

## INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (bTB) é uma zoonose com impactos para saúde animal e economia. Para o diagnóstico *post-mortem* de bTB, o agente etiológico *Mycobacterium bovis* precisa ser isolado a partir de amostras biológicas com lesões sugestivas. No entanto, este procedimento requer tempo e instalações de biossegurança de nível 3. Portanto, métodos como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e análise histopatológica podem fornecer uma alternativa para resultados mais seguros e rápidos. O objetivo principal deste estudo foi validar um método molecular por PCR para o diagnóstico *post-mortem* de bTB.

## METODOLOGIA

- Limites de detecção da PCR avaliados por curva de sensibilidade;
- Amplicon *M. bovis* 436 pb inserido em plasmídeo TOPO TA Cloning® (Invitrogen, USA)
- Transformação em *E. coli* competentes
- Extração de DNA plasmideal e diluição com número de moléculas de DNA conhecido;

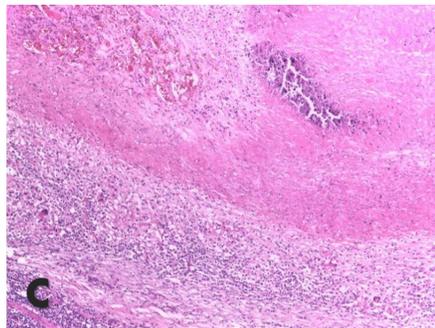
179 amostras de bovinos submetidas a diagnóstico



Isolamento bacteriano



Histopatologia



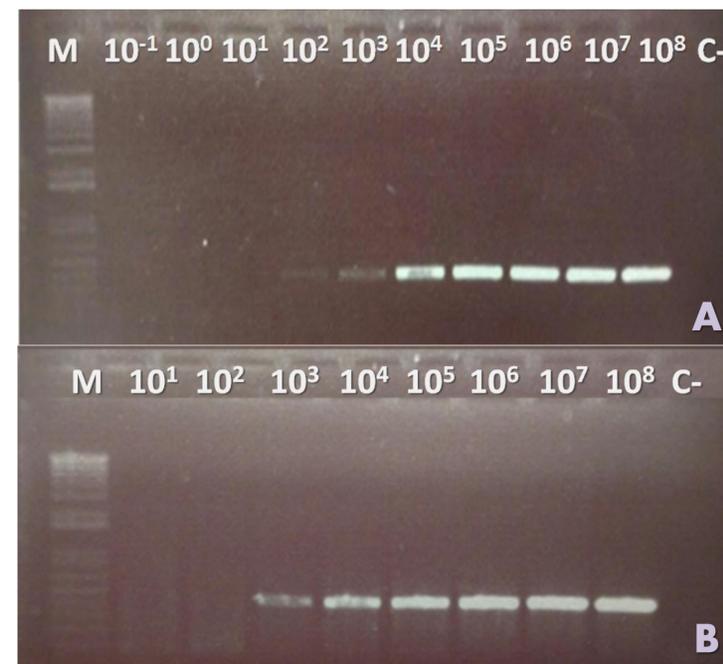
PCR para *M. bovis*



**Figura 1.** A) Linfonodo com lesão sugestiva de tuberculose. B) Cultura de *Mycobacterium* spp. em meio Löwenstein-Jensen C) Análise microscópica de linfonodo, coloração HE (aumento de 400x).

## RESULTADOS

Na curva de sensibilidade (Figura 2), a PCR foi capaz de detectar  $10^2$  moléculas de DNA de *M. bovis* na presença de matriz biológica, e  $10^3$  na sua ausência.



**Figura 2.** Curva de sensibilidade padrão sem matriz biológica (A) e com matriz biológica (B). Gel de agarose 1%.

O desempenho dos métodos estão demonstrados na Tabela 1. Como o desempenho da PCR não foi satisfatório, foi investigado se os estágios da lesão influenciariam a capacidade de detecção de *Mycobacterium* por PCR. Os resultados mostraram que, em estágios avançados de lesão, a sensibilidade da PCR foi maior (45,3%) em relação aos estágios iniciais (28,0%), embora o número de amostras avaliadas nos estágios iniciais tenha sido menor.

**Tabela 1.** Resultados dos testes comparados com o Isolamento bacteriano através pelo Software Stata 12.0

|                | PCR   | Histopatologia | PCR e Histop |
|----------------|-------|----------------|--------------|
| Sensibilidade  | 45,07 | 71,23          | 37,84        |
| Especificidade | 83,33 | 83,02          | <b>95,33</b> |
| VPP            | 64,00 | 74,29          | 84,85        |
| VPN            | 69,77 | 80,73          | 68,92        |
| Kappa          | 0,29  | 0,54           | 0,36         |
| Concordância   | 68,16 | 78,21          | 71,82        |

## CONCLUSÕES

- A baixa sensibilidade da PCR pode ser explicada pelas baixas cargas bacterianas nas amostras, método de extração de DNA ou devido à variabilidade genética das bactérias;
- A histopatologia e o método de PCR poderiam ser aplicados juntos como um método de triagem, no qual resultados concordantes positivos seriam considerados o diagnóstico final e os resultados discordantes levariam as amostras ao isolamento bacteriano;
- Estudos futuros sobre métodos alternativos de extração de DNA devem ser realizados em busca de um melhor desempenho do teste.