de micobactérias não-tuberculosas e outros Actinomycetales. A sensibilidade clínica da *nested* PCR foi de 76,7% detectada com tecidos de amostras positivas para CMT por cultura e PCR convencional. Evidenciou-se especificidade clínica de 100% com DNA de amostras de tecidos de bovinos, com resultados negativos no teste cervical comparativo (TCC). Estes animais não apresentavam lesões visíveis e foram negativos por cultura e *nested* PCR para CMT. O uso de *nested* PCR para detectar o complexo *M. tuberculosis*, em homogeneizados de tecidos, permitiu rápido diagnóstico da tuberculose bovina e bubalina.

Palavras-chave: tuberculose bovina e bubalina; PCR em tempo real; *nested* PCR dos tecidos; inspeção sanitária

Introdução

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), incluindo *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. pinnipedii* e *M. cannettii* (Brosch *et al.*, 2002). Embora *M. bovis* seja o agente mais comum da tuberculose em bovinos, outras espécies do CMT também tem sido detectadas, incluindo *M. tuberculosis* (Ameni *et al.*, 2011), *M. caprae* (Sahraoui *et al.*, 2009) e *M. africanum* (Weber *et al.*, 1998).

No Brasil o controle da tuberculose bovina e bubalina envolve o abate de animais infectados identificados por teste de reação intradérmica com derivado proteico purificado (PPD – *Purified Protein Derivative*). A vigilância epidemiológica também é realizada em frigoríficos, bem como inspeções sanitárias de todos os animais abatidos para consumo (Brasil, 2004).

Com o advento da globalização econômica, as barreiras tarifárias foram substituídas por barreiras sanitárias. Há uma pressão crescente de mercados importadores para o diagnóstico definitivo da tuberculose bovina, nos animais que apresentam lesões compatíveis com tuberculose (LCT), pelo país exportador.

Embora o cultivo bacteriológico seja um método confiável para detectar CMT de forma definitiva, uma quantidade significativa de tempo (até 90 dias) é necessária para sua realização, uma vez que os membros deste complexo crescem lentamente quando comparados com os padrões bacteriológicos gerais (Costello *et al.*, 1998; de Leslie *et al.*, 2008; Drobniewski *et al.*, 2003; Hines *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2002). Neste sentido, é importante ressaltar que os sistemas de diagnóstico moleculares baseados na tecnologia PCR em tempo real são mais rápidos e oferecem maiores possibilidades de automação (Soini e Musser, 2001).

Embora muitos sistemas de PCR em tempo real tenham sido desenvolvidos para detectar diretamente CMT de amostras biológicas em seres humanos, o desenvolvimento de um procedimento para detectar CMT em homogeneizados de tecidos de animais tem sido ainda pouco explorado (Parra *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2007; Thacker *et al.*, 2011).

As principais limitações são a dificuldade em extrair DNA de micobactérias em amostras de tecido bovino devido ao número limitado de bactérias e à estrutura da própria amostra biológica que apresenta intensa fibrose e calcificação, dificultando o processo de extração (Liébana *et al.*, 1995).

Outra dificuldade envolve a concentração de DNA de micobactérias, que geralmente é baixa quando comparada com a concentração de DNA do hospedeiro (Thacker *et al.*, 2011). Um terceiro problema é que os bovinos com reações positivas ao teste de tuberculinização nem sempre apresentam lesões visíveis durante o abate (Costello *et al.*, 1997), devido a infecções recentes com uma baixa carga de micobactérias.

Para superar os problemas de sensibilidade na detecção de micobactérias patogênicas diretamente de tecidos bovinos e bubalinos, o presente estudo descreve uma abordagem utilizando *nested* PCR, com uma combinação de PCR convencional e PCR em tempo real, para detectar CMT em homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos.

Materiais e Métodos

Amostras biológicas

Na Tabela 1 são apresentadas as cepas bacterianas de referência utilizadas para a análise da sensibilidade analítica, testes de especificidade e padronização de *nested* PCR. Estas cepas incluem os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*), complexo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium*), micobactérias ambientais e não-tuberculosas (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium smegmatis*) e outros Actinomycetales (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Rhodococcus equi*).

Tabela 1 - Cepas bacterianas utilizadas para avaliar a especificidade e sensibilidade analítica da *nested* PCR.

Cepasbacterianas	Origem
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	LGCM/FIOCRUZ*
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 19977/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 25291/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium bovis</i>	AN5, Ministério da Agricultura – LANAGRO-MG
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	ATCC 6841/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium goodii</i>	ATCC 14470/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium kansasii</i>	ATCC 12478/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37Rv/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 700044/FIOCRUZ
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939/FIOCRUZ

* Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Qualidade em Saúde

Amostras de DNA também foram obtidas a partir das seguintes fontes: cultura isoladas de lesões de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis* cedidas pelo Ministério da Agricultura - LANAGRO, MG, Brasil (n = 50), Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (n = 42), DNA extraído a partir de 170 cultura de *M. tuberculosis*, obtidas a partir de humanos com tuberculose (LABMAM Fiocruz, RJ, Brasil), DNA de amostras de cultura (n = 3) de *M. avium* também cedidas pelo LANAGRO-MG. As cepas de *M. avium* foram identificadas utilizando métodos bioquímicos padrão (amostras do LANAGRO-MG) e *M. bovis* por PCR com iniciadores JB21 e JB22 para CMT (Rodriguez *et al.*, 1995). As cepas de *M. tuberculosis* foram identificadas utilizando *spoligotyping* (Kamerbeek *et al.*, 1997) e PCR para o polimorfismo do gene *pncA* (Bauroni *et al.*, 2004).

A cepa de referência de *M. bovis* AN5 foi cultivada em meio Stonebrink, enquanto que as outras cepas de referência de *Mycobacterium* sp. foram cultivadas em meio de Löwenstein-Jensen. Cepas não-micobacterianas não foram cultivadas e DNA foi purificado diretamente a partir das suspensões bacterianas liofilizadas.

Extração de DNA de cepas bacterianas

O DNA de bactérias de referência foi purificado com kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e concentração das amostras de DNA foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000, *Thermo Scientific*) e eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com *SYBR Gold* (Invitrogen).

Iniciadores e sonda

Com base nas sequências de DNA de membros do CMT disponíveis no Gen Bank-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e com o auxílio do programa BLAST, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, alvos específicos foram selecionados para amplificação de DNA. A sonda e iniciadores para *nested* PCR foram desenhados usando o software *Primer Express* v2.0 (*Applied Biosystems*).

O alvo selecionado para amplificação foi *rv2807* (ID: 888907), um gene de 443 pb que codifica para uma proteína hipotética do complexo *M. tuberculosis*.

Dois conjuntos de iniciadores foram desenhados: iniciadores externos, para amplificação por PCR convencional, e os iniciadores internos e sonda, *TaqMan* MGB para amplificação por PCR em tempo real. A primeira reação foi incluída para enriquecer as amostras de DNA, uma vez que a concentração relativa mais elevada do DNA do hospedeiro isolado a partir de tecidos de bovinos pode interferir na amplificação do gene alvo.

A Tabela 2 mostra as sequências dos iniciadores e sonda

Tabela 2 - Iniciadores e sonda utilizados com a primeira reação de PCR convencional e a segunda reação de PCR em tempo real para complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT).

Gene alvo	Sequência DNA
<i>rv2807</i> - complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Iniciador externo 5'- 3' CMT: GGCGGTGGCGGAGTTGAAGGCGATGAG
	Iniciador externo 3'- 5' CMT: GCCGCGAGCGAGTCTGGGCGATGTC
	Iniciador interno 5'- 3' CMT: CATTGCTGCGTAATTCGATCA
	Sonda CMT: 6FAM CATCCACACCTGTTCG MGB-NFQ
	Iniciador interno 3'- 5' CMT: GACCTTGGGCGCCTCAT

Padronização de *Nested* PCR

A primeira reação (PCR convencional) foi feita em volume total de 25 µL, contendo: 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3); 50 mM de KCl; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 7,5 pmol de cada iniciador; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Sigma) e 400 ng de DNA.

A segunda reação (PCR em tempo real) para CMT foi realizada em volume total de 12,5 µL, contendo: 6,25 µL de *TaqMan Master Mix* (ref 4.352.042, *Applied Biosystems*), 600 nM de cada iniciador, 100 nM de sonda e 3 µL da primeira reação de PCR.

Na primeira reação as amplificações foram realizadas em um termociclador da marca MJ Mini Bio-Rad. A desnaturação inicial foi realizada a 95°C durante 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 90 segundos, hibridação a 65°C durante 30 segundos, e extensão a 72°C durante 45 segundos. Um passo final de extensão a 72°C foi realizada durante 3 minutos. As amplificações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador *Step One Plus* (*Applied Biosystems*, EUA). O programa de termociclagem foi composto por: desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e anelamento/extensão a 62°C durante 30 segundos.

Para todas as reações de *nested* PCR, DNA de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv foram usados como controle positivo. Para controle negativo foi utilizado água livre de nucleases.

A sensibilidade analítica dos iniciadores para CMT foi avaliada com diluições seriadas de DNA de cepas de referência de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv, em triplicata, com reações separadas para cada réplica. Cada amostra de DNA foi testada apenas por PCR em tempo real, apenas por PCR convencional e *nested* PCR (ambas as reações).

Os iniciadores e sonda para CMT foram testados quanto à sensibilidade com DNA das 92 culturas de *M. bovis* de bovinos naturalmente infectados, fornecidas pelo LANAGRO, Instituto Biológico, bem como 170 amostras de DNA obtidas a partir de culturas de *M. tuberculosis* isolados de humanos naturalmente infectados.

Para as avaliações de especificidade, os iniciadores e sonda para CMT foram testadas com 50 ng de DNA de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium*

smegmatis e *Rhodococcus equi*. Para avaliar a presença de inibidores de PCR, alíquotas de DNA das espécies acima, usadas para avaliar a especificidade, foram misturadas com DNA de *M. bovis* AN5 e testadas por *nested* PCR. As condições de amplificação foram as mesmas que as do alvo específico.

Detecção direta de CMT em tecidos de bovinos e búfalos

Detecção direta do CMT em homogeneizados de tecidos foi realizada com amostras de 113 bovinos e 46 búfalos (*Bubalus bubalis*) dos seguintes grupos:

a) Setenta e seis animais positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC), incluindo 45 bovinos com lesão compatível com tuberculose (LCT) e 31 sem lesões visíveis (SLV). Estes animais, de diferentes idades e categorias zootécnicas (leite e carne) foram abatidos seguindo as diretrizes do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal PNCEBT (Brasil, 2004).

b) Vinte e três bovinos negativos ao TCC e sem lesões visíveis (SLV). Esses animais vieram de uma fazenda de exploração mista (leite e carne), com história prévia de tuberculose bovina.

c) Sessenta bovinos sem histórico de TCC, incluindo 59 animais com LCT e um SLV.

O Teste Cervical Comparativo foi realizado seguindo as diretrizes do PNCEBT (Brasil, 2004). Uma reação TCC positiva foi definida como um aumento relativo da espessura da dobra da pele no local de aplicação do PPD bovino superior a pelo menos 4 mm que o aumento da espessura da pele no local de aplicação do PPD aviário (Brasil, 2004).

No presente estudo, lesões compatíveis com tuberculose (LCT) foram obtidas a partir de linfonodos: hepático, ilíaco, mandibular, mediastínico, mesentérico, pré-escapular, retrofaríngeo e brônquico, bem como fragmentos de órgãos: pulmões, amígdalas, fígado e diafragma. Quando os bovinos não apresentavam lesões visíveis (SLV), fragmentos de (fígado, linfonodo mediastino, mesentérico, retrofaríngeo e traqueobrônquico) foram coletados.

Os órgãos foram mantidos refrigerados até chegarem ao laboratório, onde foram armazenados a -30°C até o processamento. Em seguida, foram descongelados e divididos em duas amostras: uma para a cultura e a outra para a extração de DNA direto de tecido.

Para realizar a extração de DNA, as amostras foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 100 mg, correspondente à transição entre as áreas de lesão macroscópica e área

aparentemente saudável. Estes fragmentos foram completamente homogeneizados com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS – *Phosphate Buffered Saline*). A partir destas suspensões de tecidos, 200 µL foram utilizadas para extração de DNA com Kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Reações de *nested* PCR foram realizadas como descrito acima.

Para cultura, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas com uma quantidade equivalente de areia estéril e água. As suspensões de tecido foram filtradas através de uma gaze estéril e centrifugadas a 1200 xg durante 15 minutos. Os sedimentos foram suspensos em 2 mL de água estéril, utilizando o método de descontaminação de Petroff, e cultivadas em meio Stonebrink. As culturas foram incubadas a 37°C e observadas para busca de colônias durante pelo menos 90 dias com observações semanais. Os esfregaços das colônias isoladas foram corados utilizando método de Ziehl-Neelsen (ZN) para bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR). Todas as culturas de BAAR foram analisadas por PCR convencional utilizando os iniciadores JB21 e JB22 para CMT (Rodriguez *et al.*, 1995).

Os animais foram considerados positivos para tuberculose quando pelo menos uma amostra de tecido apresentava amplificação por *nested* PCR ou quando colônias de BAAR foram confirmadas na PCR convencional com iniciadores JB21 e JB22.

Análise estatística

O teste exato de Fisher ou o teste do Qui-quadrado foram realizados para avaliar a associação entre as variáveis categóricas. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

Resultados

As análises realizadas *in silico* com as sequências dos iniciadores e sonda estão mostradas na Figura 1. Identidade completa foi detectada apenas com espécies do CMT, tais como *M. bovis* (incluindo BCG), *M. tuberculosis*, *M. africanum*. Identidade parcial foi observada com *M. canettii*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. gilvum*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*, *M. rhodesiae*, *M. smegmatis* e *M. ulcerans* (Figura 1).

Quanto à sensibilidade analítica, detectou-se DNA de *M. bovis* AN5 até: 390,6 pg por PCR convencional, 24,4 pg por PCR em tempo real e 1,5 pg por *nested* PCR. Para DNA de *M. tuberculosis* H37Rv detectou-se até 6,1 pg por PCR convencional, 24,4 pg por PCR em tempo real e 6,1 pg por *nested* PCR.

Das 50 amostras de DNA isoladas a partir de culturas de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis* (Ministério da Agricultura - LANAGRO), 49 (98,8%) foram positivas na *nested* PCR para CMT. Todas as 42 amostras (100%) de DNA isoladas de culturas de *M. bovis* do Instituto Biológico de São Paulo foram positivas pela *nested* PCR para CMT. Das 170 amostras de cultura de *M. tuberculosis* isoladas de escarro de humanos com tuberculose (LABMAM, Fiocruz, RJ, Brasil), 100% foram positivas em *nested* PCR para CMT.

A especificidade analítica por *nested* PCR para CMT foi testada usando DNA de *C. pseudotuberculosis*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. smegmatis* e *R. equi*. Não houve amplificação quando utilizaram-se 50 ng de DNA destes agentes. Amplificações foram visualizadas com DNA *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv como controle positivo.

Para avaliar a presença de inibidores de PCR, misturaram-se alíquotas de DNA de bactérias não-alvo com DNA de *M. bovis* AN5. Detectaram-se amplificações, o que mostra que não houve interferência por inibidores de PCR

rv2807

Iniciadores

Mycobacterium bovis AF2122/97 (BX248339)
Mycobacterium bovis BCG-Mexico (CP002095)
Mycobacterium bovis BCG-Moreau (AM412059)
Mycobacterium bovis BCG-Tokyo (AP010918)
Mycobacterium bovis BCG-Pasteur (AM408590)
Mycobacterium tuberculosis RGTB423 (CP003234)
Mycobacterium tuberculosis RGTB327 (CP003233)
Mycobacterium tuberculosis ATCC35801 (AP012340)
Mycobacterium tuberculosis UT205 (HE608151)
Mycobacterium tuberculosis CTRI2 (CP002992)
Mycobacterium tuberculosis CDC5180 (CP001642)
Mycobacterium tuberculosis CDC5979 (CP001641)
Mycobacterium tuberculosis KZN4207 (CP001662)
Mycobacterium tuberculosis KZN1435 (CP001658)
Mycobacterium tuberculosis H37Rv (BX842573)
Mycobacterium tuberculosis F11 (CP000717)
Mycobacterium tuberculosis H37Ra (CP00611)
Mycobacterium tuberculosis CDC1551 (AE000516)
Mycobacterium avium 104 (CP000479)
Mycobacterium avium 2151 (AF143772)
Mycobacterium africanum GM041182 (FR878060)
Mycobacterium paratuberculosis (AE016958)
Mycobacterium canettii (HE572590)
Mycobacterium intracellulare (CP003323)
Mycobacterium rhodesiae (CP003169)
Mycobacterium gilvum (CP000656)
Mycobacterium smegmatis (CP000480)
Mycobacterium abscessus (CU458896)

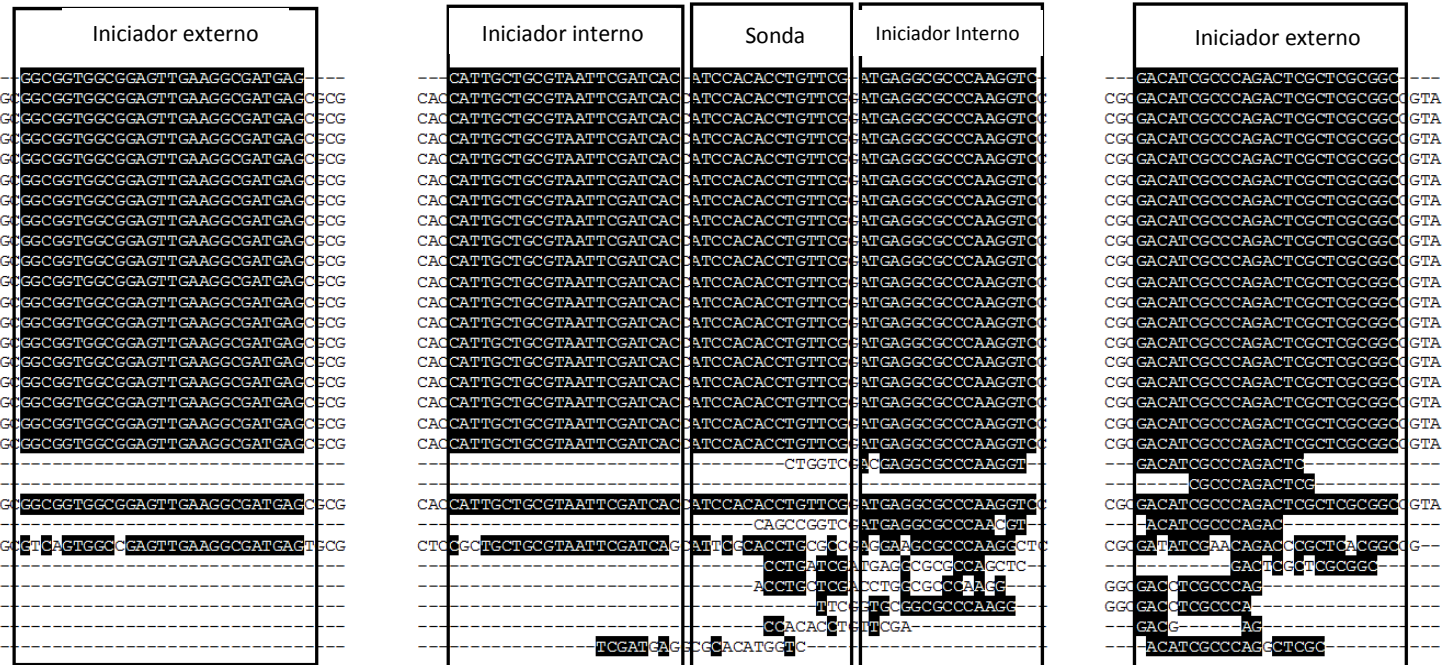


Figura1- Alinhamento das sequências de sonda e iniciadores para *rv2807* do complexo *Mycobacterium tuberculosis* com a sequência alvo em diferentes isolados e espécies de *Mycobacterium*. As áreas destacadas em preto indicam identidade nucleotídica entre os isolados.

Amostras de tecidos de 159 bovinos e bubalinos foram testadas diretamente por *nested* PCR para CMT. Os resultados de *nested* PCR e cultura são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - *Nested* PCR para complexo *Mycobacterium tuberculosis* e os resultados de cultura de 159 homogeneizados de tecidos bovinos e bubalinos

Condição	Nº total	Teste	Nº de positivos (%)	Valor de P
TCC + e LCT	45	<i>Nested</i> PCR Cultura *	32 (71,1) 37 (82,2)	0,318
TCC + e SLV	31	<i>Nested</i> PCR Cultura *	17 (54,8) 10 (32,2)	0,124
TCC- e SLV	23	<i>Nested</i> PCR Cultura *	0 (0,0) 1 (4,3)	0,999
Sem TCC e LCT	59	<i>Nested</i> PCR Cultura *	33 (55,9) 19 (32,2)	0,015
Sem TCC e SLV	1	<i>Nested</i> PCR Cultura *	0 (0,0) 1 (100,0)	-----

TCC = Teste cervical comparativo

LCT = Lesão compatível com tuberculose

SLV = Sem lesão visível

BAAR= Bacilos álcool-ácido-resistente

*Confirmado por PCR convencional com iniciadores JB21 e JB22 (Rodriguez *et al.*, 1995).

No Brasil, o TCC é considerado teste *in vivo* referência na confirmação de infecção por *M. bovis* em bovinos e bubalinos. Dos 76 animais TCC+ descritos no presente estudo, 47 animais foram positivos na cultura (61,8%) e 49 foram positivos para CMT por *nested* PCR (64,4%) ($p = 0,86$).

Dos 45 bovinos e bubalinos TCC+ e com LCT, 32 (71,1%) foram positivos para CMT por *nested* PCR e 37 (82,2%) foram positivos na cultura, e confirmados por PCR com JB21 e JB22 ($p = 0,318$) (Tabela 3). Dos 31 bovinos e bubalinos TCC+ e SLV, 17 (54,8%) foram positivos para CMT por *nested* PCR e 10 (32,2%) foram positivos na cultura, confirmados por PCR JB21 e JB22 ($p = 0,124$) (Tabela 3).

O número de animais positivos para tuberculose foi estatisticamente superior no grupo TCC+ com LCT que no grupo TCC+ e SLV, tanto por *nested* PCR para CMT ($p = 0,0001$) como na cultura ($p = 0,0001$).

Dos 76 animais TCC+, 31 (40,7%) não apresentaram lesões visíveis durante a inspeção de abate. Desses animais, 7 (22,5%) foram positivos tanto na cultura como na *nested* PCR para CMT.

No grupo de 21 animais TCC+ e SLV com culturas negativas, 10 animais foram positivos na *nested* PCR para CMT.

Dos 59 bovinos e bubalinos com LCT, mas não testados anteriormente pelo TCC, 33 (55,9%) foram positivos para CMT na *nested* PCR e 19 (32,2%) foram positivos na cultura, o que foi confirmado por PCR com iniciadores JB21 e JB22 ($p = 0,015$).

Na análise de 23 animais TCC- provenientes de uma fazenda com histórico de tuberculose bovina, não houve animais positivos na *nested* PCR para CMT. No entanto, um animal (4,3%) foi positivo na cultura, conforme confirmado por PCR com JB21 e JB22.

Nas análises dos 104 animais que exibiram LCT, 65 animais foram positivos para CMT na *nested* PCR (62,5%) e 56 animais foram positivos na cultura (53,8%) ($p = 0,261$).

Considerando-se a presença de lesões compatíveis com tuberculose confirmadas por cultura e PCR, 56 animais foram positivos, dos quais 43 também foram positivos para CMT por *nested* PCR, resultando em uma sensibilidade clínica de 76,7%. Vinte e dois animais sem lesões visíveis, e com TCC e culturas negativas, foram negativos também na *nested* PCR para CMT, determinando uma especificidade clínica de 100%.

Discussão

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um sistema de diagnóstico *post-mortem* da tuberculose bovina e bubalina, rápido e aplicável diretamente a amostras clínicas de bovinos e bubalinos. Aliado a isso, desenvolver um método preciso que possa reduzir substancialmente o tempo entre detecção de lesões compatíveis e diagnóstico etiológico (2 dias) quando comparado com o método tradicional de cultura, que pode demorar até 90 dias.

Um dos problemas com a detecção do complexo *M. tuberculosis* diretamente a partir de lesões que são compatíveis com a tuberculose é que os tecidos apresentam geralmente fibrose e calcificação intensa, dificultando o acesso ao DNA das micobactérias (Liébana *et al.*, 1995). Três kits comerciais de purificação de DNA foram testados usando tecidos de bovinos que apresentam lesões causadas por *M. bovis* (dados não mostrados). Os melhores resultados foram obtidos com kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), quanto a qualidade do DNA e a detecção do CMT por *nested* PCR.

A análise das diluições seriadas de DNA da cepa de referência *M. bovis* AN5 revelou uma maior sensibilidade analítica para *nested* PCR quando comparada com PCR em tempo real ou PCR convencional isoladamente, embora a diferença mais notável seja demonstrada quando comparamos *nested* PCR ou PCR em tempo real com PCR convencional. Quando DNA de *M. tuberculosis* H37Rv foi utilizado, as técnicas de *nested* PCR e PCR convencional apresentaram sensibilidades semelhantes. Já PCR em tempo real isoladamente mostrou-se mais sensível.

Apesar de não ser esperado que o diagnóstico por PCR convencional mostrasse sensibilidade analítica semelhante ao teste de *nested* PCR na identificação de DNA de *M. tuberculosis*, a primeira necessita de processamento pós-amplificação (por exemplo, eletroforese em gel), contribuindo para o aumento no tempo de processamento. O impacto da utilização da abordagem por *nested* PCR provavelmente será maior em relação à sensibilidade clínica, como no presente caso, uma vez que os inibidores de PCR e micobactérias atípicas podem interferir com o desempenho da reação de PCR convencional. A opção por uma estratégia de *nested* PCR (primeira reação de PCR convencional e em seguida PCR em tempo real) também foi considerada por Thacker *et al.* (2011), resultando em aumento da sensibilidade clínica para a detecção de *M. bovis* diretamente de amostras de tecidos.

A análise realizada *in silico* dos iniciadores/sonda para CMT revelou identidade completa com os membros do CMT, exceto com *M. canettii*, com o qual houve identidade parcial. No entanto, *M. canettii* é um patógeno humano (Brosh *et al.*, 2002), e acredita-se ser raro e limitado aos países da África Oriental (Reddington *et al.*, 2011).

A especificidade analítica da *nested* PCR foi verificada *in vitro*. Não houve amplificação quando os iniciadores e sonda foram usados com DNA de micobactérias ambientais como *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. kansasii* e *M. smegmatis*, sem amplificação

também com DNA de *R. equi* e *C. pseudotuberculosis*. Isto é particularmente significativo, uma vez que micobactérias ambientais em linfonodos submetidos a testes de diagnóstico podem confundir os ensaios que não possuem especificidade suficiente (Thacker *et al.*, 2011). Além disso, outros Actinomycetales como *R. equi* e *C. pseudotuberculosis* podem causar lesões confundíveis com tuberculose (Flynn *et al.*, 2001; Sahraoui *et al.*, 2009).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a *nested* PCR para CMT e a cultura nos grupos de animais TCC+ com LCT ou TCC+ SLV. No entanto, a *nested* PCR e a cultura exibiram uma maior sensibilidade na detecção de animais TCC+ com LCT do que aqueles com TCC+ SLV. Este é um claro indicador da maior carga de micobactérias no grupo com lesões. A mesma tendência de maior sensibilidade no grupo de animais com LCT foi descrita por Parra *et al.* (2008). No entanto, nesse estudo de Parra *et al.* os autores não conseguiram detectar animais positivos no grupo SLV, que também eram negativos em cultura. No grupo de animais TCC+ SLV no presente estudo, a *nested* PCR para CMT foi capaz de detectar animais positivos para tuberculose mesmo quando estas amostras eram negativas em cultivo.

Menores taxas de positividade foram encontradas pela *nested* PCR e cultura no grupo de animais sem TCC que apresentavam LCT durante a inspeção de abate. Uma das possíveis razões para este resultado é a presença de lesões granulomatosas causadas por outros agentes. O isolamento de micobactérias atípicas em bovinos com lesões de tuberculose disseminada é raro, devido ao caráter crônico e não-progressivo das infecções. No entanto, foram relatados alguns casos de doença disseminada (Oloya *et al.*, 2007). Lesões causadas por outras bactérias que não sejam micobactérias como *Rhodococcus*, *Actinobacillus*, *Arcanobacterium* e *Nocardia*, entre outras (de Lisle *et al.*, 2002), também podem ser confundidas com tuberculose.

No Brasil, bovinos com resultados positivos ao TCC ou que apresentem lesões compatíveis com tuberculose durante as inspeções de abate, são considerados positivos para a tuberculose. Considerando o cultivo confirmado por PCR como teste de referência *post-mortem*, uma sensibilidade clínica de 76,7% foi detectada. Os resultados de *nested* PCR apresentaram 100% de especificidade clínica e foram obtidos em um curto período de tempo (2 dias), em contraste com a cultura (até 90 dias). A sensibilidade de 76,7% de *nested* PCR pode ser subestimada, pois estes animais eram todos

TCC+. Culturas falso-negativas podem ocorrer devido à natureza paucibacilar de tecidos selecionados, e procedimentos de descontaminação que são um pré-requisito para a cultura, o que pode reduzir significativamente a viabilidade de micobactérias, entre outros motivos.

Várias abordagens têm sido utilizadas para aumentar a sensibilidade da PCR em tempo real para a identificação de *Mycobacterium* sp. diretamente de homogeneizados de tecido. Parra *et al.* (2008) utilizaram uma sonda de captura para isolar DNA de homogeneizados de tecidos com micobactérias, conseguindo menor sensibilidade (65,6%) do que foi aqui relatado. Taylor *et al.* (2007) apresentaram uma sensibilidade de 70% ao realizar PCR diretamente sobre homogeneizados de tecidos, embora a sensibilidade tenha aumentado para 91% quando modificaram o método de extração de DNA. Thacker *et al.* (2011) utilizaram uma estratégia similar a do presente estudo, com uma primeira PCR convencional e uma segunda reação em tempo real. Embora os autores tenham utilizado outro alvo (IS6110), detectaram 66,7% de amostras positivas em tecidos positivos em cultura.

Uma das preocupações do teste *nested* PCR em particular com PCR em tempo real é a possibilidade de contaminação cruzada. Durante todo o processo de extração de DNA as luvas foram trocadas com frequência. A purificação de DNA foi realizada em capela de biossegurança nível três, e PCR em gabinete de fluxo laminar com luz UV. Conjuntos separados de micropipetas foram utilizados para extração de DNA e PCR. Ponteiras com filtro foram usadas rotineiramente. Superfícies e equipamentos em contato com microtubos de amostras foram limpos antes de cada ensaio.

Durante a inspeção de abate em frigorífico, a principal preocupação são os animais que apresentam lesões visíveis, que são consideradas impróprios para o consumo. No entanto, nas amostras de bovinos e bubalinos do presente estudo, 40,7% dos animais TCC+ não apresentavam lesões. Destas amostras 22,5% foram positivas tanto na cultura como na *nested* PCR para CMT, o que representa risco para a transmissão zoonótica de *M. bovis*. As principais espécies do CMT encontradas em bovinos podem sobreviver ao processo de cozimento (Van der Merwe *et al.*, 2009). Por esta razão, as políticas sanitárias que envolvem testes de PCR em tecidos de animais TCC+ SLV devem ser consideradas.

Todos os 23 bovinos TCC- também foram negativos na *nested* PCR, mas um animal foi positivo em cultura, o que foi confirmado por PCR com iniciadores JB21 e JB22. A fazenda em que

estes animais foram criados tem histórico de tuberculose bovina. Animais com estágios avançados de tuberculose podem não reagir ao TCC, mas, este animal não apresentou lesões ao abate.

Conclusões

A utilização do ensaio de *nested* PCR para detectar bactérias do complexo *M. tuberculosis* em homogeneizados de tecidos proporciona um diagnóstico rápido da tuberculose bovina e bubalina. Um estudo em grande escala e uma validação inter-laboratorial do método são necessários para determinar a viabilidade do teste para o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (processos 578278/2008, 479394/2011-3 e 310165/2010-5), FUNDECT (processos 23/200.152/2009 e 23/200.582/2012) e CAPES (bolsa de doutorado) pelo apoio financeiro e a Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pelo fornecimento das amostras bacterianas de referência.

Referências

- Ameni G, Vordermeier M, Firdessa R, Aseffa A, Hewinson G, Gordon SV, Berg S (2011) *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. Vet J 188 (3):359-61.
- Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MTP, Zanini MS, Salas CE (2004) A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell Probes 18 (3):167–170.
- Brasil (2004) Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal–PNCEBT. Manual Técnico, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, Van Soolingen D, Cole ST (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA 99 (6):3684-3689.

- 422 Costello E, Doherty ML, Monaghan ML, Quigley FC, O'Reilly PF (1998) A study of cattle-to-cattle
423 transmission of *Mycobacterium bovis* infection. Vet J 155 (3):245-250.
- 424 Costello EJ, Egan W, Quigley FC, O'Reilly PF (1997) Performance of the single intradermal
425 comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. Vet Rec
426 141 (9):222-224.
- 427 de Lisle GW, Bengis RG, Schmitt SM, O'Brien DJ (2002) Tuberculosis in free-ranging wildlife:
428 detection, diagnosis and management. Rev Sci Tech 21 (2):317-334.
- 429 de Lisle GW, Kawakami RP, Yates GF, Collins DM (2008) Isolation of *Mycobacterium bovis* and
430 other mycobacterial species from ferrets and stoats. Vet Microbiol 132 (3-4):402-407.
- 431 Drobniewski FA, Gibson A, Ruddy M, Yates MD (2003) Evaluation and utilization as a public health
432 tool of a national molecular epidemiological tuberculosis outbreak database within the United
433 Kingdom from 1997 to 2001. J Clin Microbiol 41 (5):1861-1868.
- 434 Flynn O, Quigley F, Costello E, O'Grady D, Gogarty A, McGuirk J, Takai S (2001) Virulence-
435 associated protein characterisation of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. Vet
436 Microbiol 78 (3):221-228.
- 437 Hines N, Payeur JB, Hoffman LJ (2006) Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates
438 using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11
439 solid media. J Vet Diagn Invest 18 (3):243-250.
- 440 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A,
441 Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain
442 differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol
443 35 (4):907-914.
- 444 Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez
445 G, Domingo M, Dominguez L (1995) Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*
446 complex organisms in bovine tissue samples by PCR. J Clin Microbiol 33 (1):33-36.
- 447 Miller JM, Jenny AL, Payeur JB (2002) Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium*
448 *tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from
449 culture-negative ruminants. Vet Microbiol 87 (1):15-23.
- 450 Oloya J, Kazwala R, Lund A, Opuda-Asibo J, Demelash B, Skjerve E, Johansen TB, Djønne B (2007)
451 Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda.
452 BMC Microbiol 7:95.

- 453 Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, Freire F, Moran J, Hermoso JM (2008)
 454 Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on
 455 bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol* 127 (3-4):315–324.
- 456 Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, Van Soolingen D, Barry T (2011) A novel
 457 multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic
 458 tuberculosis. *Plos One* 6 (8):e23481.
- 459 Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA (1995) Species-specific
 460 identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 141 (Pt 9):2131-2138.
- 461 Sahraoui N, Müller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, Ouzrout R, Berg S, Smith NH, Zinsstag J
 462 (2009) Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle
 463 slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Vet Res* 5:4.
- 464 Schmitt SM, O'Brien DJ, Bruning-Fann CS, Fitzgerald SD (2002) Bovine tuberculosis in Michigan
 465 wildlife and livestock. *Ann N Y AcadSci* 969:262-268.
- 466 Soini H, Musser JM (2001) Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* 47 (5):809-814.
- 467 Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG (2007) Rapid detection of *Mycobacterium*
 468 *bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res* 3:12.
- 469 Thacker TC, Harris B, Palmer MV, Waters WR (2011) Improved specificity for detection of
 470 *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using *IS6110* real-time PCR. *BMC Vet Res* 7:50.
- 471 Van der Merwe M, Bekker JL, Van der Merwe P, Michel AL (2009) Cooking and drying as effective
 472 mechanisms in limiting the zoonotic effect of *Mycobacterium bovis* in beef. *J S Afr Vet Assoc* 80
 473 (3):142-145.
- 474 Weber A, Reischl U, Naumann L (1998) Demonstration of *Mycobacterium africanum* in a bull from
 475 North Bavaria. *Berl MunchTierarztl Wochenschr* 111 (1):6-8.
- 476

2 ARTIGO

DETECÇÃO DE *Mycobacterium bovis* EM TECIDOS DE BOVINOS E
BUBALINOS UTILIZANDO *NESTED* PCR PARA TbD1

Detecção direta de *Mycobacterium bovis* em tecidos de bovinos e bubalinos utilizando *nested* PCR para TbD1

Cristina P. Araújo¹, Ana Luiza A. R. Osório¹, Kláudia S. G. Jorge¹, Carlos Alberto N. Ramos², Antonio Francisco S. Filho¹, Carlos Eugênio S. Vidal³, Eliana Roxo⁴, Christiane Nishibe⁵, Nalvo F. Almeida⁵, Antônio A. F. Júnior⁶, Marcio R. Silva⁷, José Diomedes B. Neto⁸, Valéria D. Cerqueira⁸, Martín J. Zumárraga⁹, Flábio R. Araújo^{10*}

1 Programa de Pós-graduação em Ciência Animal FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS, Brasil, **2** Bolsista DTI-CNPq, Campo Grande, MS, Brasil, **3** PPGMV-UFSM, Santa Maria, RS, Brasil, **4** Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, **5** Faculdade de Computação, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil, **6** Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, MG, Brasil, **7** Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil, **8** UFPA, Castanhal, PA, **9** Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina, **10** Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

Citação: Araújo CP, Osório ALAR, Jorge KSG, Ramos CAN, Sousa Filho AF, et al. (2013) Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. Plos One, v.9, n.3, e91023, 2014

* E-mail: flabio.araujo@embrapa.br

Endereço para correspondência: Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, 830, CEP 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil. Tel.: +55 67 3368-2069.

Resumo

No presente estudo, um sistema de *nested* PCR, que envolve a realização de PCR convencional seguida por PCR em tempo real, tendo como alvo a região TbD1, foi desenvolvida para detectar *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) em homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos. A sensibilidade e a especificidade das reações foram avaliadas com amostras de DNA obtidas a partir de micobactérias tuberculosas e não-tuberculosas bem como outras espécies de Actinomycetales e DNA de amostras obtidas diretamente a partir de homogeneizados de tecidos da espécie bovina e bubalina. Quanto à sensibilidade analítica, detectou-se DNA *M. bovis* AN5 dentro dos seguintes níveis: 1,56 ng por PCR convencional, 97,6 pg com PCR em tempo real e 1,53 pg por *nested* PCR (duas reações). A *nested* PCR apresentou 100% de especificidade analítica para *M. bovis*, quando testado com DNA de cepas de referência de micobactérias ambientais e outros Actinomycetales. A sensibilidade clínica foi de 76,0%, detectada com amostras de tecido provenientes de animais que apresentaram resultado positivo no teste de cervical comparativo (TCC), assim como aqueles com lesões compatíveis com tuberculose (LCT), que apresentaram culturas positivas. A especificidade clínica de 100% foi detectada em amostras de tecido de animais com resultados negativos no TCC, sem lesões visíveis (SLV) e com resultado negativo na cultura. Não foram encontradas diferenças significativas entre *nested* PCR e cultura para detectar animais positivos ao TCC com LCT ou SLV. Assim como em animais TCC negativos e SLV. No entanto, a *nested* PCR detectou um número significativamente superior de animais positivos que cultura no grupo de animais que exibiam LCT sem registros anteriores de TCC. A utilização do ensaio de *nested* PCR para detectar *M. bovis* em homogeneizados de tecidos proporcionou diagnóstico rápido da tuberculose bovina e bubalina.

Introdução

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), incluindo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* [1], *M. africanum* [2], *M. canettii* [3], *M. caprae* [4], *M. pinnipedii* [5], *M. mungi* [6] e *M. orygis* [7]. Embora *M. bovis* seja a espécie mais frequentemente envolvida em casos de tuberculose, outras espécies do CMT também já foram detectadas [7,8,9].

A tuberculose bovina e bubalina provoca prejuízos financeiros em muitos países e representa risco zoonótico [10]. No Brasil o controle da tuberculose bovina e bubalina é regulamentado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT. Este programa envolve o abate de bovinos, com reações positivas no teste de tuberculinização (diagnóstico *ante-mortem*) e da inspeção de carcaças com lesões macroscópicas nos frigoríficos (diagnóstico *post-mortem*) [11]. No entanto, há uma crescente pressão dos mercados internacionais de carne bovina para o diagnóstico definitivo da tuberculose em bovinos apresentando lesões compatíveis com tuberculose (LCT). A partir de 2012, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determinou que as fazendas com casos de tuberculose bovina e bubalina estão proibidas de exportar carne bovina para a União Eurasiática (União Aduaneira composta por Bielorrússia, Cazaquistão e Rússia). Todos os lotes de animais de uma propriedade com animais suspeitos serão sequestrados e as LCT enviadas a um laboratório oficial para o diagnóstico etiológico [12].

A cultura é considerada “padrão de ouro” e é o teste definitivo para a confirmação da tuberculose bovina. No entanto, o diagnóstico microbiológico de *M. bovis* é um processo extremamente lento, que pode demorar dois a três meses. Aliado a isso, mais duas a três semanas são necessárias para a identificação bioquímica dos isolados [13]. Portanto a necessidade de sistemas de diagnóstico rápido é evidente. Os sistemas de diagnóstico molecular, particularmente aqueles com base em tecnologia de PCR em tempo real, apresentam resultados em até dois dias [14].

O objetivo do presente estudo foi descrever o desenvolvimento e avaliação de um sistema de *nested* PCR, envolvendo uma reação convencional seguida por PCR em tempo real para detectar *M. bovis* em homogeneizados de tecidos de bovinos e bubalinos.

Materiais e Métodos

Amostras biológicas

Na Tabela 1 são apresentadas as cepas bacterianas de referência utilizadas para a avaliação da sensibilidade analítica ou ensaios de especificidade (*M. kansasii*, *M. smegmatis*, e *R. equi*), bem como a otimização de *nested* PCR. Estas cepas incluem membros do CMT (*M. bovis* e *M. tuberculosis*), *Mycobacterium avium* (*M. avium*), micobactérias ambientais e não-tuberculosas (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium smegmatis*), e outras Actinomycetales (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Rhodococcus equi*).

Tabela 1. Cepas padrão de bactérias utilizadas para a avaliação da especificidade ou sensibilidade analítica de *nested* PCR para a região gênica TbD1 de *Mycobacterium bovis*.

Cepasbacterianas	Origem
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	LGCM/FIOCRUZ*
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ATCC 19977/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 25291/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium bovis</i>	AN5, Ministério da Agricultura – LANAGRO-MG
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	ATCC 6841/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium gordonae</i>	ATCC 14470/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium kansasii</i>	ATCC 12478/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37Rv/FIOCRUZ
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 700044/FIOCRUZ
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939/FIOCRUZ

*Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Outras amostras biológicas também foram utilizadas: a) DNA obtido a partir de amostras de culturas isoladas de lesões de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*. Estas amostras eram de animais abatidos que apresentaram lesões sugestivas de tuberculose (LCT) durante a inspeção sanitária de rotina e as mesmas lesões foram submetidas a diagnóstico etiológico pelo Ministério da Agricultura - LANAGRO, MG, Brasil (n = 50) e Instituto Biológico, São Paulo, Brasil (n = 42) como regulamentado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal PNCEBT [11]; b) DNA extraído de amostras de cultura (n = 3) de *M. avium* cedidas também pelo

LANAGRO-MG. *M. bovis* e *M. avium* foram isolados e identificados por métodos bioquímicos padrão (amostras do LANAGRO-MG) ou PCR com os iniciadores JB21 e JB22 para CMT [15]. A cepa de referência de *M. bovis* AN5 foi cultivada em meio Stonebrink, enquanto outras cepas de referência de *Mycobacterium* sp. foram cultivados em Löwenstein-Jensen e meio Middlebrook. As cepas não-micobacterianas não foram cultivadas e DNA foi purificado diretamente a partir de suspensão bacteriana liofilizada.

Extração de DNA de cepas bacterianas

DNA das bactérias de referência foram purificados com kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e concentração das amostras de DNA foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000, *Thermo Scientific*) e eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com *SYBR Gold* (Invitrogen).

Iniciadores e sonda

Com base em sequências de DNA de membros do CMT disponíveis no GenBank-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e com auxílio do programa BLAST disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, alvos específicos foram selecionados para amplificação de DNA de *M. bovis*. Os iniciadores e sonda para *nested* PCR foram desenhados usando software *Primer Express* v2.0 (*Applied Biosystems*).

O alvo selecionado para amplificação foi a região TbD1, que compreende o gene *mmpS6* (ID: 1092456) e a região 5' de *mmpL6*. Essa região (TbD1) está presente em *M. bovis* (incluindo cepas de BCG), *M. africanum*, *M. canettii* e isolados ancestrais africanos de *M. tuberculosis*. Em linhagens modernas de *M. tuberculosis*, *mmpS6* está ausente e *mmpL6* é truncado [03,16,17].

Dois conjuntos de iniciadores foram desenhados: iniciadores externos, para a amplificação por PCR convencional, e os iniciadores internos e sonda, para amplificação por PCR em tempo real com *TaqMan* MGB. A primeira reação foi incluída para enriquecer o DNA de *M. bovis*, uma vez que a concentração relativa mais elevada do DNA do hospedeiro isolado de tecidos de bovinos, pode

interferir na amplificação do gene alvo. As sequências dos iniciadores e da sonda são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores e sonda utilizadas na primeira reação (PCR convencional) e na segunda reação (PCR em tempo real) para TbD1 de *Mycobacterium bovis*.

Região alvo	Sequência de DNA
TbD1	Iniciador externo 5'-3': GTGGCGGTTCGCGGGATTTCAGCGTCTAT
	Iniciador externo 3'-5': GCGGTCTTCGCCAATGTT
	Sonda: 6FAM TCGCGCAAGGCGA MGBNFQ
	Iniciador interno 5'-3': GCAGCCGATGGAATTGCT
	Iniciador interno 3'-5': TTATGGCGGCCACACCCACCCAAAACAG

Padronização de *Nested PCR*

A PCR convencional (primeira reação) foi realizada em volume de 25 µL, contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3); 50 µM de KCl; 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 7,5 pmol de cada iniciador, 1,25 U de *Taq DNA* polimerase (Sigma) e 400 ng de DNA.

A reação de PCR em tempo real (segunda reação) para CMT foi realizada com volume total de 12,5 µL, contendo 6,25 µL de *TaqMan Master Mix* (ref 4352042, *Applied Biosystems*), 600 nM de cada iniciador, 100 nM de sonda e 3 µL do produto da primeira reação de PCR.

A amplificações foram realizadas em termociclador MJ Mini (Biorad). Uma etapa de desnaturação inicial foi realizada a 95°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 90 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 45 segundos. Um ciclo final de extensão a 72°C por 3 minutos foi realizado. Para amplificação por PCR em tempo real, as amostras foram realizadas em termociclador *Step One Plus* (*Applied Biosystems*, USA). Uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 62°C por 30 segundos.

Para todas as reações de *nested PCR*, um controle positivo com DNA de *M. bovis* AN5, um controle negativo sem DNA e um controle negativo com DNA de *M. tuberculosis* H37Rv foram incluídos.

A especificidade analítica dos iniciadores e sonda para *M. bovis* foi avaliada com 50 ng de DNA de *C. pseudotuberculosis*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. smegmatis* e *R. equi*. Uma vez que TbD1 está ausente em cepas modernas de *M. tuberculosis*, a cepa H37Rv também foi testada na análise da especificidade analítica de *nested* PCR.

Para avaliar a presença de inibidores de PCR, alíquotas de DNA das espécies acima usadas para avaliar a especificidade foram contaminadas artificialmente com DNA de *M. bovis* AN5 e testadas em *nested* PCR. As condições de amplificação foram as mesmas utilizadas para o alvo específico.

Os iniciadores e a sonda foram avaliados quanto à sensibilidade analítica com diluições seriadas de DNA da cepa de referência *M. bovis* AN5, em triplicata, mas com um *mix* de reação para cada réplica. As amostras de DNA foram testadas por PCR em tempo real e PCR convencional de forma isolada e *nested* PCR (reações convencional e em tempo real). Para *nested* PCR o volume da primeira reação foi de 25 µL.

Os iniciadores e sonda foram também testados quanto à sensibilidade analítica com DNA extraído de 92 culturas de *M. bovis* obtidas a partir de lesões de bovinos naturalmente infectados, fornecidas pelo LANAGRO e Instituto Biológico.

Detecção direta de *Mycobacterium bovis* em tecidos de bovinos e búfalos

A detecção direta de *M. bovis* em homogeneizados de tecidos foi realizada com amostras de tecido de 167 bovinos e 62 búfalos (*Bubalus bubalis*) de rebanhos comerciais. Nenhum animal foi sacrificado para este estudo. As amostras foram coletadas durante a inspeção sanitária de rotina em frigoríficos nos grupos:

a) 127 animais positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC+) incluindo 80 com lesões compatíveis com tuberculose (LCT) e 47 sem lesões visíveis (SLV). Estes animais de diferentes faixas etárias e categorias zootécnicas (leite e carne) foram abatidos seguindo as recomendações do PNCEBT [11].

b) 51 animais negativos ao TCC (TCC-) e SLV. Esses animais eram provenientes de uma fazenda de exploração mista (leite e carne) com história prévia de tuberculose.

c) 51 animais sem registro de TCC, mas com LCT, e originários de uma fazenda de exploração mista, detectados durante as inspeções de rotina nos frigoríficos.

Testes cervicais comparativos foram realizados de acordo com os regulamentos do PNCEBT [11]. Uma reação TCC+ foi definida como aumento relativo da espessura da pele no local de aplicação de PPD (*Purified Protein Derivative*) bovino de no mínimo 4 mm maior do que o aumento da espessura da pele no local de aplicação da PPD aviária [11].

Para este estudo, LCT foram obtidas de linfonodos: hepáticos, ilíacos, mediastínicos, mesentéricos, pré-escapulares, retrofaríngeos e traqueobrônquicos, ou de pulmões, amígdalas, fígado e diafragma. Quando o animal não apresentava lesões visíveis, linfonodos hepáticos, mediastínicos, mesentéricos, retrofaríngeos e traqueobrônquicos foram coletados. Os órgãos foram conservados sob refrigeração até chegarem ao laboratório, onde foram mantidos à temperatura de -30°C até processamento. Os órgãos foram descongelados e divididos em duas alíquotas: uma para a cultura e isolamento e outra para a extração de DNA.

Para extração de DNA, as amostras foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 100 mg, correspondente à transição entre as áreas de lesões macroscópicas e aparentemente saudáveis. Estas peças foram completamente homogeneizadas com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS – *Phosphate Buffered Saline*). A partir destas suspensões, 200 µL foram utilizados para extração de DNA com kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Reações de *nested* PCR foram realizadas como descritas acima.

Para cultura, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas com uma quantidade equivalente de areia estéril e solução salina. As suspensões de tecido foram filtradas em gaze estéril e centrifugadas a 1200 xg durante 15 minutos. Os sedimentos foram suspensos em 2 mL de solução salina estéril, utilizando o método de descontaminação de Petroff [18] e cultivadas em meio Stonebrink. As culturas foram incubadas a 37°C e procurou-se por colônias durante pelo menos 90 dias, com observações semanais. Os esfregaços das colônias isoladas foram corados pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) para bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR). Todas as culturas de BAAR foram analisadas por PCR para CMT com os iniciadores JB21 e JB22 [15].

Os animais foram considerados positivos para a tuberculose quando em ao menos uma amostra de tecido houve amplificação em *nested* PCR ou culturas apresentaram colônias de BAAR confirmadas por PCR com os iniciadores JB21 e JB22. Os bovinos ou bubalinos foram considerados negativos para tuberculose quando as culturas não apresentaram nenhuma colônia BAAR ou quando eram BAAR, mas negativas na PCR para CMT com iniciadores JB21 e JB22 e quando os tecidos foram negativos por *nested* PCR.

A análise estatística

A concordância entre *nested* PCR e cultura foi avaliada pelo índice *Kappa*, tal como descrito por Ansari-Lari [19]. Comparações pareadas foram realizadas pelo teste de McNemar, com nível de significância de 0,05. O teste de Qui-quadrado e teste exato de Fisher foram realizados para avaliar a associação entre as variáveis categóricas, com o nível de significância de 0,05. O qui-quadrado para tendência linear também foi utilizado e, sempre que possível, regressão logística univariada foi realizada para avaliar se houve uma relação de dependência entre os níveis de evidência presuntiva para a tuberculose bovina e o diagnóstico do agente. Com base em uma combinação de ambos os diagnósticos (TCC e LCT) e resultado de *nested* PCR para cada nível de "exposição", um *odds ratio* foi calculado para comparar a proporção de resultados positivos com nível básico ou nível 0 (TCC negativo e sem lesões visíveis) [20].

Resultados

A análise *in silico* dos iniciadores e sonda para TbD1 são mostrados na Figura 1. Identidade completa com *M. bovis* AF2122/97 e diferentes cepas de *M. bovis* BCG, *M. africanum* e *M. canettii* disponíveis no GenBank-NCBI. Uma completa identidade também foi encontrada com sete cepas de *M. bovis* da Argentina e 11 cepas de *M. bovis* do Brasil, cujos genomas foram sequenciados por este grupo de pesquisa. Para *M. tuberculosis*, os iniciadores e sonda apresentaram identidade completa com uma cepa ancestral (número de acesso no GenBank AJ426486) [03], mas não foi detectada homologia com as cepas de *M. tuberculosis* modernas disponíveis no GenBank.

Não houve amplificação nos seguintes casos: DNA da cepa *M. tuberculosis* H37Rv ou de isolados clínicos de *M. tuberculosis*; DNA de cepas de referência de micobactérias não-tuberculosas *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. kansasii* e *M. smegmatis*; DNA de outros Actinomycetales: *C. pseudotuberculosis*, *R. equi*.

Alíquotas de DNA de bactérias não-alvo artificialmente contaminadas com DNA de *M. bovis* AN5 foram positivas por *nested* PCR.

Os níveis de detecção encontrados para sensibilidade analítica utilizando DNA de *M. bovis* AN5 foram até 1,56 ng por PCR convencional, 97,6 pg por PCR em tempo real e 1,53 pg por *nested* PCR. Das 50 amostras de DNA (de cultivo) isoladas a partir de lesões de animais naturalmente infectados com *M. bovis* cedidas pelo Ministério da Agricultura - LANAGRO, 49 (98,0%) foram positivas em *nested* PCR para *M. bovis*. Todas as 42 (100%) amostras de DNA isoladas de culturas de *M. bovis* do Instituto Biológico, São Paulo, foram positivas por *nested* PCR para *M. bovis*.

Amostras de tecido de 229 bovinos e ou bubalinos foram testadas diretamente por *nested* PCR para *M. bovis*. Os resultados de *nested* PCR e cultura estão mostrados na Tabela 3. Alíquotas de DNA de tecidos sem lesão e negativas em *nested* PCR foram contaminadas artificialmente com DNAs de *M. bovis* e re-testadas com *nested* PCR cepa AN5 mostrando resultados positivos. Dos 51 animais com resultados TCC- e SLV, 50 exibiram culturas negativas. Estes 50 animais foram incluídos no cálculo da especificidade clínica, que foi de 100%. Dos 50 animais com resultados TCC+ LCT e culturas positivas, 38 também foram positivos por *nested* PCR, o que corresponde a uma sensibilidade clínica de 76,0%.

	70	80	90	100	110	120	310	320	330	340	350	360	490	500	510	520	530	540
Iniciadores e sondas	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MB_Ak2122/9/	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC		CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC				CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA					
MB_AN5	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB09-1192_ii	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB09-1193_ii	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB534_ii	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB04-303_ii	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB05-566_ii	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB05-567_ii	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB09-1191_ii	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB18-08C	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB45-08B	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB05-566	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB0822-11	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB35	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB50	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB08-08BF2	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB49-09	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB32-08	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB61-09	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB_Pasteur_1173	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB_Tokyo_172_BC	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB_Moreau_RDJ_B	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB_Mexico_BCG	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MB_Korea_1168P	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MT_TbD1	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MC_CIPT_1400700	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MC_CIPT_1400600	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			
MA_GM041182	GCGGTG	GTGGCGGT	CGCGGGATT	CAGCGTCTA	CGGTTGCACGGCAT	CTTCGGCTCGCAC	ACCCCTGCCG	CGGTCCTCGCCAATGTT	GTGCGCAAGGCGAG	CAGCAATTCCATCGGCTGC			ACACCATCCGACGGCTTT	CGTTGCCGATCTTG	CTGTTTGGGTGGGTGTGGCCGCCATAA			

MB = *Mycobacterium bovis*

MT = *Mycobacterium tuberculosis* cepa ancestral AJ426486

MC = *Mycobacterium canettii*

MA = *Mycobacterium africanum*

Figura 1 . Análise *in silico* das sequências dos iniciadores e sondas para TbD1 de *Mycobacterium bovis*. As áreas destacadas em preto indicam identidade nucleotídica entre os isolados.

Tabela 3. Resultados de *nested* PCR para TbD1 de *Mycobacterium bovis* e cultura de
homogeneizados de tecido de bovinos e bubalinos.

Condição		Número Total	Teste		Valor de P	Odds ratio	
<i>Ante-mortem</i>	<i>Post-mortem</i>		Cultura* (%)	<i>Nested</i> PCR (%)		Cultura	<i>Nested</i> PCR
TCC-	SLV	51	1 (1,96)a	0 (0,00)a	1	1,00A	1,00A
Sem TCC	LCT	51	11 (21,57)a	21 (41,18)b	0,0329	13,75B	72,61B
TCC+	LCT	80	50 (62,50)a	49 (61,25)a	0,8707	15,27B	59,10B
	SLV	47	11 (23,40)a	17 (36,17)a	0,176	83,33C	161,86C
Total		229	73 (31,88)	87 (37,99)	0,17	---	---

TCC = Teste cervical comparativo

LCT = Lesão compatível com tuberculose

SLV = Sem lesões visíveis

*Confirmado por PCR com iniciadores JB21 e JB22 [15]

Valor de P para Qui-quadrado de tendência linear < 0,001

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) nas comparações pareadas dos testes cultura e *nested* PCR

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam proporções diferentes de positivos ($p < 0,05$)

Com relação à concordância entre *nested* PCR e cultura, houve 51 animais *nested* PCR e cultura positiva (22,27%), 120 animais *nested* PCR e cultura negativa (52,40%), 36 animais *nested* PCR+ e cultura negativa (15,72%), e 22 animais *nested* PCR negativo e cultura positiva (9,61%). A concordância avaliada pelo índice *Kappa* foi de 0,445, com erro padrão de 0,061 e um intervalo de confiança de 95% 0,325-0,565. O grau de concordância foi considerada moderada [19].

Não houve diferenças significativas entre *nested* PCR e cultivo na detecção de animais TCC+ com LCT ou SLV. Também não foram encontradas diferenças significativas na identificação de animais TCC negativos SLV. No entanto a *nested* PCR revelou um número significativamente maior de animais positivos quando comparado com cultura no grupo de animais sem histórico de TCC, mas com LCT ($p < 0,05$).

Houve uma tendência linear entre o aumento da evidência presuntiva da tuberculose bovina e as chances de resultados positivos em cultura ($p < 0,001$) ou *nested* PCR ($p < 0,001$). Os resultados presuntivos de TCC+ com LCT tiveram 13,75 e 15,27 vezes mais chance de um resultado positivo em

cultura e 59,10 e 72,61 vezes mais chance de um resultado positivo por *nested* PCR respectivamente, quando comparado com o grupo sem resultados presuntivos. No grupo com os dois resultados presuntivos positivos, LCT e TCC, houve 83,33 e 161,86 vezes mais chance de um resultado positivo em cultura e *nested* PCR quando comparado com o grupo sem resultados presuntivos, respectivamente (Tabela 3).

Discussão

Um dos sistemas mais importantes aplicados ao controle da tuberculose bovina por *M. bovis* é a vigilância epidemiológica de animais abatidos em frigoríficos. Esta vigilância é realizada por inspeção e coleta de amostras com LCT, confirmando a existência da infecção por meio da cultura e detecção molecular, que pode levar semanas, até que o resultado seja obtido [21].

O objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema *post-mortem* de diagnóstico para tuberculose bovina e bubalina aplicável diretamente a amostras clínicas, o qual poderia reduzir substancialmente o tempo entre a detecção de animais TCC+ com LCT e o diagnóstico etiológico quando comparado com o método tradicional de cultura, que pode demorar até 90 dias.

Um sistema de *nested* PCR visando o alvo TbD1 foi desenvolvido. Esta região compreende o gene *mmpS6* e a região 5' de *mmpL6*, que estão presentes nos genomas de *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* e cepas ancestrais de *M. tuberculosis* [03, 22]. Como esperado, a análise das sequências dos iniciadores e sonda para TbD1 exibiu identidade completa com as espécies descritas acima do CMT. No entanto, existe pouca informação genômica sobre as cepas de campo de *M. bovis* para avaliar a conservação das sequências alvo da *nested* PCR. Nosso grupo de pesquisa sequenciou os genomas de sete isolados de *M. bovis* da Argentina e 11 do Brasil e as sequências alvo foram conservadas em todas as 18 cepas (dados não mostrados).

A especificidade analítica de *nested* PCR foi analisada *in vitro*. Não houve amplificação quando os iniciadores e sonda para TbD1 foram usados com DNA de *M. tuberculosis* H37Rv ou a partir de amostras clínicas isoladas de culturas de *M. tuberculosis*. No entanto apenas H37Rv foi testado no presente estudo e este é um genótipo moderno de *M. tuberculosis* [23].

Há relatos de *M. tuberculosis* infectando bovinos em todo o mundo [24,25,26,27]. No Brasil mais de 2000 amostras de cultura de bovinos com lesões presuntivas de tuberculose foram testadas para *M. tuberculosis* no LANAGRO-MG (Ministério da Agricultura) e não houve resultados positivos (A. A. Fonseca Júnior, 2013, comunicação pessoal).

Não houve amplificação com os iniciadores e sonda para TbD1 quando DNA de micobactérias ambientais como *M. abscessus*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii* e *M. smegmatis* foram utilizadas. Isto é particularmente significativo uma vez que micobactérias ambientais presente em linfonodos e submetidas a testes de diagnóstico, podem confundir os ensaios que carecem de especificidade suficiente [34]. Além disso, Actinomycetales estreitamente relacionados com micobactérias tais como *R. equi* e *C. pseudotuberculosis* podem causar lesões similares à tuberculose e podem ser diagnosticados erroneamente [35, 36].

Neste estudo DNA de *M. africanum* ou *M. canettii* espécies que são TbD1+, não foram testadas por *nested* PCR para TbD1. No entanto, ambas as espécies são essencialmente agentes patogênicos de humanos [33,37] e não foram descritos no Brasil. Uma série de relatos de *M. africanum* em bovinos têm sido descritos na Europa e na Ásia [38,39]. A importância epidemiológica deste patógeno em bovinos deve ser esclarecida principalmente em países do novo mundo.

Tradicionalmente a sensibilidade e especificidade clínica para as reações de PCR para tuberculose são avaliadas com amostras de tecidos que são positivas ou negativas na cultura de *Mycobacterium* sp., uma vez que cultura é considerada o teste de diagnóstico “padrão ouro” para tuberculose [21]. Neste sentido, *nested* PCR apresentou sensibilidade clínica moderada e elevada especificidade clínica. No entanto, para utilização de uma ferramenta de diagnóstico adicional como parte de um programa de controle e erradicação da tuberculose animal, esta informação é limitada. Dependendo do estágio da doença ou mesmo a condição da amostra biológica, a PCR pode detectar mais animais positivos do que cultura [21] ou vice-versa [40,41]. A viabilidade é outro fator importante, já que as carcaças em frigoríficos com LCT exigem resultados rápidos de diagnóstico.

No presente estudo, 36 animais que foram detectados como positivos tanto pela *nested* PCR quanto por cultura, correspondem a 15,72% do número de amostras testadas. Outros indícios de que

estes animais estavam realmente infectados incluem a presença de outras evidências presuntivas da tuberculose em todos os animais (26 animais TCC+; 21 com LCT; 11 TCC+ e LCT). Por outro lado havia 22 animais positivos em cultura, mas negativos por *nested* PCR (9,61%). Uma vez que diferentes métodos de purificação de DNA a partir de tecidos podem influenciar na presença de inibidores de PCR da amostra a ser testada [42], alíquotas de DNA de tecidos de 22 culturas *+/nested* PCR- foram contaminadas com DNA de *M. bovis* cepa AN5 e re-testados por *nested* PCR, mostrando resultados positivos.

No Brasil o teste intradérmico é o método de diagnóstico *ante-mortem* oficial para tuberculose bovina e bubalina. Animais TCC+ são considerados positivos para tuberculose e devem ser abatidos em um período inferior a 30 dias [11], de preferência em um frigorífico oficial no qual amostras de tecido devem ser coletadas para o diagnóstico microbiológico. Neste estudo, a *nested* PCR para TbD1 e a cultura detectaram número semelhante de animais positivos no grupo TCC+ ($p = 0,5304$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre *nested* PCR e cultura dentro do grupo TCC negativos.

Durante a inspeção de abate em frigoríficos as principais preocupações são animais que exibem LCT, que são considerados inadequados para o consumo. No entanto nas amostras bovina e bubalina do presente estudo, 37% dos animais TCC+ não apresentaram lesões, dos quais 14,9% eram positivas tanto em cultura como por *nested* PCR. Isto levanta preocupações sobre a transmissão zoonótica de *M. bovis*, pois esta bactéria pode sobreviver ao processo de cozimento [43]. Por esta razão as políticas sanitárias que envolvem testes de PCR com animais TCC+ SLV devem ser consideradas.

No Brasil as carcaças que apresentam LCT durante as inspeções sanitárias de rotina são condenados para o consumo. Alguns países que importam carne do Brasil estão exigindo um diagnóstico etiológico dessas lesões. A *nested* PCR foi mais sensível que o cultivo ao detectar *M. bovis* em animais que não foram testados pelo TCC, mas apresentavam LCT durante as inspeções sanitárias nos frigoríficos. Uma das possíveis razões para esse resultado é que este grupo incluía 23 búfalos da Amazônia (Estado do Amapá), cujos tecidos foram transportados por um longo período em

altas temperaturas. Apesar de serem armazenadas em gelo as amostras começaram a deteriorar-se, resultando em culturas negativas, mas as reações de *nested* PCR foram positivas.

Várias abordagens têm sido utilizadas para aumentar a sensibilidade de PCR em tempo real quanto à detecção de *Mycobacterium* sp. diretamente de homogeneizados de tecido. Parra et al. [21] utilizando sonda de captura para isolar DNA a partir de homogeneizados de tecidos com micobactérias, conseguiram uma menor sensibilidade (65,6%) do que a encontrada no presente estudo. Taylor et al. [40] relataram sensibilidade de 70%, ao realizarem PCR diretamente sobre homogeneizados de tecidos embora a sensibilidade tenha aumentado para 91% quando incluíram processos de congelamento na fase de extração de DNA. Thacker et al. [34] utilizaram uma estratégia que foi semelhante ao do presente estudo, com PCR convencional seguido por uma reação em tempo real, mas utilizando os alvos IS6110, e detectaram 66,7% das amostras de tecidos bovinos positivas em cultura.

Uma das preocupações com o diagnóstico por *nested* PCR, particularmente em relação as reações de PCR em tempo real, é a possibilidade de contaminação cruzada. Durante todo o processo de extração de DNA as luvas foram trocadas com frequência. A extração de DNA foi realizada em capela com nível de biossegurança três, as reações de PCR foram feitas em capela de fluxo laminar com luz UV. Conjuntos separados de micropipetas foram utilizados para extração de DNA e PCR. Ponteiras com filtro foram usadas rotineiramente. Superfícies e equipamentos em contato com microtubos foram limpas antes de cada ensaio. Controles positivos (DNA *M. bovis* AN5) e negativos (sem DNA) foram sempre utilizados.

O diagnóstico por *Nested* PCR permitiu a identificação de *M. bovis* em tecidos com um desempenho que foi semelhante ou superior ao obtido por cultura. Os resultados individuais de *nested* PCR foram alcançados em um curto período de tempo (2 dias), em contraste com o resultado de cultura, que levou até 90 dias. Isto sugere que *nested* PCR pode ser usada para o diagnóstico etiológico *post-mortem* de tuberculose bovina e bubalina durante as inspeções de rotina nos frigoríficos. No entanto um estudo em larga escala e uma validação inter-laboratorial são necessários para determinar se o método é adequado para o PNCEBT.

Finalmente, houve uma tendência linear positiva confirmando uma relação de dependência

entre o aumento de resultados presuntivos em nível negativo (TCC- e NVL) e nível positivo (TCC+ e LCT), bem como *odds ratio* para resultados positivos em cultura e *nested* PCR. Dependência e análise de tendências são comumente empregadas em epidemiologia e saúde pública. No presente estudo a dependência mostrou-se útil para demonstrar a lógica dos resultados laboratoriais com os dados clínicos dos animais e auxiliar o processo de tomada de decisão em testes de diagnóstico relacionados com a vigilância sanitária animal e inspeção de alimentos.

Referências

1. Wells AQ (1937) Tuberculosis in wild voles, Lancet 1, 1221.
2. Castets, M, Sarrat H (1969) Experimental study of the virulence of *Mycobacterium africanum* (preliminary note). Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr 14: 693-696.
3. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, et al. (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. ProcNatlAcadSci EUA 99: 3684-3689.
4. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L (2003) Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53: 785-1789.
5. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, et al. (2003) Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J SystEvolMicrobiol 53: 1305-1334.
6. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, et al. (2010) Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerg Infect Dis 16: 1296-1299.
7. Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, et al. (2012) Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. Emerg Infect Dis 18: 653-655.
8. Alfredsen S, Saxegaard F (1992) An outbreak of tuberculosis in pigs and cattle caused by *Mycobacterium africanum*. Vet Rec 131: 51-53.
9. Johansen IS, Thomsen VO, Forsgren A, Hansen BF, Lundgren B (2004) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens with necrotizing granulomatous inflammation by strand displacement amplification. J MolDiagn 6: 231-236.

10. Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laise CJ, et al. (2013) Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 19: 899-908.
11. Brasil (2006) Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT. Manual Técnico, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 190 p.
12. Brasil (2012) Norma Interna DAS nº02/2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.
13. Duffield BJ, Norton JH, Hoffmann D (1989) An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic *mycobacteria* from cattle in northern Queensland. *Aust J Vet* 66: 307-308.
14. Soini H, Musser JM (2001) Molecular diagnosis of mycobacteria. *ClinChem* 47: 809-814.
15. Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA (1995) Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 141: 2131-2138.
16. Mostowy S, Inwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, et al. (2005) Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol* 187: 6386-6395.
17. Lahlou O, Millet J, Chaoui I, Sabouni R, Filali-Maltouf A, et al. (2012) The genotypic population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Moroccan patients reveals a predominance of Euro-American lineages. *Plos One* 7: 47113.
18. Petroff SA (1915) A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *J Exp Med* 21:38-42.
19. Ansari-Lari M (2005) Comparison between two tests results, kappa statistic instead of simple overall agreement. *Veterinary Parasitol* 133: 369-370.
20. Schlesselman JJ (1982) Case-Control Studies, Oxford Univ. Press, NY, p. 205.
21. Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, et al. (2008) Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 127: 315-324.
22. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, et al. (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7877-7882.
23. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
24. Ameni G, Vordermeier M, Firdessa R, Aseffa A, Hewinson G, et al. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. *Vet J* 188: 359-361.
25. Romero B, Rodríguez S, Bezos J, Díaz R, Copano MF, et al. (2011) Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. *Emerg Infect Dis* 17: 2393-2395.

26. Mbugi EV, Katale BZ, Kendall S, Good L, Kibiki GS, et al. (2012) Tuberculosis cross-species transmission in Tanzania: Towards a One-Health concept, Onderstepoort. J Vet Res 79:1-6.
27. Thakur A, Sharma M, Katoch VC, Dhar P, Katoch RC (2012) Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance. Indian J Microbiol 52: 289-291.
28. Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Thonnon J, Vincent V, et al. (2004) Molecular characteristics of strains of the cameroon family, the major group of *Mycobacterium tuberculosis* in a country with a high prevalence of tuberculosis. J ClinMicrobiol 42: 5029-5035.
29. Stavrum R, Valvatne H, Bø TH, Jonassen I, Hinds J, et al. (2008) Genomic diversity among Beijing and non-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar. Plos One 3: 1973.
30. Tanveer M, Hasan Z, Siddiqui AR, Ali A, Kanji A, et al. (2008) Genotyping and drug resistance patterns of *M. tuberculosis* strains in Pakistan. BMC Infect Dis 8: 171.
31. Beyene D, Bergval I, Hailu E, Ashenafi S, Yamuah L, et al. (2009) Identification and genotyping of the etiological agent of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia. J Infect Dev Ctries 3: 412-419.
32. Banu S, Uddin MK, Islam MR, Zaman K, Ahmed T, et al. (2012) Molecular epidemiology of tuberculosis in rural Matlab. Bangladesh. Int J Tuberc Lung Dis 16: 319-326.
33. Thomas SK, Iravatham CC, Moni BH, Kumar A, Archana BV, et al. (2011) Modern and ancestral genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* from Andhra Pradesh, India. Plos One 6: 27584.
34. Thacker TC, Harris, B, Palmer MV, Waters WR (2011) Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. BMC Vet Res 7:50.
35. Flynn O, Quigley F, Costello E, O'Grady D, Gogarty A, et al. (2001) Virulence-associated protein characterization of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. Vet Microbiol 78: 221-228
36. Sahraoui N, Müller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, et al. (2009) Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. BMC Vet Res 5: 4.
37. Niemann S, Richter E, Rüschoff-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.
38. Weber A, Reischl U, Naumann L (1998) Demonstration of *Mycobacterium africanum* in a bull from North Bavaria. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 111: 6-8.

- 492 39. Rahim Z, Möllers M, teKoppele-Vije A, de Beer J, Zaman K, et al. (2007) Characterization of
493 *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using
494 spoligotyping. Southeast Asian J Trop Med Public Health 38: 706-713.
- 495 40. Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG (2007) Rapid detection of
496 *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. BMC Vet Res
497 3:12.
- 498 41. Costa P, Ferreira AS, Amaro A, Albuquerque T, Botelho, A Couto I, Cunha MV, Viveiros M,
499 Inácio J (2013). Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal tissues using a semi-
500 nested probe-based real-time PCR. PlosOne 8:e81337.
- 501 42. Barandiaran S, Garbaccio SG, Kiernicki MC, Martinez Vivot, M, Zumarraga MJ (2013)
502 Evaluación de distintas metodologías de extracción de ADN para la detección de *Mycobacterium*
503 *bovis* em tejidos. Rev Argent Microbiol 45: 91.
- 504 43. Van der Merwe M, Bekker JL, van der Merwe P, Michel AL (2009) Cooking and drying as
505 effective mechanisms in limiting the zoonotic effect of *Mycobacterium bovis* in beef. J S Afr Vet
506 Assoc 80: 142-145.