

Avaliação de um método molecular para diagnóstico alternativo de tuberculose bovina *in vivo*

BEZERRA, A.V.A.¹, MAYER, F.Q.²

¹ Bolsista Probic/Fapergs, Fepagro Saúde Animal – Eldorado do Sul
² Pesquisador, Fepagro Saúde Animal – Eldorado do Sul



UFRGS
PROPEAQ

XXV SIC
Salão Iniciação Científica

CA - Ciências Agrárias

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma zoonose reemergente, que representa riscos econômicos e de saúde pública em diversos países. O diagnóstico da doença no animal vivo é realizado através do teste intradérmico da tuberculina, que se baseia em reações de hipersensibilidade tardia. Por ser uma doença com resposta imunológica complexa, este teste possui limitações de sensibilidade e especificidade. O presente estudo buscou desenvolver uma abordagem alternativa para o diagnóstico *in vivo* da tuberculose bovina, baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR).

MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de suabes nasais de vacas vivas, provenientes de propriedades de assentamento em Eldorado do Sul. Paralelamente com a coleta das amostras, o teste da tuberculina foi realizado. A extração de DNA foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio. Após a extração, as amostras foram quantificadas em Nanodrop 1000. A presença de inibidores no DNA foi verificada através da realização de PCR convencional para o gene da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Para a detecção dos complexos *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* realizou-se PCR em tempo real com SYBR® Green (Life Technologies) capaz de diferenciar os complexos em uma reação única, através da análise da curva de dissociação. A análise estatística foi realizada com programa WinEpiscope versão 2.0 para comparar os resultados obtidos com o teste da tuberculina e PCR em tempo real, determinando assim a sensibilidade e especificidade do método molecular e coeficiente de concordância e correlação entre os métodos.

Figura 1: Fluxograma dos métodos utilizados neste estudo.

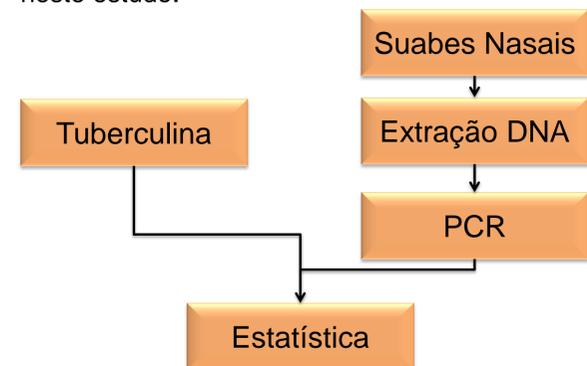


Tabela 1: Resultado do teste da tuberculina e tecidos inspecionados no abatedouro.

Animal	Resultado	Tecido	Lesões visíveis
1	Inconclusivo	Linfonodo	Sim
2	Inconclusivo	Pulmão	Não
3	+	Linfonodo e pulmão	Sim
4	+	Linfonodo e pulmão	Não
5	+	Linfonodo e pulmão	Não
6	+	Linfonodo	Sim
7	+	Linfonodo	Sim
8	+	Linfonodo e pulmão	Sim
9	+	Fígado	Sim
10	+	Pulmão	Sim
11	+	Pulmão	Não
12	+	Linfonodo	Sim
13	+	Pulmão	Não
14	+	Linfonodo	Sim
15	Inconclusivo	Linfonodo	Não
16	+	Não testado	Não testado
17	Inconclusivo	Linfonodo	Não
18	+	Pulmão	Sim
19	+	Pulmão	Sim
20	+	Linfonodo e pulmão	Não
21	+	Pulmão	Não
22	Inconclusivo	Fígado	Não
23	+	Não testado	Não testado
24	+	Pulmão	Sim
25	Inconclusivo	Pulmão	Não

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 238 animais, dos quais 192 foram incluídos no estudo por apresentarem amostras positivas para o *GAPDH*. Dos 192 animais, 25 tiveram resultado positivo no teste da tuberculina, sendo encaminhados para abate (Tabela 1). A técnica de PCR em tempo real para detectar bactérias dos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium* em amostras de suabes nasais mostrou sensibilidade de 0 % e 4 %, respectivamente, em relação ao teste da tuberculina. A especificidade do método foi de 98,2 % para ambos os complexos (Tabela 2). Baixos valores do coeficiente de concordância (*kappa*) e correlação (Pearson) foram observados (Tabela 3). Uma possível explicação para a baixa eficácia do método é que a carga bacteriana expelida pelos mucos nasais pode ser muito baixa, ainda assim mantendo o potencial de transmissão da doença. A sensibilidade analítica da PCR em tempo real utilizada neste estudo foi de 100 moléculas de DNA bacteriano (Mayer et al, 2012). Além disso, outra possível explicação é que dentre os 25 animais abatidos, apenas 12 apresentavam lesões macroscópicas características de tuberculose e dentre estas, apenas 6 eram pulmonares (Tabela 1).

Tabela 2: Resultado da técnica de PCR em tempo real.

Tuberculina	Complexo <i>M. tuberculosis</i>		Complexo <i>M. avium</i>		Total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Negativo	164	3	164	3	167
Positivo	25	0	24	1	25
Total	189	3	188	4	192

Tabela 3: Análise de concordância e correlação dos testes realizados.

	<i>Kappa (P)</i>	Pearson (P)
Tuberculina * complexo <i>M. avium</i>	0,034 (0,472)	0,052 (0,474)
Tuberculina * complexo <i>M. tuberculosis</i>	-0,029 (0,499)	-0,049 (0,502)

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a técnica molecular para diagnóstico *in vivo* de tuberculose bovina a partir de suabes nasais, nas condições testadas, não foi eficiente. Desta forma, o teste da tuberculina ainda a melhor opção para o diagnóstico *in vivo* da doença.



MODALIDADE
DE BOLSA

PROBIC/FAPERGS