

Desenvolvimento de métodos moleculares aplicados ao diagnóstico *post-mortem* de tuberculose bovina

REIS, E.M.¹, MAYER, F.Q.²

¹ Bolsista CNPq/FINEP, Fepagro Saúde Animal – Eldorado do Sul
² Pesquisador, Fepagro Saúde Animal – Eldorado do Sul



INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma doença infecto-contagiosa, reemergente de abrangência mundial, causada por *Mycobacterium bovis*. A doença, por ser uma zoonose, representa risco para a saúde humana e é responsável por perdas econômicas para o setor pecuário. Os métodos empregados no diagnóstico da tuberculose bovina exercem um papel fundamental no controle desta enfermidade, sendo o isolamento bacteriano considerado o diagnóstico definitivo em exames *post-mortem*. Entretanto, esta abordagem possui limitações como baixa sensibilidade, dificuldade de realização, variabilidade nos processos de identificação e crescimento lento do agente. Uma estratégia alternativa para superar estas limitações é a utilização de métodos moleculares, nos quais a análise de fragmentos de DNA permite a detecção e identificação do agente causador da doença.

OBJETIVO

O objetivo do estudo foi desenvolver um método alternativo para diagnóstico *post-mortem* da tuberculose bovina através da técnica de PCR e comparar os resultados com o padrão ouro.

MÉTODOS

Os métodos utilizados no estudo estão esquematizados na Figura 1. Até o momento, foram analisadas 141 amostras de tecido de bovinos recebidas no Laboratório de Histopatologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) ou coletadas em abatedouros nos casos de abates sanitários, realizados a fim de eliminar animais com resultado positivo para o teste da tuberculina. As amostras foram submetidas ao isolamento bacteriano, coloração por *Ziehl Neelsen*, análise histopatológica e análise molecular. A extração de DNA a partir dos tecidos foi realizada por protocolo de fenol-clorofórmio. A presença de inibidores no DNA foi verificada através de PCR convencional para o gene da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Para a detecção de DNA de *Mycobacterium bovis*, uma PCR convencional foi projetada. A análise estatística foi realizada com programa WinEpiscope versão 2.0 para comparar os resultados obtidos nos testes, a fim de determinar a sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares e coeficiente de concordância (*Kappa*) entre os diferentes métodos. Ainda, os dados das análises e os resultados de tuberculina dos animais foram comparados através de análise de associação utilizando teste de qui-quadrado.

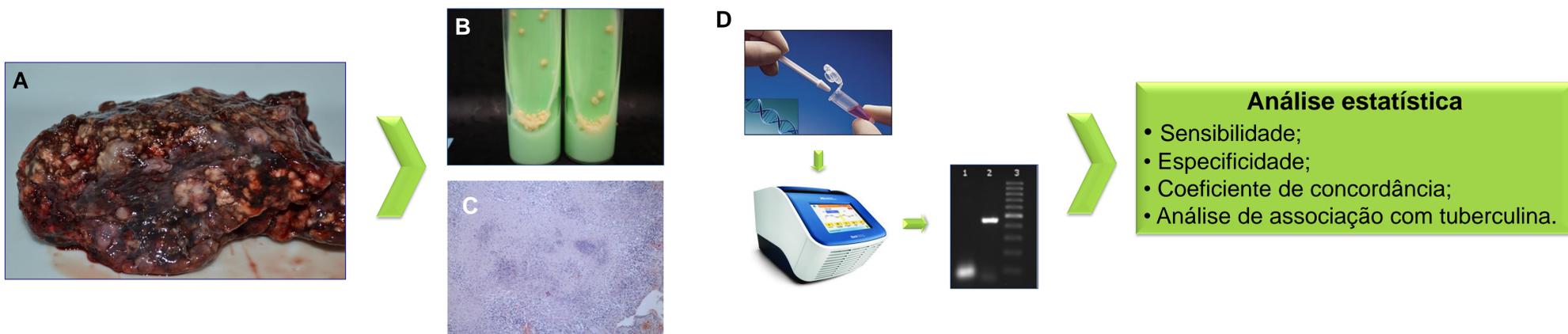


Figura 1: A. Amostra de pulmão com tuberculose; B. Colônias bacterianas de *M. Bovis*; C. Análise histopatológica de pulmão com granuloma; D. Análise Molecular.

RESULTADOS

Os resultados preliminares mostram que, quando comparada ao isolamento bacteriano ($n = 86$), a sensibilidade da PCR convencional para *M. bovis* foi de 77,78 % e especificidade de 82,85 % ($kappa = 0,5169$) (Tabela 1). Em relação à análise histopatológica ($n = 91$), a PCR convencional teve uma sensibilidade de 84,21 % e especificidade de 98,61 % ($kappa = 0,8616$) (Tabela 2). A análise de associação entre os resultados da tuberculina com o isolamento, histopatologia ou teste molecular mostra que houve associação apenas entre a histopatologia e tuberculina e análise molecular e tuberculina (Tabela 3).

Tabela 1: Análise de concordância entre os resultados de PCR e de isolamento bacteriano.

PCR <i>M. bovis</i>	Isolamento bacteriano		Total
	Positivo	Negativo	
Negativo	14	4	18
Positivo	12	56	68
Total	26	60	86

Tabela 2: Análise de concordância entre os resultados de PCR e histopatologia.

PCR <i>M. bovis</i>	Histopatologia		Total
	Positivo	Negativo	
Negativo	16	3	19
Positivo	1	71	72
Total	17	74	91

Tabela 3: Análise de associação do resultado da tuberculina com os testes realizados.

	Teste de associação (p)
Tuberculina * isolamento bacteriano ($n = 76$)	0,114
Tuberculina * PCR <i>M. bovis</i> ($n = 127$)	0,039
Tuberculina*histopatologia ($n = 80$)	<0,001

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que os testes diagnósticos para tuberculose bovina são variáveis em relação à eficiência e que a análise molecular tem potencial de ser aplicada no diagnóstico da tuberculose bovina. No entanto, é necessário que um maior número de amostras seja analisado para se confirmar esta proposição.



MODALIDADE DE BOLSA

CNPq/FINEP