

Desenvolvimento de uma PCR em tempo real para diagnóstico de *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*

Development of real-time PCR method for diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis

Mariana Lázaro Sales^[a], Érica Bravo Sales^[b], Andréa Alencar Padilha^[c], Omara Tereza Vianello Pereira^[d], Antônio Augusto Fonseca Junior^[e]

- ^[a] Bióloga, mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro/MG), Belo Horizonte, MG - Brasil, e-mail: marisales@oi.com.br
- ^[b] Bióloga, mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro/MG), Belo Horizonte, MG - Brasil, e-mail: ericabravo@yahoo.com.br
- ^[c] Médica-veterinária, mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro/MG), Belo Horizonte, MG - Brasil, e-mail: andrea.alencar@agricultura.gov.br
- ^[d] Técnica Laboratorial do Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro/MG), Belo Horizonte, MG - Brasil, e-mail: omaraterezavianello@gmail.com
- ^[e] Farmacêutico, doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro/MG), Belo Horizonte, MG - Brasil, e-mail: antonio.fonseca@agricultura.gov.br

Resumo

A paratuberculose, ou Doença de Johne, é uma doença crônica degenerativa que incide nos ruminantes domésticos. O agente etiológico *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é um bacilo de crescimento lento pertencente ao complexo *Mycobacterium avium* (MAI). Nos EUA, a enfermidade acarreta grandes prejuízos econômicos. No Brasil, são poucos os relatos de casos da doença e não se conhece a real situação epidemiológica da paratuberculose bovina. O objetivo desse trabalho foi padronizar um teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real para auxiliar na confirmação de casos da enfermidade. A técnica foi testada com DNA de diversas espécies do gênero *Mycobacterium* e avaliada quanto à sensibilidade e eficiência. Uma vez atestada sua confiabilidade, a metodologia foi aplicada para confirmar um caso suspeito de paratuberculose bovina. Foi enviada para análise no Laboratório Nacional Agropecuário/MG (Lanagro/MG) amostra de linfonodo mesentérico e alça intestinal de um bovino da raça holandesa com suspeita de paratuberculose. A amostra foi processada e inoculada para crescimento em meio Herrold's com micobactina. A combinação entre a técnica do isolamento bacteriano em meio apropriado juntamente com a PCR em tempo real foi capaz de diagnosticar a presença da micobactéria no animal. Esse foi o primeiro caso de paratuberculose confirmado em um laboratório oficial do Ministério da Agricultura.

Palavras-chave: Diagnóstico de paratuberculose. Doença de Johne. MAP. PCR em tempo real.



Abstract

The paratuberculosis or Johne's disease is a chronic degenerative disease that affects domestic ruminants. Its causative agent, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP), is a slow-growing bacillus belonging to the Mycobacterium avium complex (MAI). The disease causes severe economic losses in US. There are few reported cases of the disease in Brazil and the real epidemiological situation of bovine paratuberculosis in this country is unknown. The aim of this study was to standardize a real-time PCR procedure to assist the confirmation of paratuberculosis cases. The technique was tested with DNA from various species of the genus Mycobacterium and evaluated for sensitivity and efficiency. Once the robustness of the methodology was certified, it was applied to confirm a suspected case of bovine paratuberculosis. Mesenteric lymph nodes and intestinal loop of a Holstein steer with suspected paratuberculosis were sent to the National Agricultural Laboratory (Lanagro/MG) to confirm the diagnosis. The sample was processed and inoculated for growth in Herrold's media supplemented with mycobactin. The combination of bacterial isolation technique and real-time PCR was able to diagnose the presence of mycobacteria in the animal. This was the first paratuberculosis case confirmed in an official laboratory from the Ministry of Agriculture.

Keywords: *Diagnosis of paratuberculosis. Johne's disease. MAP. Real-time PCR.*

Introdução

O *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) causador da paratuberculose, ou Doença de Johne (JD), uma enterite granulomatosa infecciosa crônica, degenerativa em ruminantes, e em menor frequência, em equinos, ovinos, suínos, lebres, roedores e animais silvestres (OLIVEIRA et al., 2010). Há indícios de que o MAP seja o agente causador da ileocolite granulomatosa de humanos, conhecida como Doença de Crohn (CHAMBERLIN et al., 2001; GHADIALI et al., 2004). O período de incubação da doença varia de alguns meses a anos, havendo relatos de incubação de 4 meses a 15 anos. Os bezerros geralmente são infectados logo após o nascimento, mas raramente apresentam sinais clínicos antes dos 2 anos de idade (GARRY, 2011).

O MAP sobrevive muitos meses no solo e/ou em matéria orgânica quando protegido da ação direta da luz solar e dissecação. A transmissão geralmente acontece pelas fezes de animais infectados (sintomáticos ou assintomáticos), porém também pode ocorrer via aleitamento devido a tetos sujos (SWEENEY, 1996).

Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal – OIE (2007), a paratuberculose pode ser encontrada em todo o mundo. As perdas econômicas estão relacionadas à diminuição da produção de leite, perda da condição corporal e descarte dos animais doentes (GARRY, 2011). A paratuberculose é considerada uma enfermidade de alta prevalência em países com indústria

de laticínios desenvolvida. Pesquisas realizadas pelo Estudo Nacional de Saúde Animal e Monitoramento demonstrou prevalência sorológica de 20-40% no rebanho dos Estados Unidos (VAN SCHAİK et al., 2003). A Suécia e alguns estados australianos são comprovadamente livres da doença (FRÖSSLING et al., 2013). As pesquisas sobre a enfermidade são raras no Brasil e não há disponível levantamento com dados oficiais a respeito da situação epidemiológica. Até o momento, os estudos de casos de paratuberculose no Brasil estão relacionados à importação de bovinos infectados ou com animais filhos de pais importados (DRIEMEIER et al., 1999; MOTA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

A maior parte da literatura sobre o diagnóstico de paratuberculose relata achados anátomo-patológicos (DRIEMEIER et al., 1999; MOTA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010), sorológicos e isolamentos, sendo este último o padrão ouro de diagnóstico (COLLINS, 2011). Entretanto o processo laboratorial é trabalhoso e o tempo de crescimento é demorado, levando cerca de 8 a 16 semanas a 37 °C. O objetivo do trabalho foi desenvolver uma técnica de PCR em tempo real para otimizar o diagnóstico da paratuberculose.

Materiais e métodos

Em 2009, no estado de Minas Gerais, uma propriedade relatou no período de um ano os sinais clínicos de diarreia e emagrecimento progressivo em quatro

bovinos, sendo que todos os animais foram ao óbito. A propriedade consta de um rebanho de 120 vacas adultas sendo estas negativas em exames alérgicos para tuberculose (prova comparada a partir de PPD aviária e PPD bovina). Amostras de linfonodos mesentéricos e alças intestinais de um dos animais sintomáticos foram enviadas para o Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro/MG). No laboratório, a amostra foi processada e inoculada para crescimento em meio Herrold's com micobactina (WHIPPLE; CALLIHAN; JARNAGIN, 1991). Na décima semana de crescimento, um dos tubos de cultura apresentou colônias que foram submetidas a testes moleculares e para coloração de Ziehl-Neelsen.

Iniciadores para o diagnóstico molecular de MAP foram projetados no programa Primer3Plus desenvolvido por Untergasser et al. (2007). A verificação das estruturas secundárias e dos dímeros formados pelos oligonucleotídeos escolhidos foi realizada no programa Oligo Analyser 3.1 (IDT, USA). A especificidade *in silico* dos iniciadores foi testada com o programa PrimerBlast (NCBI) (ALTSCHUL et al., 1990).

O DNA da amostra foi extraído utilizando a metodologia fenólica descrita por Sambrook e Russell (1989). A PCR foi realizada utilizando o iniciador Map-169-F, 5'GTC GGG TAT GGC TTT CAT GT3' (83-102, posição referente à sequência do genoma completo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* depositada no GenBank pelo número de acesso EF514833.1) e Map-169-R, 5'CTC CGT AAC CGT CAT TGT CC3' (251-232). Esses amplificam um fragmento de 169 pb referente à sequência de inserção IS900. A reação foi realizada com um volume final de 20 µL por reação nas seguintes concentrações de reagentes: 5 pmol de cada iniciador (IDT, USA), 1,5 U de Go Taq Hot start (Promega, EUA), 20% de Tampão go Taq 5x (Promega, USA), 1,5 mM MgCl₂ (Promega, EUA), 10 mM de dNTP, 1 µL de Eva Green 20X (Bioutium, EUA) e 2 µL de DNA. A PCR foi padronizada no termociclador em tempo real Corbett Rotor-Gene 3000 (Qiagen, Alemanha); as condições de temperatura e tempo foram estabelecidas como: desnaturação de 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C/10s, 54 °C/15s e 72 °C/20s, seguida de uma curva de desnaturação de 72 °C a 99 °C com intervalo de 3s a cada 1 °C.

Os iniciadores foram avaliados quanto à sua eficiência por uma curva padrão de seis pontos, construída a partir dos produtos amplificados purificados pelo *kit* Purelink (Invitrogen, EUA); e o

número de cópias foi determinado após dosagem no espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, EUA).

Diluições progressivas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) do DNA extraído de um cultivo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* CRNC 26 foram utilizadas para determinação do limite de detecção (LD), conforme Fonseca Júnior et al. (2010). As culturas passaram pelo processo de extração previamente citado e tiveram a PCR realizadas em triplicatas. Uma vez submetidas as culturas ao equipamento de PCR em tempo real, a fluorescência foi coletada e os resultados analisados pelo programa para construção de uma curva padrão para cálculo da eficiência. A concentração limite passou por vinte e uma PCRs, para confirmação do limite de detecção.

Para testar a especificidade dos iniciadores, foi realizada uma PCR, utilizando as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv CRNC 23, *M. tuberculosis* H37Ra CRNC 25, *M. fortuitum* CRNC 10, *M. kansasii* CRNC 48, *M. kansasii* CRNC 18, *M. gordonae* CRNC 16, *M. avium* D4 CRNC 05, *M. avium* 1500 CRNC 15, *M. intracellulare* CRNC 17, *M. avium* 2045 CRNC 14, *M. marinum* CRNC 19, *M. scrofulaceum* CRNC 49, *M. scrofulaceum* CRNC 20, *M. szulgai* CRNC 21, *M. triviale* CRNC 22, *M. fortuitum peregrinum* CRNC 11, *M. phei* CRNC 12 e *M. bovis* CRNC 02.

Os resultados das PCRs foram validados pela restrição do produto amplificado com a enzima escolhida *in silico* no *software* pDRAW32. A restrição do produto amplificado com a enzima *HaeIII* previu dois fragmentos com 52 pares de base e 117 pares de base.

Resultados

Nas análises de MAP, os resultados apresentaram pico de desnaturação de 82 °C e 83 °C. A curva padrão traçada com cinco pontos em duplicata obteve o R² = 0,997 e a eficiência dos iniciadores foi 101%. O limite de detecção foi de 64 fg/µL de DNA (Gráfico 1). Não ocorreu amplificação em nenhuma das outras espécies de micobactéria.

A amostra foi caracterizada como MAP apresentando pico de *melt* característico desse microrganismo (Gráfico 2). A restrição do produto amplificado com a enzima *HaeIII* gerou dois fragmentos de 52 pb e 117 pb, resultado que concorda com o apresentado pelo programa (Figura 1).

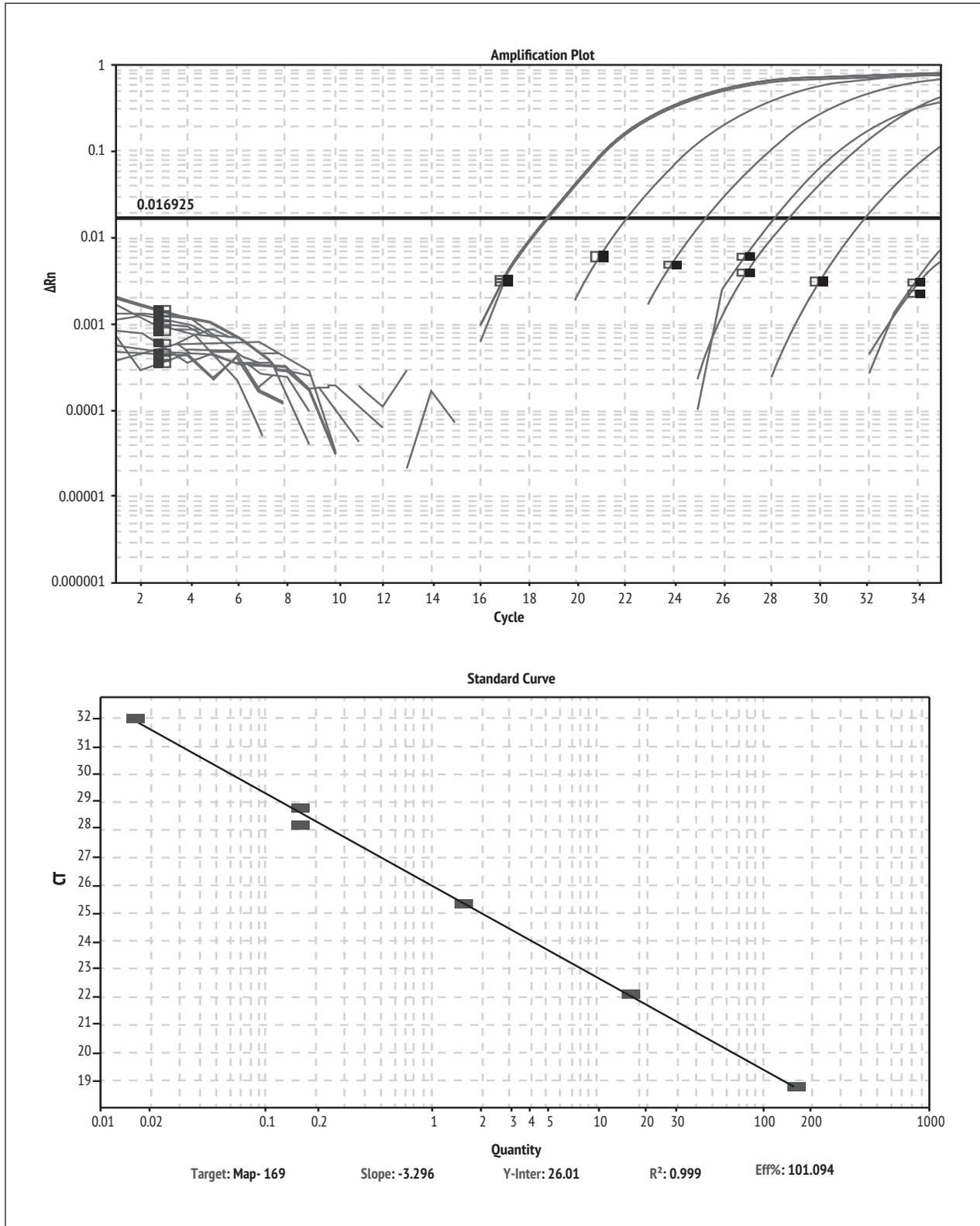


Gráfico 1 - Curva padrão em intervalos de diluição na base 10 para cálculo de eficiência e sensibilidade para qPCR

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: A figura apresenta os dados estatísticos utilizados pelo programa para determinar a eficiência a partir dos dados da curva padrão, com destaque para o slope de -3,296 (indicando que a reação é capaz de amplificar adequadamente duplicando os produtos a cada ciclo) e R² de 0,999 (indicando a correlação dos dados da curva com a análise de PCR).

Discussão

O diagnóstico microbiano se baseia na incapacidade do MAP em produzir micobactina necessitando de meio contendo este sideróforo para crescer (JOHNSON-IFEARULUNDU; KANEENE, 1997). Dessa forma, juntamente com a coloração de Ziehl-Neelsen, o isolamento microbiológico foi capaz de diagnosticar a presença da micobactéria na amostra do presente estudo. Entretanto, essa dependência não é considerada exclusiva do *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, existindo outras espécies que são também dependentes da micobactina, tais como o *M. avium* subsp. *silvaticum* e outras cepas de *M. avium* (SWEENEY, 1996).

Os elementos de sequência de inserção são pequenos elementos genéticos móveis contendo genes relacionados com as funções de transposição (HARRIS; BARLETTA, 2001). A IS900 apresenta de 12-20 cópias no genoma do MAP o que o torna uma região promissora em termos de sensibilidade para se desenvolver uma PCR (CHUI et al., 2004). Além disso, a região é recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008). Ravva e Stanker (2005) mostraram que esta região é específica para o MAP, sendo capaz de diferenciar a bactéria das demais do complexo *Mycobacterium avium*.

A eficiência da PCR foi similar à encontrada por Ireng et al. (2009) e Kralik et al. (2011). No entanto, a sensibilidade da PCR desenvolvida neste trabalho foi menor do que a de dez cópias encontradas nas publicações citadas. Uma possível explicação para tal seria a utilização da tecnologia TaqMan, que é considerada um método mais sensível para determinar a presença ou ausência de sequências específicas. Em contrapartida, a tecnologia Eva Green é mais barata e possibilita a realização da curva de desnaturação (DIAS et al., 2012). O Gráfico 2 comprova a formação de um pico de desnaturação único na análise após os ciclos de PCR. Amostras específicas de MAP terão a região flanqueada amplificada pelos iniciadores. O produto de PCR gerado, quando submetido a acréscimo constante de temperatura, sofrerá variação de fluorescência em 90,2 °C enquanto outras amostras não gerarão nenhuma variação, mas apenas um sinal basal. As análises em gel de agarose (Figura 1) demonstram não apenas a especificidade do *amplicom* gerado ao ser digerido por enzima de restrição, mas também a

possibilidade de utilização da técnica para identificação da bactéria em laboratórios sem equipamentos de PCR em tempo real.

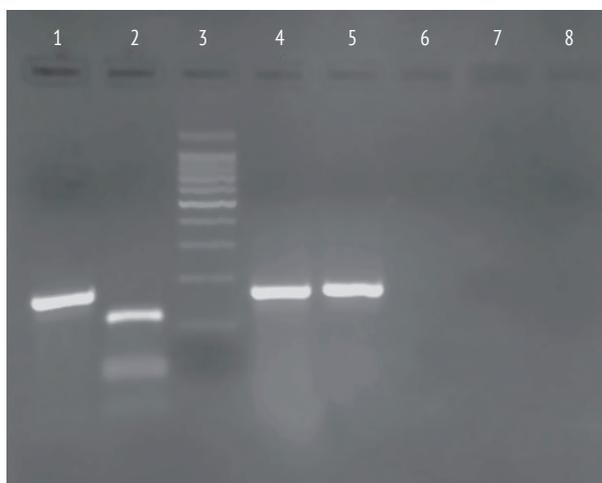


Figura 1 - Perfis dos produtos amplificados da PCR com os iniciadores MAP-169 em gel de agarose a 1,5%

Legenda: 1 = produto amplificado da amostra em análise; 2 = amostra em análise clivada com *HaellI*; 3 = marcador de tamanho molecular com intervalos de 100 pb (Invitrogen, EUA); 4 = produto amplificado da amostra analisada; 5 = *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (controle positivo); 6 = amostra de *M. bovis*; 7 = amostra de *M. tuberculosis*; 8 = amostra de *M. avium*.

Fonte: Dados da pesquisa.

A PCR é uma técnica que tem a capacidade de otimizar a detecção de MAP, além de contar com a vantagem de não requerer bacilos viáveis. Essa técnica demonstrou ser uma específica e de fácil execução. A utilização do PCR em tempo real proporciona maior velocidade nas análises, já que não é necessária a utilização da eletroforese, acarretando melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação.

Conclusão

A PCR em tempo real padronizada nesse trabalho confirmou o isolamento de MAP no estado de Minas Gerais em uma amostra enviada para análise no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro/MG) em 2009. Os resultados demonstraram que o método permite a caracterização molecular rápida do MAP, incrementando a velocidade do diagnóstico laboratorial de

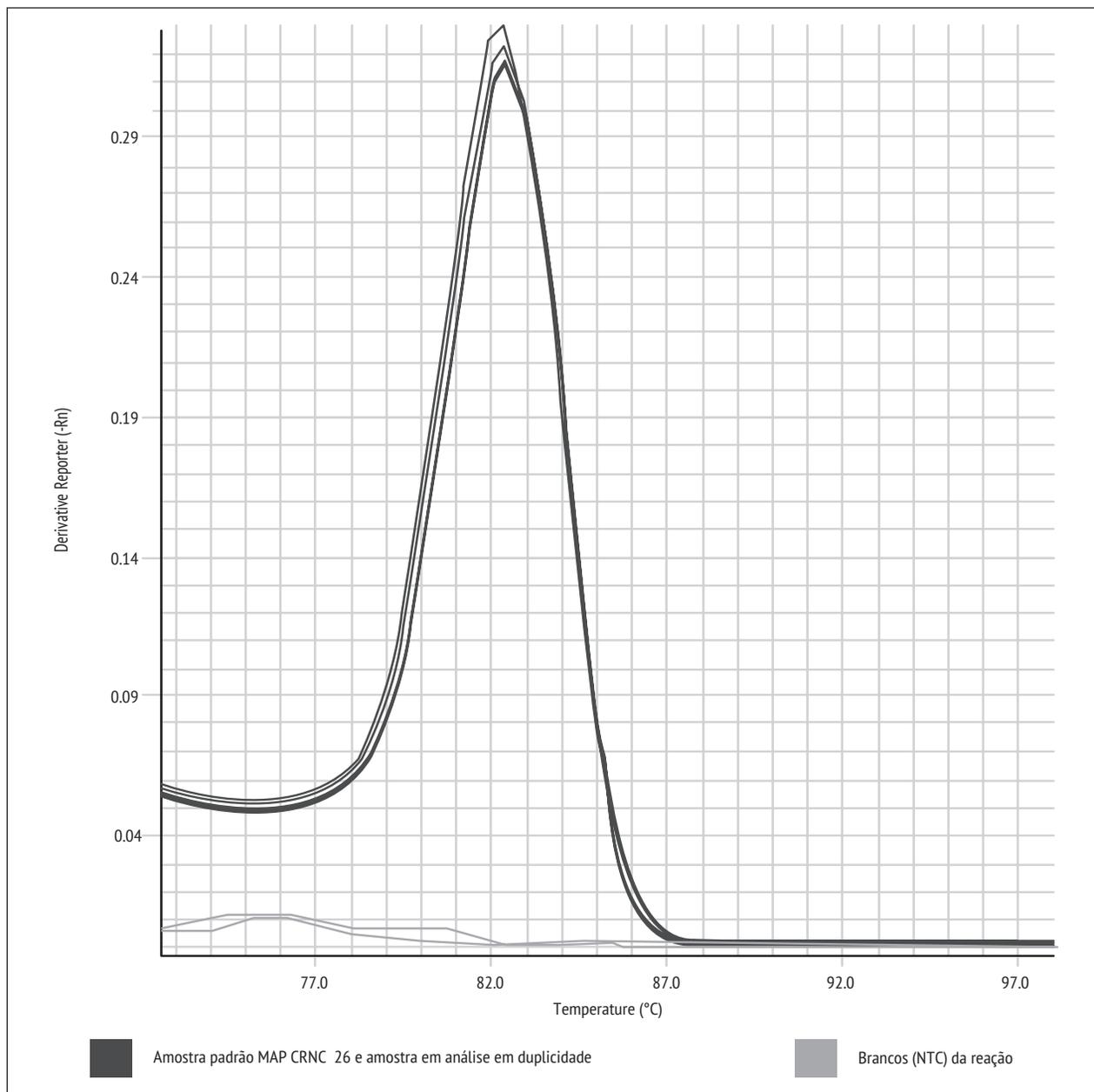


Gráfico 2 - Derivada de curva de *melt* da PCR em tempo real para *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* com pico de 82 °C e 83 °C

Fonte: Dados da pesquisa.

paratuberculose bovina. Novos estudos deverão ser conduzidos para confirmar os dados do presente estudo.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro/MG) e ao Instituto Nacional de

Ciência e Tecnologia (INCT) Pecuária pelo auxílio na execução desse trabalho.

Referências

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

- COLLINS, M. T. Diagnosis of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 3, p. 599-607, 2011. doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.013.
- CHAMBERLIN, W. et al. Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 15, n. 3, p. 337-346, 2001. doi:10.1046/j.1365-2036.2001.00933.x.
- CHUI, L. W. et al. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 39-45, 2004. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2003.08.007.
- DIAS, N. L. et al. PCR em tempo real para diagnóstico da leucose enzoótica bovina. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1434-1439, 2012. doi:10.1590/S0103-84782012005000053.
- DRIEMEIER, D. et al. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3-4, p. 109-115, 1999. doi:10.1590/S0100-736X1999000300004.
- FONSECA JÚNIOR, A. A. et al. PCR Duplex para diferenciação de amostras vacinais e selvagens do vírus da doença de aujeszky. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1259-1262, 2010. doi:10.1590/S0102-09352010000500032.
- FRÖSSLING, J. et al. Surveillance system sensitivities and probability of freedom from *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in Swedish cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 108, n. 1, p. 47-62, 2013. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.07.010.
- GARRY, F. Control of paratuberculosis in dairy herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n. 3, p. 599-607, 2011. doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.006.
- GHADIALI, A. H. et al. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5345-5348, 2004. doi:10.1128/JCM.42.11.5345-5348.2004.
- HARRIS, N. B.; BARLETTA, R. G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 489-512, 2001. doi:10.1128/CMR.14.3.489-512.2001.
- IRENGE, L. M. et al. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 166-172, 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.087.
- JOHNSON-IFEARULUNDU, Y. J., KANEENE, J.B. Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 67, n. 6, p. 437-447, 1997.
- KRALIK, P. et al. Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by quantitative real time PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1-2, p.133-138, 2011. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.009.
- MOTA, P. M. P. C. et al. Paratuberculosis in a dairy Gyr herd in the State of Paraíba, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 703-706, 2009. doi:10.1590/S0100-736X2009000900004.
- MOTA, R. A. et al. Paratuberculose em um rebanho bovino leiteiro no estado de Pernambuco, PE. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 74, n. 2, p. 73-79, 2007.
- OLIVEIRA, D. M. et al. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 67-72, 2010. doi:10.1590/S0100-736X2010000100011.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL - OIE. Paratuberculosis (Johne's disease). In: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL - OIE. **Terrestrial Manual**. 2008. p. 276-291. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL - OIE. **Paratuberculosis: Johne's disease**. 2007. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/paratuberculosis.pdf>>. Acesso em: 8 jun. 2010.
- RAVVA, S. V.; STANKER, L. H. Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation from other mycobacteria using SYBR Green and TaqMan assays. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 305-317, 2005. doi:10.1016/j.mimet.2005.04.004.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3th. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SWEENEY, R. W. Transmission of paratuberculosis. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 12, n. 2, p. 305-312, 1996. PMID:8828107.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, Suppl. 2, p. W71-W74, 2007. doi:10.1093/nar/gkm306.

VAN SCHAİK, G. et al. Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 3, p. 233-241, 2003. doi:10.1177/104063870301500304.

WHIPPLE, D. L.; CALLIHAN, D. R.; JARNAGIN, J. L. Cultivation of mycobacterium paratuberculosis from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, n. 4, p. 368-373, 1991. doi:10.1177/104063879100300424.

Recebido: 03/12/2012

Received: 12/03/2012

Aprovado: 20/02/2013

Approved: 02/20/2013