

Identificação de *Mycobacterium bovis* em cepas micobacterianas isoladas espécimes clínicos humanos em um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro*

Identification of *Mycobacterium bovis* among mycobacterial isolates from human clinical specimens at a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil

Luciana Fonseca Sobral, Rafael Silva Duarte, Gisele Betzler de Oliveira Vieira, Marlei Gomes da Silva, Neio Boechat, Leila de Souza Fonseca

Resumo

Entre 2005 e 2006, 8.121 espécimes clínicos enviados ao Laboratório de Micobactérias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/Instituto de Doenças do Tórax, no Rio de Janeiro, RJ, foram inoculados em meio Löwenstein-Jensen contendo glicerol e piruvato. Desses espécimes, 79 isolados de micobactérias tiveram crescimento somente em meio com piruvato, sendo selecionados para a identificação presumtiva de *Mycobacterium bovis*. Esses isolados foram submetidos à identificação por testes bioquímicos, amplificação por PCR com *primers* específicos (Rv0577 e Rv1510) e teste de suscetibilidade à pirazinamida. Todas as cepas apresentaram padrões fenotípicos e genotípicos de *M. tuberculosis*, não sendo detectado *M. bovis*.

Descritores: Tuberculose; *Mycobacterium bovis*; Reação em cadeia da polimerase.

Abstract

In 2005 and 2006, 8,121 clinical specimens submitted to the Mycobacteriology Laboratory of the Clementino Fraga Filho University Hospital/Thoracic Diseases Institute, in the city of Rio de Janeiro, Brazil, were inoculated on Löwenstein-Jensen medium containing glycerol and pyruvate. There were 79 mycobacteria isolates that presented growth only on pyruvate-containing medium, and those isolates were selected for the presumptive identification of *Mycobacterium bovis*. The selected isolates were screened with biochemical tests, PCR amplification (with the specific primers Rv0577 and Rv1510), and pyrazinamide susceptibility tests. All of the strains isolated showed specific phenotypical and genotypical patterns characteristic of *M. tuberculosis*, and no *M. bovis* strains were detected.

Keywords: Tuberculosis; *Mycobacterium bovis*; Polymerase chain reaction.

Historicamente, *Mycobacterium bovis* tem sido associado à tuberculose pulmonar em crianças, geralmente devido ao consumo de leite cru de vacas infectadas.⁽¹⁾ Esse quadro ainda vigora em países em desenvolvimento, especialmente na África, onde há relatos de que *M. bovis* foi isolado em 10–20% das crianças com linfadenite cervical.⁽²⁾ Além disso, em países de média e alta renda, o padrão da infecção por *M. bovis* mudou, causando doença em caçadores,⁽³⁾ assim

como em indivíduos imunossuprimidos, como alcoolistas e pacientes infectados pelo HIV.⁽⁴⁾ Nos Estados Unidos, a infecção por *M. bovis* foi identificada em comunidades de imigrantes, particularmente naquelas com histórico de consumo de produtos lácteos não pasteurizados.⁽⁵⁾ Embora a tuberculose bovina tenha sido identificada no Brasil,⁽⁶⁾ não existem dados disponíveis sobre tuberculose humana causada por *M. bovis* no país. A falta de notificação

* Trabalho realizado no Laboratório de Micobactérias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/Instituto de Doenças do Tórax da Universidade Federal do Rio de Janeiro – HUCFF/IDT-UFRJ – e no Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Endereço para correspondência: Luciana Fonseca Sobral. Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Universidade Federal Fluminense, CEP 24210-130, Niterói, RJ, Brasil.

Tel. 55 21 2629-2435. Fax: 55 21 2629-2432. E-mail: lucianafonsecas@gmail.com

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), e International Clinical Operational and Health Services Research and Training Award, Edital ICOHRTA AIDS/TB 5 U2R TW006883-03. Luciana F. Sobral é bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Recebido para publicação em 8/12/2010. Aprovado, após revisão, em 2/5/2011.

talvez se deva ao fato de que poucos laboratórios de micobactérias utilizam meios de cultura contendo piruvato rotineiramente. Contudo, há um considerável interesse epidemiológico na prevalência da tuberculose zoonótica no Brasil. Além do mais, o fato de *M. bovis* ser naturalmente resistente à pirazinamida, um dos três medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose, dá ao isolamento e identificação de *M. bovis* em espécimes clínicos humanos uma finalidade prática no sentido de que esse conhecimento pode ajudar nas decisões sobre o tratamento. O Laboratório de Micobactérias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/ Instituto de Doenças do Tórax da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/IDT-UFRJ) recebe aproximadamente 5.500 amostras por ano. O hospital é um centro de referência para diagnóstico e tratamento de formas graves de doenças crônicas e agudas, e também da coinfeção tuberculose/HIV, no estado do Rio de Janeiro. O objetivo do presente estudo foi investigar a prevalência de *M. bovis* em pacientes do hospital.

Entre 2005 e 2006, todos os espécimes clínicos encaminhados ao Laboratório de Micobactérias do HUCFF/IDT-UFRJ foram descontaminados pelo método de Kubica,⁽⁷⁾ e 0,2 mL do material foram inoculados em dois tubos com meio de cultura Löwenstein-Jensen (LJ) contendo glicerol e em um tubo com meio LJ contendo piruvato. Os tubos foram incubados a 37°C por até 90 dias.⁽⁷⁾ A identificação fenotípica do complexo *M. tuberculosis* foi realizada por meio de testes bioquímicos (para produção de niacina, redução de nitrato e termoinativação da catalase).^(7,8) Os espécimes também foram submetidos a teste de suscetibilidade à pirazinamida, conforme descrito por Canetti et al.⁽⁹⁾: meio de cultura (pH = 5,0-5,2) + 100 mg/mL de pirazinamida. Nesse teste, a proporção crítica de pirazinamida é de 10%.⁽⁷⁾ Para a identificação molecular, a extração do DNA foi realizada segundo as diretrizes nacionais.⁽¹⁰⁾ A amplificação foi realizada de acordo com Huard et al.⁽¹¹⁾ com modificações. Resumidamente, foram preparadas duas misturas PCR, cada uma contendo 1,25 mL de DMSO; 2,5 mL de tampão 10x; 0,75 mL de cloreto de magnésio a 50 mM; 0,5 mL de dNTP a 10 mM (A, T, C e G); 13,8 mL de água purificada; 0,2 mL de Platinum Taq polimerase (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha); e 5 mL de

DNA bacteriano, em um volume final de 25 mL. A cada uma das misturas, adicionou-se 0,5 mL de um dos *primers* utilizados (Rv1510 e Rv0577).⁽¹¹⁾ A amplificação por PCR foi realizada da seguinte forma: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min; e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min. O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 1% contendo solução de brometo de etídio a 0.5% e observado sob luz UV.

No período do estudo, nosso laboratório recebeu 10.861 amostras clínicas para o diagnóstico de rotina de infecção micobacteriana, das quais 8.121 foram inoculadas em tubos contendo meio LJ + piruvato de sódio, produzindo 1.793 culturas positivas. Dessas, 79 cepas de micobactérias recuperadas dos espécimes clínicos tiveram crescimento somente no meio LJ contendo piruvato de sódio, e esses isolados foram selecionados para a identificação presumtiva de *M. bovis*. A triagem utilizando três testes bioquímicos – produção de niacina, redução de nitrato, e inativação da catalase – mostrou que 57 isolados pertenciam ao complexo *M. tuberculosis*, 14 eram micobactérias não tuberculosas e 8 cepas não cresceram em uma segunda cultura em um novo tubo com LJ (Tabela 1).

Todos os isolados do complexo *M. tuberculosis* apresentaram o perfil bioquímico padrão de *M. tuberculosis*: produção de niacina, redução de nitrato e negatividade para a catalase. Para a confirmação desses dados, alguns isolados foram aleatoriamente selecionados e submetidos a teste de suscetibilidade à pirazinamida. Scorpio et al.⁽¹²⁾ clonaram o gene da pirazinamidase (*pncA*) de *M. tuberculosis* e *M. bovis* e constataram que houve mutação apenas em cepas de *M. bovis* e de várias subespécies de BCG. Essa mutação faz

Tabela 1 – Fontes dos espécimes clínicos que deram origem a isolados identificados como pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* ou como micobactérias não tuberculosas.

Fonte do espécime clínico	Complexo <i>M. tuberculosis</i>	MNT
Pulmonar	45	14
Extrapulmonar	10	0
Desconhecida	2	0
Total	57	14

MNT: micobactérias não tuberculosas.

com que *M. bovis* e BCG sejam intrinsecamente resistentes à pirazinamida. Jong et al.⁽¹³⁾ utilizaram o teste da pirazinamida para identificar *M. bovis* entre 1.526 isolados e constataram que todos os 11 isolados de *M. bovis* eram resistentes à pirazinamida, em comparação a apenas 1,3% dos isolados de *M. tuberculosis*. Dos 28 isolados identificados como *M. tuberculosis* no presente estudo, apenas 3 se mostraram resistentes à pirazinamida. Ao se fazer o diagnóstico diferencial entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*, é aconselhável utilizar não apenas testes fenotípicos, mas também marcadores genotípicos,⁽¹⁴⁾ e várias técnicas de biologia molecular vêm sendo utilizadas com sucesso na caracterização de isolados de *M. tuberculosis*. Huard et al.⁽¹¹⁾ desenvolveram um painel de PCR baseado nas deleções encontradas no complexo com a finalidade de identificar essas espécies, utilizando sete *primers* que amplificaram regiões dentro dos *loci* de 16S rRNA. No presente estudo, optamos por realizar a PCR com dois pares de *primers* (Rv1510 e Rv0577) para melhor identificação dos isolados de *M. tuberculosis*. O gene *Rv0577* está presente em todas as espécies do complexo *M. tuberculosis*, embora esteja ausente na maioria das micobactérias não tuberculosas, enquanto se sabe que o gene *Rv1510* é encontrado em *M. tuberculosis*, *M. africanum* (tipos I e II) e *M. canettii*, embora esteja ausente em *M. bovis* e BCG. Os 42 isolados que cresceram apenas no piruvato e apresentaram um padrão bioquímico consistente com *M. tuberculosis* foram submetidos à PCR, e todos apresentaram amplificação positiva para Rv1510, que não é encontrado nas cepas de *M. bovis*. Dos 42 isolados testados para Rv0577, 33 apresentaram amplificação positiva, indicando que os isolados pertenciam ao complexo *M. tuberculosis* (Tabela 2).

Os resultados da identificação fenotípica e genotípica realizada em nosso estudo indicam que, no período do estudo, não foram obtidos isolados de *M. bovis*. Esse resultado parece

surpreendente porque a tuberculose bovina ainda é prevalente em nosso país. Em 2004, um estudo com 454.108 animais mostrou uma prevalência que variou de 0,37% no sudeste a 3,62% no norte.⁽⁶⁾ Em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro,⁽¹⁵⁾ 12,7% dos bezerros leiteiros mostraram reatividade ao teste cutâneo de puntura.

O presente estudo foi realizado em um hospital terciário que serve como centro de referência para avaliação de transplantes, e também para AIDS, câncer e outras doenças, o que facilitaria a externalização da tuberculose causada por *M. bovis*. Kantor et al.⁽¹⁶⁾ revisaram extensivamente a literatura internacional sobre a tuberculose zoonótica na América Latina, encontrando uma prevalência que variou de 0.0% a 2,5%. De acordo com os autores, a tuberculose humana causada por *M. bovis* foi relatada apenas na Argentina, no Brasil, no Equador e na Venezuela. Os mesmos autores mostraram que, durante um período de 20 anos (1987-2006), o Centro de Referência Professor Hélio Fraga, localizado na cidade do Rio de Janeiro e vinculado ao Ministério da Saúde, identificou apenas um caso de tuberculose causada por *M. bovis*, tendo essa cepa sido isolada do sangue de um paciente HIV positivo. De 2001 a 2005, os laboratórios de referência do Instituto Adolfo Lutz, localizado na cidade de São Paulo, testaram aproximadamente 355.000 culturas utilizando um meio com piruvato e isolaram apenas duas cepas de *M. bovis*, uma de amostra de linfonodo e uma de amostra de liquor. No Rio Grande do Sul, um estado com tradição pecuária, *M. bovis* não foi identificado entre os 5.000 isolados de *M. tuberculosis* testados. Não conseguimos identificar nenhuma cepa com perfil de *M. bovis* entre os 1.793 isolados de micobactérias recuperados no período do estudo.

Uma limitação do presente estudo é que o HUCFF/IDT-UFRJ atende principalmente pacientes de áreas urbanas. Embora nossos

Tabela 2 – Resultados dos testes adicionais para a identificação de *Mycobacterium bovis* nos isolados testados.

Resultado do teste de suscetibilidade à pirazinamida	PCR com <i>primer</i> Rv0577		PCR com <i>primer</i> Rv1510	Total
	Positiva	Negativa	Positiva	
Suscetível	19	6	25	25
Resistente	2	1	3	3
Não realizado	12	2	14	14
Total	33	9	42	42

dados e os obtidos pelos outros autores acima citados não tenham mostrado isolamento de *M. bovis*, a presença de *M. bovis* no leite cru foi demonstrada por dois grupos de autores em São Paulo.^(17,18) Visto que há um consumo significativo de leite cru entre a população brasileira, esses estudos demonstraram que existe um risco potencial de contaminação por *M. bovis* que pode levar a infecção e doença. Contudo, há pouquíssimos relatos de tuberculose causada por *M. bovis* no país. Há, definitivamente, subnotificação da tuberculose zoonótica no Brasil. As culturas para micobactérias são realizadas, em laboratórios regionais e nacionais, apenas em casos especiais ou para pesquisas sobre resistência a medicamentos e apenas em meios sólidos contendo glicerol, nos quais *M. bovis* cresce pouco. Também é possível que a falta de isolamento de *M. bovis* seja resultado da melhoria das ações de controle da tuberculose bovina. Corroborando essa hipótese está o fato de que, em 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal tornou obrigatória a realização de testes cutâneos de puntura em animais pertencentes a cooperativas produtoras de leite.

Referências

1. Thoen CO, Lobue PA, Enarson DA, Kaneene JB, de Kantor IN. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Vet Ital*. 2009;45(1):135-81.
2. Oloya J, Opuda-Asibo J, Kazwala R, Demelash AB, Skjerve E, Lund A, et al. Mycobacteria causing human cervical lymphadenitis in pastoral communities in the Karamoja region of Uganda. *Epidemiol Infect*. 2008;136(5):636-43.
3. Wilkins MJ, Meyerson J, Bartlett PC, Spieldenner SL, Berry DE, Mosher LB, et al. Human Mycobacterium bovis infection and bovine tuberculosis outbreak, Michigan, 1994-2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(4):657-60.
4. Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RM, Dale J, Innes JA, et al. Cluster of human tuberculosis caused by Mycobacterium bovis: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet*. 2007;369(9569):1270-6.
5. Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. Tuberculosis from Mycobacterium bovis in binational communities, United States. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(6):909-16.
6. Roxo E. Situação atual da tuberculose bovina no Brasil. In: Secretaria de Defesa Agropecuária. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal, PNCEBT DDD2005. São Paulo: SDA; 2005. p. 1-5.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Centro de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Centro de Vigilância em Saúde, Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública; 1994.
8. Kent, PT, Kubica, GP. Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. Atlanta: U. S. Department of Health and Human Services; 1985.
9. Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, et al. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ*. 1963;29:565-78.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
11. Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1637-50.
12. Scorpio A, Collins D, Whipple D, Cave D, Bates J, Zhang Y. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol*. 1997;35(1):106-10.
13. de Jong BC, Onipede A, Pym AS, Gagneux S, Aga RS, DeRiemer K, et al. Does resistance to pyrazinamide accurately indicate the presence of Mycobacterium bovis? *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3530-2.
14. Viana-Niero C, Leão SC. Limitations of the use of the mtp40 fragment as a marker of differentiation between Mycobacterium tuberculosis and M. bovis. *J Bras Pneumol*. 2004;30(4):498-500.
15. Lilenbaum W, Schettini J, Ribeiro ER, Souza GN, Moreira EC, Fonseca LS. Tuberculose bovina: prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção na Região dos Lagos do Estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Med Vet*. 1998;20:120-3.
16. de Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Da Silva Telles MA, Osório Ribeiro M, et al. Human Mycobacterium bovis infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008;88(4):358-65.
17. Pardo RB, Langoni H, Mendonça LJ, Chi KD. Isolamento de Mycobacterium spp. do leite de vacas suspeitas e positivas para tuberculose. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2001;38(6):284-7.
18. Leite CQ, Anno IS, Leite SR, Roxo E, Morlock GP, Cooksey RC. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(3):319-23.

Sobre os autores

Luciana Fonseca Sobral

Bióloga. Universidade Federal Fluminense, Niterói (RJ) Brasil.

Rafael Silva Duarte

Professor Associado. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Gisele Betzler de Oliveira Vieira

Farmacêutica. Laboratório de Micobactérias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/Instituto de Doenças do Tórax da Universidade Federal do Rio de Janeiro – HUCFF/IDT-UFRJ – Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Marlei Gomes da Silva

Biólogo. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Neio Boechat

Professor Associado. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.

Leila de Souza Fonseca

Professora Titular. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) Brasil.