

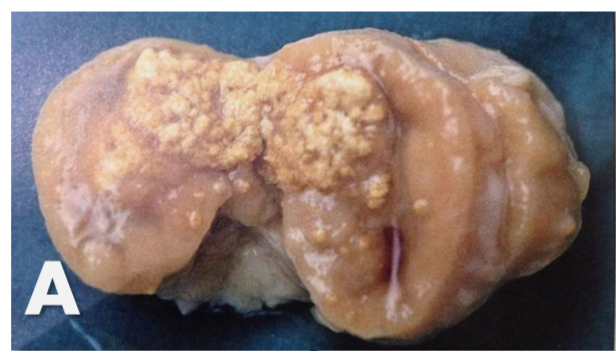
INTRODUÇÃO

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;

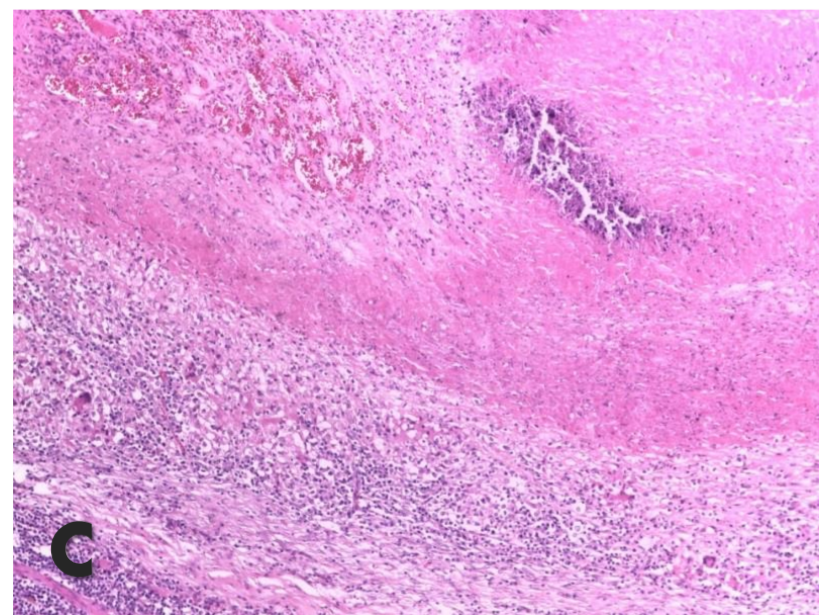
179 amostras de bovinos submetidas a diagnóstico



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.

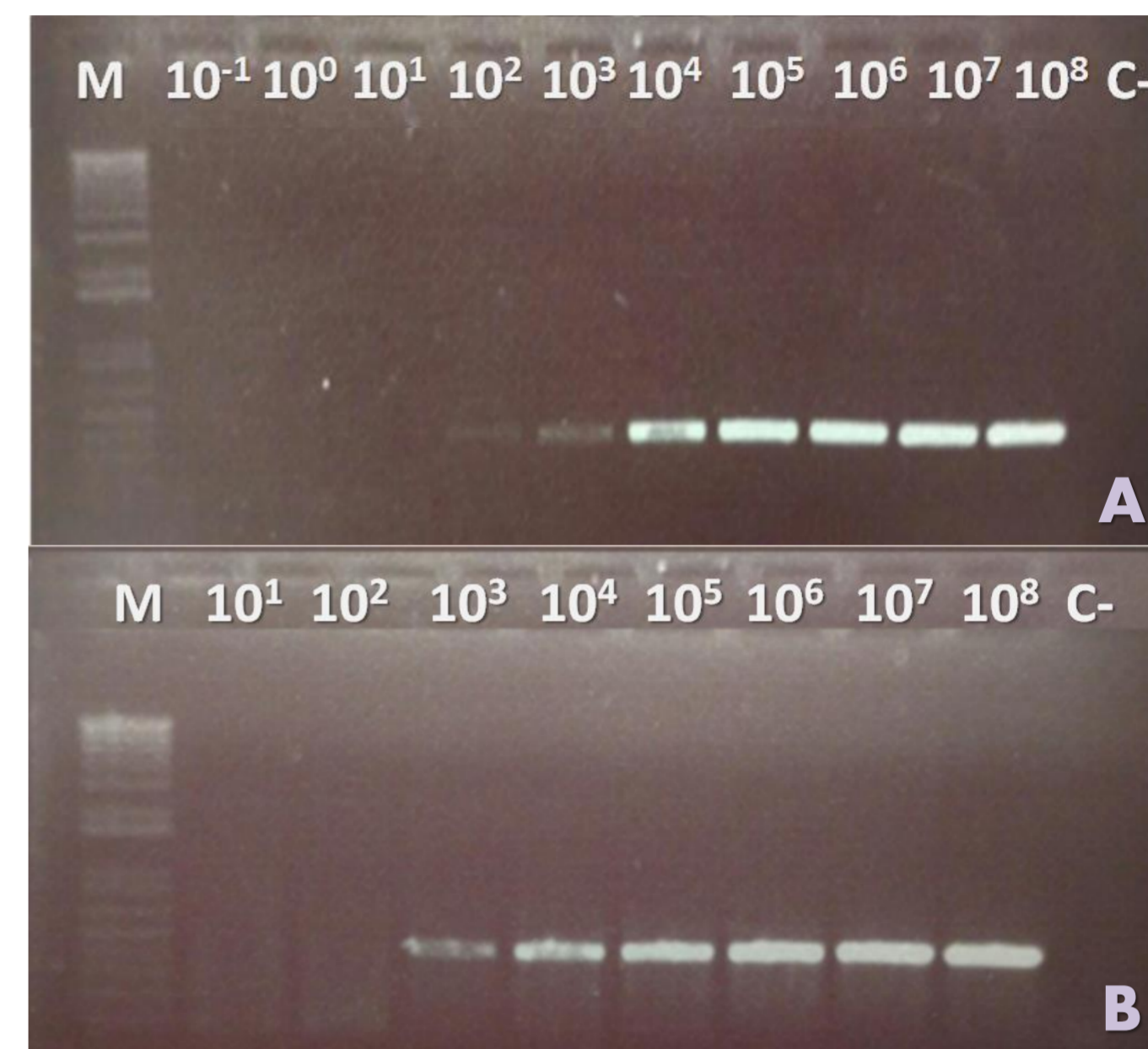


Figura 2. Curva de sensibilidade padrão sem matriz biológica (A) e com matriz biológica (B). Gel de agarose 1%.

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	95,33
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.