

X Congresso Internacional do Leite

X Workshop de Políticas Públicas

XI Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

Tuberculose zoonótica devida a *Mycobacterium bovis* em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil¹

Marcio Roberto Silva², Adalgiza da Silva Rocha³, Guilherme Nunes de Souza², Ronaldo Rodrigues da Costa⁴, Andrea Padilha de Alencar⁵, Philip Noel Suffys³, Mark Drew Crosland Guimarães⁶

¹ Parte da tese de doutorado do primeiro autor, financiada pelo CNPq (processo 410595/2006-3)

² Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG. E-mail: mrsilva@cnpq.embrapa.br

³ Pesquisador visitante, Fiocruz, Rio de Janeiro/MG

⁴ Farmacêutico-bioquímico, Hospital Regional João Penido-Fhemig, Juiz de Fora/MG

⁵ Fiscal agropecuário federal, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Pedro Leopoldo/MG

⁶ Professor, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte/MG

Resumo: O objetivo deste trabalho foi determinar as proporções de *Mycobacterium bovis* em pacientes de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Um estudo transversal foi realizado de março de 2008 a fevereiro de 2010. Mil espécimes (603 pacientes suspeitos de tuberculose) foram inoculados em meios Löwentin-Jensen (LJ) convencional e, simultaneamente, em Stonebrink (SB) enriquecido com piruvato. Um total de 178 casos de tuberculose tiveram as micobactérias isoladas caracterizadas por métodos convencionais (bioquímicos) e / ou moleculares (PCR alelo-específico baseado em amplificação e sequenciamento de *pncA* e pseudogene *oxyR*). Além disso, DNA de 38 biopsias de pacientes suspeitos de tuberculose extrapulmonar tiveram o possível pseudogene *oxyR* genotipado e 14 foram identificados como portadores do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Ao todo 191 pacientes tiveram pelo menos uma espécie de *Mycobacterium* sp. caracterizada. Entre eles, 184 (96,4%, IC 95% = 93,6-98,9%) apresentavam infecção por *M. tuberculosis*, quatro (2,0%, IC 95% = 0 - 4,1%) tiveram evidências do complexo *Mycobacterium avium* de forma isolada ou em co-infecção com *M. tuberculosis*, e, três (1,5%, IC 95% = 0 - 3,3%) tiveram co-infecções por *M. bovis*-*M. tuberculosis*. Os dados indicaram uma baixa prevalência de co-infecção por *M. bovis* entre os pacientes analisados, que estava sendo subestimada pelos serviços locais de saúde e merece, portanto, mais atenção.

Palavras-chave: tuberculose zoonótica, complexo *Mycobacterium tuberculosis*, complexo *Mycobacterium avium*, pseudogene *oxyR*, gene *pncA*

Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

Abstract: The aim was to determine the proportions of *Mycobacterium bovis* among patients in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. A cross-sectional study was carried out from March 2008 to February 2010. A thousand specimens (603 suspected TB patients) were inoculated onto Löwentin-Jensen (LJ) and simultaneously Stonebrink (SB) pyruvate enriched media. A total of 178 TB cases had the cultured mycobacteria defined by conventional (biochemical) and/or molecular speciation methods (allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences). Also, supposed DNA of 38 formalin fixed and paraffin wax embedded biopsy tissue samples were pseudogene *oxyR* genotyped and 14 were found to be *Mycobacterium tuberculosis* complex carriers. A 191 patients had at least one species of *Mycobacterium* sp. characterized. Among them, 184 (96.4%; 95% CI = 93.6% - 98.9%) had *M. tuberculosis* infection; four (2.0%; 95% CI = 0 - 4.1%) had *Mycobacterium avium* complex evidences alone or in co-infection with *M. tuberculosis*; and, three (1.5%; 95% CI = 0 - 3.3%) had *M. bovis*-*M. tuberculosis* co-infections. Our data indicated a low prevalence of *M. bovis* co-infections among analyzed patients. These infections were being underestimated by the local health services and deserve more attention.

Keywords: zoonotic tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex, *oxyR* pseudogene, *pncA* gene

X Congresso Internacional do Leite

X Workshop de Políticas Públicas

XI Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

Introdução

Embora a maioria dos casos de tuberculose humana (TB) sejam devidos a *Mycobacterium tuberculosis*, uma proporção não conhecida é causada por *Mycobacterium bovis*, os quais tem os bovinos como principais reservatórios naturais, mas pode afetar outros mamíferos, incluindo os seres humanos.

M. bovis tem sido mundialmente implicado como causa de 3.1% de todos os casos humanos de tuberculose, com variações influenciadas pelo estágio de controle da tuberculose bovina e nível de inspeção dos produtos lácteos. Na América Latina, a proporção de envolvimento de *M. bovis* foi estimada em 2% e 8% das formas pulmonares e extrapulmonares, respectivamente. Mas, essas estimativas não são muito acuradas. Portanto, o principal objetivo deste estudo foi determinar a proporção de *M. bovis* entre pacientes atendidos em dois centros de referência em tuberculose de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Material e Métodos

Espécimes biológicos, principalmente escarro de todos os pacientes suspeitos de TB, foram reutilizados e submetidos ao método de descontaminação de Darzins e os sedimentos inoculados simultaneamente em meios de cultura LJ e SB com leituras realizadas aos 7, 30, 45 e 60 dias da inoculação a 36.5 °C. Meios de cultura que permaneceram inoculados por ao menos 60 dias sem nenhuma colônia característica foram considerados sem crescimento de micobactérias (DROBNIOWSKI et al., 2003). Suposto DNA de biópsias de pacientes suspeitos de TB extrapulmonar (processo inflamatório granulomatoso com necrose caseosa) foram genotipados de forma a encontrar portadores de micobactérias.

Testes bioquímicos para distinguir *M. bovis* do restante do complexo *M. tuberculosis* (CMT) foram usados (KENT & KUBIKA, 1985). Todas as réplicas de culturas inativadas e também blocos parafinados foram submetidos à extração de DNA. Micobactérias com perfil bioquímico de não-tuberculosas foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR). Um enfoque em dois passos foi usado para distinguir *M. bovis* dos demais membros do CMT: a) amplificação do gene *pncA* e detecção de seu polimorfismo. A resistência à pirazinamida em *M. bovis* está associado a uma mutação Citosina para Guanina na posição 169 desse gene (SCORPIO & ZHANG, 1996), a qual foi investigada nas culturas inativadas por análise de restrição enzimática do DNA (BAROUNI et al., 2004). b) amplificação do pseudogene *oxyR* e detecção de seu polimorfismo foi realizado porque raras cepas de *M. bovis* podem ser sensíveis à pirazinamida e também há linhagens de *M. tuberculosis* resistentes à droga em questão. *M. bovis* tem uma mutação de base única na posição 285 do pseudogene *oxyR*. Todas as cepas de *M. bovis* possuem um resíduo de adenina no nucleotídeo 285, enquanto todas as cepas de *M. tuberculosis* possuem guanina na mesma posição (SREEVATSAN et al., 1996). Esta mutação foi investigada em culturas inativadas por análise de restrição e em biópsias por sequenciamento ou análise de restrição (SREEVATSAN et al., 1996). As sequências de DNA foram comparadas com as de referência (GenBank). Foram utilizados questionários estruturados na coleta de dados e os participantes foram entrevistados. O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo 819.125.2006) e da Fundação Hospitalar de Minas Gerais (protocolo 52/08).

Resultados e Discussão

Evidências de co-infecções de *M. bovis* foram encontradas entre três pacientes encaminhados para dois centros de saúde de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Perfil molecular de *M. bovis* (adenina vez guanina na posição 285 do pseudogene *oxyR*) foi identificada em DNA extraído de biópsias de dois pacientes com TB extrapulmonar (Figura 1) e perfil bioquímico de *M. bovis* foi identificado em uma cultura AFB positiva de um paciente com doença pulmonar TB.

Ao todo 191 pacientes tiveram micobactérias caracterizadas por métodos bioquímicos e moleculares. Entre eles, 184 (96,4%, IC 95% = % 93,6-98,9%) apresentavam infecção por *M. tuberculosis*, quatro (2,0%, IC 95% = 0 - 4,1%) tiveram evidências do complexo *M. avium* de forma

X Congresso Internacional do Leite

X Workshop de Políticas Públicas

XI Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

isolada ou em co-infecção com *M. tuberculosis*, e, três (1,5%, IC 95% = 0 - 3,3%) tiveram co-infecções por *M. bovis*-*M. tuberculosis*.

Entre 133 entrevistados, 59 (44,3%), 51 (38,3%) e 23 (17,2%), eram atuais, ex- e não-consumidores de queijo não pasteurizado, respectivamente. Adicionalmente, 15 (11,2%), 72 (54,1%) e 46 (34,5%) eram contemporâneos, ex- e não-consumidores de leite não pasteurizado, respectivamente. Portanto, os riscos potenciais à saúde do consumidor de vários microrganismos que podem ser veiculados através de leite e derivados não pasteurizados, incluindo *M. bovis*, deveria ser enfatizado. Entre os mesmos entrevistados, cinco (3,7%), 54 (40,6%) e 74 (55,6%) eram atuais, anteriores e nunca residentes em áreas rurais, respectivamente.



Figure 1 Comparação da homologia das sequências parciais do pseudogene *oxyR* extraídas de biopsias, Juiz de Fora (GenBank). Mtb = sequência parcial do pseudogene *oxyR* (150pb) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (GenBank); MB = sequência parcial do pseudogene *oxyR* (150pb) de *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 (GenBank); P1 = sequência parcial do pseudogene *oxyR* (115 pb) de *M. bovis* de biopsias, paciente 1; P2 = sequência parcial do pseudogene *oxyR* (105 pb) de *M. bovis* de biopsias, paciente 2; ■ = identidade; □ = falta de identidade; ▭ = "Gaps"; ▾ = posição 285 do pseudogene *oxyR*.

Conclusões

Foi encontrada uma baixa porcentagem de *M. bovis* em pacientes residentes de um município predominantemente urbano do Brasil.

Ao conhecimento dos autores, esse estudo é o primeiro nacional após 1974 que novamente descreve *M. bovis* em seres humanos e representa a retomada do estudo de um patógeno que estava negligenciado no Brasil, mas que não deveria ficar "esquecido". Portanto, os autores sugerem outros estudos mais representativos, incluindo municípios de pequeno porte e populações rurais do país.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro (410595/2006-3).

Literatura citada

- BAROUNI, AS; AUGUSTO, CJ; LOPES, MT; ZANINI, MS; SALAS, CE. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes* 2004; 18:167-70.
- DROBNIOWSKI, F; STRUTT, M; SMITH, G; MAGEE, J; FLANAGAN, P. Audit of scope and culture techniques applied to samples for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* by hospital laboratories in England and Wales. *Epidemiol Infect* 2003; 130:235-237.
- KENT, PT; KUBICA, GP. *Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control. 1985.
- SCORPIO, A; ZHANG, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 1996; 2: 635-6.
- SREEVATSAN, S; ESCALANTE, P; PAN, X; et al. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2007-2010.