

JULIANA FERNANDES DE PAULA CASTRO

**Padronização da PCR em Tempo Real (qPCR) para diagnóstico de
tuberculose bovina a partir de amostras de lesões sugestivas
colhidas em abatedouros**

São Paulo

2022

JULIANA FERNANDES DE PAULA CASTRO

Padronização da PCR em Tempo Real (qPCR) para diagnóstico de tuberculose bovina a partir de amostras de lesões sugestivas colhidas em abatedouros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Programa:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Jose Soares Ferreira Neto

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4255
FMVZ

Castro, Juliana Fernandes de Paula
Padronização da PCR em Tempo Real (qPCR) para diagnóstico de tuberculose bovina a partir de amostras de lesões sugestivas colhidas em abatedouros / Juliana Fernandes de Paula Castro. – 2022.
40 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Tuberculose bovina. 2. Diagnóstico direto. 3. qPCR. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 23rd August 2022

CERTIFIED

We certify that the Research "Standardization of real-time PCR for diagnosis of bovine tuberculosis proved by clinics and comparative study with an isolation technique.", protocol number CEUAx 9802060420 (00 003346), under the responsibility José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day August 12, 2020.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Padronização do PCR em tempo real para diagnóstico de tuberculose bovina proveniente de amostras clínicas e estudo comparativo com a técnica de isolamento.", protocolado sob o CEUAx nº 9802060420, sob a responsabilidade de José Soares Ferreira Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 12 de agosto de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CASTRO, Juliana Fernandes de Paula

Título: **Padronização da PCR em Tempo Real (qPCR) para diagnóstico de tuberculose bovina a partir de amostras de lesões sugestivas colhidas em abatedouros**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho ao meu avô, Nilson Castro (in memoriam), quem me ensinou a amar e respeitar os animais! Sei que ficaria muito orgulhoso!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, pelo apoio incondicional, por acreditar em mim e por sempre me incentivar a buscar meus objetivos, por mais distantes que estivessem.

Ao meu irmão, Daniel, por sempre estar presente, segurando as pontas e por ser exemplo de honestidade.

Ao Diego, pelo companheirismo de tantos anos e por viver mais essa etapa comigo. Mesmo nos momentos mais inóspitos sempre estive ao meu lado.

A minha vó, Prof. Dr. Nísia Floresta, que sempre me serviu de inspiração na área acadêmica e na vida, por ter tido tanta garra e bravura!

Aos amigos do laboratório, Gisele Souza, Antônio Souza, Israel Guedes e Matheus Cavalini, por todo o aprendizado e incontáveis momentos bons. Sem vocês esse processo teria sido muito mais difícil. São amigos que vou levar para vida!

Ao meu pai, que apesar de distante, se esforçou muito para nos oferecer estudo e educação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jose Soares Ferreira Neto, pela oportunidade e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann, por toda ajuda, disponibilidade e paciência.

A Sueli e Sheila do Laboratório de Biologia Molecular pela disponibilidade e por sempre me orientarem, desde o início do projeto!

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado, pelo programa PEC-PG, processo 133406/2020-2.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá!”

Ayrton Senna.

RESUMO

CASTRO, J.F.P. Padronização da PCR em Tempo Real (qPCR) para diagnóstico de tuberculose bovina a partir de amostras de lesões sugestivas colhidas em abatedouros. 2022. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Para dar agilidade ao processo de diagnóstico direto da tuberculose bovina em lesões de carcaças condenadas pela doença em abatedouros, principal mecanismo de revelação de focos em Sistema de Vigilância (SV), duas técnicas de qPCR para detecção do agente diretamente do homogeneizado das lesões foram padronizadas e comparadas ao isolamento e identificação do *M. bovis*, considerada o padrão ouro. Assim, 167 amostras de lesões de carcaças condenadas por tuberculose, colhidas pelos Serviços de Inspeção de abatedouros dos estados de Mato Grosso e Santa Catarina foram homogeneizadas e submetidas ao isolamento e identificação do *M. bovis*, à qPCR IS1081 e à qPCR RD4. Os resultados de ambas qPCR mostraram-se fortemente associados aos do isolamento e identificação do *M. bovis* ($p < 0,01$), com índice de concordância de 0,58 (moderada). Quando comparadas entre si, ambas qPCR exibiram resultados fortemente associados ($p < 0,01$), com índice de concordância de 0,89 (forte). A Sensibilidade e a Especificidade da qPCR IS1081 foram de = 0,80 [0,69; 0,88] e 0,79 [0,71; 0,86]. Para a qPCR RD4 esses mesmos valores foram de 0,74 [0,62; 0,83] e = 0,84 [0,76; 0,90]. As estimativas da Sensibilidade e a Especificidade da qPCR RD4, específica para *M. bovis*, adotando como padrão ouro os resultados em paralelo dos outros dois métodos, foram de 0,74 [0,64; 0,83] e 1,00 [0,96; 1,00]. Em conclusão, os resultados obtidos para as duas qPCR foram equivalentes e a qPCR RD4 tem potencial para substituir a bacteriologia clássica, com vantagens operacionais, nas ações de detecção de focos de bTb no âmbito do SV para a doença.

Palavras chave: Tuberculose bovina, diagnóstico direto, qPCR

ABSTRACT

CASTRO, J.F.P. Standardization of Real Time PCR (qPCR) for the diagnosis of bovine tuberculosis from samples of suggestive lesions collected in slaughterhouses. 2022. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

To speed up the process of direct diagnosis of bovine tuberculosis in lesions of carcasses condemned for the disease in slaughterhouses, the main mechanism for revealing infected herds in the surveillance system (SV), two qPCR techniques for detecting the agent directly from the homogenate of lesions were standardized and compared to the isolation and identification of *M. bovis*, considered the gold standard. Thus, 167 samples of lesions from carcasses condemned for tuberculosis collected by the Inspection Services of slaughterhouses in the states of Mato Grosso and Santa Catarina were homogenized and submitted to the isolation and identification of *M. bovis*, qPCR IS1081 and qPCR RD4. The results of both qPCR were strongly associated with those of *M. bovis* isolation and identification ($p < 0.01$), with an agreement index of 0.58 (moderate). When compared to each other, both qPCR showed strongly associated results ($p < 0.01$), with a concordance index of 0.89 (strong). The Sensitivity and Specificity of the qPCR IS1081 were 0.80 [0.69; 0.88] and 0.79 [0.71; 0.86]. For the qPCR RD4 these same values were 0.74 [0.62; 0.83] and = 0.84 [0.76; 0.90]. The estimates of Sensitivity and Specificity of the *M. bovis*-specific qPCR RD4, adopting as gold standard the parallel results of the other two methods, were 0.74 [0.64; 0.83] and 1.00 [0.96; 1.00]. In conclusion, the results obtained for the two qPCR were equivalent and the qPCR RD4 has the potential to replace classical bacteriology, with operational advantages, in actions to detect bTb infected herds within the scope of the SV for the disease.

Key words: Bovine Tuberculosis, direct diagnosis, qPCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eficiência da amplificação para o gene IS1081 calculada por meio da curva padrão.....	26
Figura 2 - Amplificação da curva padrão IS1081 com diluição de 1:10 do DNA de <i>M. bovis</i> AN5.....	26
Figura 3 - Eficiência da amplificação para o gene RD4 calculada por meio da curva padrão.....	27
Figura 4 - Amplificação da curva padrão RD4 com diluição de 1:10 do DNA de <i>M. bovis</i> AN5.....	27

:

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interpretação do Índice Kappa.....	22
Tabela 2 - Repetição do gene IS1081 dentro do genoma de <i>M. bovis</i>	23
Tabela 3 - Repetição do gene RD4 dentro do genoma de <i>M. bovis</i>	23
Tabela 4 - Determinação do limiar de detecção para o gene IS1081 a partir da cepa de <i>M. bovis</i> , AN5.....	24
Tabela 5 - Determinação do limiar de detecção para o gene RD4 a partir da cepa de <i>M. bovis</i> , AN5.....	25
Tabela 6 - Cts obtidos na curva padrão de <i>M. bovis</i> para os genes IS1081 e RD4.....	28
Tabela 7 - Cts obtidos em ensaio com os genes IS1081 e RD4 para determinar o limite de detecção da padronização do qPCR.....	28
Tabela 8 - Demonstrativo do Ct médio, desvio padrão, intervalo de confiança de 95% e cálculo do limite de detecção para o gene IS1081.....	29
Tabela 9 - Demonstrativo do Ct médio, desvio padrão, intervalo de confiança de 95% e cálculo do limite de detecção para o gene RD4.....	29
Tabela 10 - Resultados das técnicas de isolamento e identificação de <i>M. bovis</i> da qPCR IS1081 e da qPCR RD4.....	30
Tabela 11 - Resultados das técnicas de isolamento e identificação de <i>M. bovis</i> (padrão ouro) e de detecção do Complexo <i>M. tuberculosis</i> pela qPCR IS1081.....	31
Tabela 12 - Resultados das técnicas de isolamento e identificação de <i>M. bovis</i> (padrão ouro) e de detecção de <i>M. bovis</i> pela qPCR RD4.....	31
Tabela 13 - Resultados das técnicas de detecção do Complexo <i>M. tuberculosis</i> pela qPCR IS1081 e de detecção de <i>M. bovis</i> pela qPCR RD4.....	32
Tabela 14 - Resultados das técnicas de isolamento e identificação de <i>M. bovis</i> e de detecção do Complexo <i>M. tuberculosis</i> pela qPCR IS1081 interpretadas em paralelo (padrão ouro) e de detecção do <i>M. bovis</i> pela qPCR RD4.....	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Primers e sondas utilizados para caracterização molecular dos isolados de <i>M. bovis</i>	20
--	----

Abreviaturas e sinais

AN5 – Cepa de *Mycobacterium bovis*
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
bTb – Tuberculose bovina
CMT – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
Ct – Cycle threshold
DNA – Ácido desoxirribonucleico
HPC – Contagem de Placas Heterotróficas
H37Rv – Cepa de *Mycobacterium tuberculosis*
IC – Intervalo de Confiança
LOD – Limite de Detecção
LZB – Laboratório de Zoonoses Bacterianas
M.bovis – *Mycobacterium bovis*
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR – PCR em tempo real
RD4 – Região de Deleção 4
SV – Sistemas de Vigilância
TE – Tris EDTA
TM – Temperatura de *melting*
°C – Grau Celsius
® - Registrado
™ – *Trade mark*
% – Porcentagem
< – Menor
µL – Microlitro

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Seleção das amostras	18
3.2	Isolamento e identificação de <i>M.bovis</i> a partir de amostras de lesões sugestivas de tuberculose colhidas em abatedouros	18
3.3	Padronização da qPCR IS1081 e qPCR RD4	19
3.4	Extração do DNA proveniente do tecido para detecção de <i>M. bovis</i> pela qPCR	19
3.5	Quantificação do DNA extraído, a partir do tecido bovino	20
3.6	Caracterização molecular do DNA proveniente do tecido por qPCR.....	20
3.7	Cálculo do genoma de referência para IS1081 e RD4	21
3.8	Padronização da curva Mbo.IS1081 e RD4 com controle positivo <i>M. bovis</i> AN5	21
3.9	Limite de Detecção (LOD)	21
3.10	Análise dos resultados.....	21
4	RESULTADOS	23
4.1	Padronização da reação de qPCR para os genes IS1081 e RD4 utilizando a cepa AN5 de <i>M. bovis</i>	23
4.2	Resultado das análises das 167 amostras	29
4.3	Comparação entre as técnicas	31
5	DISCUSSÃO	33
6	CONCLUSÃO	36
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (bTb) é uma zoonose infectocontagiosa, causada pelo *Mycobacterium bovis*, bacilo aeróbico, imóvel, não capsulado, não flagelado, medindo aproximadamente 0,5µm de comprimento por 0,3µm de largura e álcool-ácido-resistente quando corado pelo método de *Ziehl-Neelsen* (CORREIA & CORREIA, 1992).

A principal forma de transmissão no rebanho ocorre por aerossóis, sendo a via respiratória a principal porta de entrada (BEER, 1998; BRASIL, 2006). A aquisição de animais de condição sanitária desconhecida é o fator de risco preponderante para a introdução da doença nas propriedades brasileiras (FERREIRA NETO et al., 2016).

De evolução crônica, é caracterizada pelo surgimento de lesões nodulares localizadas principalmente no trato respiratório superior e linfonodos brônquicos e mediastínicos, além do fígado, podendo acometer outros órgãos ou tecidos e levar anos para produzir sinais clínicos nos animais acometidos (BEER, 1998; INNES, 2002).

A doença gera diversos prejuízos ao produtor, como queda na produção de leite, perda na produção de carne e a perda referente à condenação de carcaças com lesões de tuberculose no abatedouro, além de representar uma barreira não-tarifária ao livre comércio de animais e produtos de origem animal (CORREIA & CORREIA, 1992; BRASIL, 2006).

O método padrão ouro para diagnóstico direto da tuberculose bovina é o isolamento bacteriano em meios de cultura (*Löwenstein-Jensen* e *Stonebrink-Lesslie*), seguido da identificação por métodos moleculares, porém demanda muito tempo (30 a 90 dias), além de necessitar de níveis de biossegurança elevados e mão de obra altamente qualificada. Isso prejudica o andamento de programas de erradicação da doença, pois o principal mecanismo de detecção de focos do Sistema de Vigilância (SV) é o diagnóstico direto em lesões de carcaças condenadas por tuberculose em abatedouros e subsequente rastreamento e saneamento dos focos (BRASIL, 2006).

Para dar agilidade ao processo, vários pesquisadores vêm estudando alternativas moleculares aplicáveis diretamente a tecidos e órgãos com lesões sugestivas de tuberculose, relatando valores de sensibilidade entre 76 a 94% (NAHAR et al., 2011; ARAÚJO et al., 2014; MOURA et al., 2016; DYKEMA et al., 2016; USDA, 2018; LORENTE-LEAL et al., 2019).

No Brasil, o estado de MT já está implementando estratégias de erradicação para a doença (INDEA-MT, 2014) e será seguido por outros muito em breve. Assim, o objetivo do presente estudo é padronizar um método de qPCR para diagnóstico direto da tuberculose a partir de lesões em tecidos e órgãos, que seja facilmente implementado pelas rotinas laboratoriais dos Serviços Veterinários Oficiais brasileiros, visando dar qualidade e agilidade aos mecanismos de detecção de focos dos SV para tuberculose bovina que começarão a emergir no país. Além disso, pretende comparar a sua performance com o isolamento e identificação do *M. bovis*.

2 OBJETIVO

Padronização da técnica de qPCR para diagnóstico da tuberculose bovina a partir de amostras de tecidos/órgãos com lesões sugestivas da doença e comparação com o isolamento e identificação do *M. bovis*, considerada a técnica padrão ouro para o diagnóstico direto da tuberculose bovina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção das amostras

As amostras pertenciam a rotina de diagnóstico da tuberculose bovina, mantida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) da FMVZ-USP. Foram coletadas em abatedouros pelos Serviços de Inspeção brasileiros e encaminhadas ao LZB para diagnóstico de tuberculose bovina na forma congelada em frascos hermeticamente fechados, conforme recomendado pela ANVISA, compondo, no LZB, um banco de lesões sugestivas de tuberculose congeladas para estudos posteriores, caso deste projeto.

Os órgãos mais frequentemente acometidos por lesões granulomatosas são os linfonodos (principalmente de cabeça e tórax), pulmões e fígado. Quando a infecção ocorre por via digestiva, os linfonodos mais acometidos são faríngeos e mesentéricos, além do próprio intestino (OIE, 2018). Um painel de 167 amostras, oriundas das rotinas dos Serviços de Inspeção de abatedouros dos estados de Mato Grosso e Santa Catarina foram selecionadas para o presente estudo.

Todas as 167 amostras foram submetidas a três métodos diretos de diagnóstico da tuberculose bovina: 1) isolamento e identificação do *M. bovis*; 2) detecção do Complexo *M. tuberculosis* (CMT) pela qPCR IS1081; 3) detecção de *M. bovis* pela qPCR RD4.

3.2 Isolamento e identificação de *M. bovis* a partir das amostras de lesões sugestivas de tuberculose colhidas em abatedouros

Em cabine de segurança biológica classe II, cerca de 1g de tecido contendo lesão característica de tuberculose bovina foi macerada em 5 mL de solução salina 0,85% com auxílio do homogeneizador automático (Stomacher®). As amostras foram submetidas ao processo de descontaminação pela pelo método de contagem de placas heterotróficas 1,5% (HPC), (AMBROSIO et al., 2008) sendo semeado em duplicata nos meios *Lowenstein-Jensen* e *Stonebrink Leslie* e mantidos em estufa a 37°C. Foram monitoradas semanalmente pelo período de 90 dias (BRASIL, 2006).

A identificação dos isolados foi realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Em cabine de segurança biológica classe II, uma alíquota da

cultura bacteriana, foi dissolvida em 200µL de tampão TE (10 mM Tris, 1mM EDTA pH 8.5). A solução foi colocada em microtubo livre de DNase e RNase e submetida a três ciclos de fervura a 100°C por 20 minutos seguido de congelamento a -20°C (MIYATA et. al., 2011).

Para identificação dos isolados de *M. bovis*, o alvo foi a Região de Deleção 4 (RD4), gene com 268pb. RD4 1 (ATGTGCGAGCTGAGCGATG), RD4 2 (TGTACTIONATGCTGACCCATGCG), RD4 3 (AAAGGAGCACCATCGTCCAC) (WARREN et. al., 2006). A cepa AN5 foi utilizada como controle positivo da reação. Amostras amplificadas com 268 pb foram identificadas como *M. bovis* e, ampliações com 172 pb, como outras micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium Tuberculosis*.

3.3 Padronização da qPCR IS1081 e qPCR RD4

As qPCR foram padronizadas no instrumento StepOne™ Real Time PCR System, utilizando sistema TaqMan™ Universal Master Mix II, applied biosystem. Visando o ajuste das melhores concentrações dos reagentes da qPCR, os testes foram realizados empiricamente, de acordo com ajustes nas concentrações de iniciadores e na temperatura de anelamento. As amostras foram consideradas positivas somente com análise de curva de *melting* com picos de temperatura que não diferissem em mais de 1°C do controle positivo utilizado no mesmo experimento (BRASIL, 2015).

3.4 Extração do DNA proveniente do tecido para detecção de *M. bovis* pela qPCR

Duzentos microlitros (200 µl) do homogeneizado do tecido foram transferidos em duplicata, para microtubos livres de DNase e RNase. Sequencialmente, o DNA foi extraído utilizando kit comercial Qiagen - DNeasy Blood & Tissue Kit® (MOURA et.al., 2016), seguindo as recomendações do fabricante. Em cada extração um controle positivo de cultura bacteriana inativada de *M. bovis* – AN5 foi incluído (CANEVARI CASTELÃO et al., 2014), assim como três controles negativos de TE (10 mM Tris, 1mM EDTA pH 8.5), ambos com 200 µl.

3.5 Quantificação do DNA extraído, a partir do tecido bovino

Cada amostra foi quantificada com auxílio do Nanodrop®, e foram consideradas as razões 260/280 com valor aproximado de 1.80 e 230/260 com valor aproximado de 2.00, garantindo a qualidade do DNA extraído em relação a lipídeos ou proteínas e sais da extração.

3.6 Caracterização molecular do DNA proveniente do tecido por qPCR

Estudos sugerem que a região do genoma bacteriano denominada 16S rDNA possui a capacidade de avaliar a diversidade do agente (CHOI et al., 2015); desta forma, para caracterização do DNA proveniente do tecido, os alvos foram as regiões IS 1081, com 124 pb, para bactérias pertencentes ao CMT e RD4, com 88 pb, para *M. bovis* (MOURA et.al., 2016).

Quadro 1. *Primers* e sondas utilizados para a caracterização molecular dos isolados de *M. bovis*.

Oligonucleotídeos	Sequência de Oligonucleotídeos	Concentração (nM)
Mbo.IS1081.124.F	5'AGGAACGCCTCAACCGAGAAG3'	600
Mbo.IS1081.124.R	5'CCTTCGATCCATTTTCGTCGTG3'	600
Mbo.IS1081.124.S	5'FAM-CGACGCCGAACCGACGTCGTC-lowaBlack3'	300
Mbo.RD4.88.F	5'CGCCTTCCTAACCAGAATTG3'	600
Mbo.RD4.88.R	5'GGAGAGCGCCGTTGTAGG3'	600
Mbo.RD4.88.S	5'FAMAGCCGTAGTCGTGCAGAAGCGCA-lowaBlack 3'	300

Para padronização, a sequência de *primers* descritos no quadro 1 foi acessada no Basic Local Alignment Search Tool - Blast. O genoma completo de *M. bovis* de referência Danish 1331 CP 039850 foi compatível ao alinhamento inicial. Verificou-se a repetição do gene IS1081 dentro do genoma completo do *M. bovis* de referência, assim como a região de cada repetição. O mesmo procedimento foi realizado com o gene RD4.

3.7 Cálculo do genoma de referência para IS1081 e RD4

O cálculo do genoma de referência é uma etapa importante na padronização da qPCR e determina o limiar de carga bacteriana possível de captação como positivo pelo aparelho.

A fluorescência emitida em cada análise aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são armazenados durante os ciclos e amplificados na forma de gráfico (NOVAIS et al., 2004).

O threshold é o ponto que detecta que a reação atingiu o limiar de amplificação que permite a quantificação do produto baseado na sua fluorescência (NOVAIS et al., 2004).

Para realização do cálculo de genoma de referência foram utilizados o peso molecular do genoma completo, o tamanho do genoma completo e a quantidade de DNA quantificada pelo Nanodrop® (cultura de *M. bovis* AN5).

3.8 Padronização da curva Mbo IS1081 e RD4 com controle positivo *M. bovis* AN5

Para padronização, a curva do *M. bovis*, utilizando a cepa AN5 foi realizada em duplicata, com diluições seriadas em base 10, sendo possível determinar os positivos através de escala comparativa, realizando o ajuste do threshold (limiar do valor de luminescência atingido em cada corrida de qPCR) de ambas.

3.9 Limite de Detecção (LOD)

O limite de detecção é representado por meio da identificação da maior diluição em que todas as amostras do controle positivo AN5, previamente diluídas na proporção de 1:10, apresentaram amplificação.

3.10 Análise dos resultados

Após obtenção dos resultados do isolamento/identificação (padrão ouro), da qPCR IS1081 e da qPCR RD4, foram calculadas as associações (qui-quadrado) e a

concordância (índice Kappa, com interpretação segundo Tabela 1) entre os três métodos, além da Sensibilidade e Especificidade das duas técnicas de qPCR, tendo como padrão ouro o isolamento e identificação do agente. Também foram calculadas a Sensibilidade e a Especificidade da qPCR RD4, tendo como padrão ouro o protocolo em paralelo do isolamento e identificação do agente e da detecção do complexo *M. tuberculosis* pela qPCR IS1081. Todos os cálculos foram realizados com o auxílio do programa *Python*.

Tabela 1. Interpretação do Índice Kappa.

Valor de Kappa	Interpretação da associação ou concordância
0 a 0,2	fraca
0,21 a 0,4	razoável
0,41 a 0,6	moderada
0,61 a 0,8	forte

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da reação de qPCR para os genes IS1081 e RD4 utilizando a cepa AN5 de *M. bovis*.

A padronização das reações foi realizada em duas etapas distintas utilizando a cepa de referência AN5 para *M. bovis*, considerando a região iniciadora IS1081 para micobactérias pertencentes do CMT e RD4 para *M. bovis*.

O genoma completo de *M. bovis* de referência Danish 1331 CP 039850 foi acessado no *Blast*, identificando a repetição de IS1081 no genoma completo de *M. bovis*, conforme demonstrado na Tabela 2. O mesmo procedimento foi realizado com o gene RD4, Tabela 3.

Tabela 2. Repetição do gene IS1081 dentro do genoma de *M. bovis*.

Mbo.IS1081.124.F	Mbo.IS1081.124.R	Mbo.IS1081.124.S
<i>Plus minus</i>	<i>Plus minus</i>	<i>Plus plus</i>
1343171	1171360	1171279
2772668	3416873	3416792
3315838	<i>Plus plus</i>	<i>Plus minus</i>
<i>Plus plus</i>	1343066	1343147
1171256	2772563	2772644
3416769	3315733	3315814

Tabela 3. Repetição do gene RD4 dentro do genoma de *M. bovis*.

Mbo.RD4.88.F	Mbo.RD4.88.R	Mbo.RD4.88.S
<i>Plus plus</i>	<i>Plus plus</i>	<i>Plus plus</i>
1692939	1692843	1692884

O cálculo do genoma de referência foi realizado para delinear o limiar seguro de detecção em amostras positivas para o gene IS1081, utilizando a cepa AN5, referência para *M. bovis*.

$$\begin{aligned}
 1 \text{ Mol (peso molecular)} &= 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/cópias} \\
 (\text{Quantificação do DNA}) \times 10^{-9} \text{ g} &= X \\
 1363220578,50 &= 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/cópias} \\
 7,5 \times 10^{-9} \text{ g} &= X \\
 &= 3,31 \times 10^6 \text{ cópias}/\mu\text{l} \\
 &= 3,31 \times 10^6 \text{ cópias}/\mu\text{l} \times 2 \text{ (reação padronizada com } 2\mu\text{l de DNA)} \\
 &= 6,62 \times 10^6 \text{ genomas} \\
 &= 6,62 \times 10^6 \text{ genomas} \times 5 \text{ (gene com 5 repetições no genoma)} \\
 &= 33 \times 10 \times 10^6 \text{ cópias}
 \end{aligned}$$

Determinando a diluição 10^{-7} , com 3 cópias de DNA segura para detecção de amostras positivas no gene IS1081, Tabela 4.

Tabela 4. Determinação do limiar de detecção para o gene IS1081 a partir da cepa de *M. bovis*, AN5.

Limiar de detecção para AN5 (gene IS1081)		
DNA puro	$3,31 \times 10^7$	30000000 cópias
10^{-1}	$3,31 \times 10^6$	3000000 cópias
10^{-2}	$3,31 \times 10^5$	300000 cópias
10^{-3}	$3,31 \times 10^4$	30000 cópias
10^{-4}	$3,31 \times 10^3$	3000 cópias
10^{-5}	$3,31 \times 10^2$	300 cópias
10^{-6}	$3,31 \times 10^1$	30 cópias
10^{-7}	$3,31 \times 10$	3 cópias

O cálculo do genoma de referência foi realizado para delinear o limiar seguro de detecção em amostras positivas para o gene RD4, utilizando a cepa AN5, referência para *M. bovis*.

$$\begin{aligned}
 1 \text{ Mol (peso molecular)} &= 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/cópias} \\
 (\text{Quantificação do DNA}) \times 10^{-9} \text{ g} &= \text{X} \\
 1363220578,50 &= 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/cópias} \\
 7,5 \times 10^{-9} \text{ g} &= \text{X} \\
 &= 3,31 \times 10^6 \text{ cópias}/\mu\text{l} \\
 = 3,31 \times 10^6 \text{ cópias}/\mu\text{l} \times 2 \text{ (reação padronizada com } 2\mu\text{l de DNA)} \\
 &= 6,62 \times 10^6 \text{ cópias} \\
 = 6,62 \times 10^6 \text{ genomas} \times 1 \text{ (gene com repetição única no genoma)} \\
 &= 6 \times 10^6 \text{ cópias}
 \end{aligned}$$

Determinando a diluição 10^{-6} , com 6 cópias de DNA segura para detecção de amostras positivas no gene RD4, Tabela 5.

Tabela 5. Determinação do limiar de detecção para o gene RD4 a partir da cepa de *M. bovis*, AN5.

Limiar de detecção para AN5 (gene RD4)		
DNA puro	$3,31 \times 10^7$	6000000 cópias
10^{-1}	$3,31 \times 10^6$	600000 cópias
10^{-2}	$3,31 \times 10^5$	60000 cópias
10^{-3}	$3,31 \times 10^4$	6000 cópias
10^{-4}	$3,31 \times 10^3$	600 cópias
10^{-5}	$3,31 \times 10^2$	60 cópias
10^{-6}	$3,31 \times 10^1$	6 cópias
10^{-7}	$3,31 \times 10$	0,6 cópias

A curva padrão foi constituída em duplicata para os genes IS1081 e RD4, a partir de diluições seriadas da cepa AN5, referência para *M. bovis*.

A eficiência da curva IS1081 foi obtida por meio de parâmetros utilizando o valor da reta (slope), da linha de regressão, de -3,39, garantindo eficiência de 96,88%. O R2 foi de 0,999, evidenciando uma boa reação, demonstrada na Figura 1. A curva padrão realizada na diluição 1:10 está indicada na Figura 2.

Figura 1. A eficiência da amplificação para o gene IS1081 foi calculada por meio da curva padrão constituída com as diluições seriadas, utilizando o valor da inclinação da reta (slope) da linha de regressão.

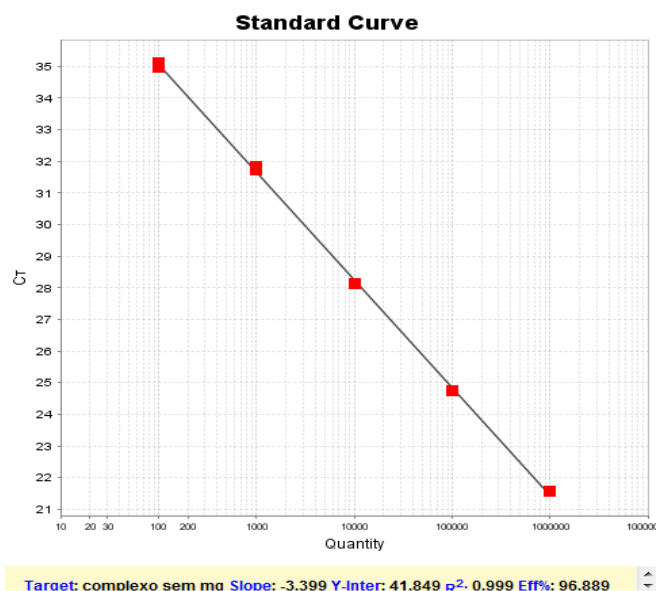
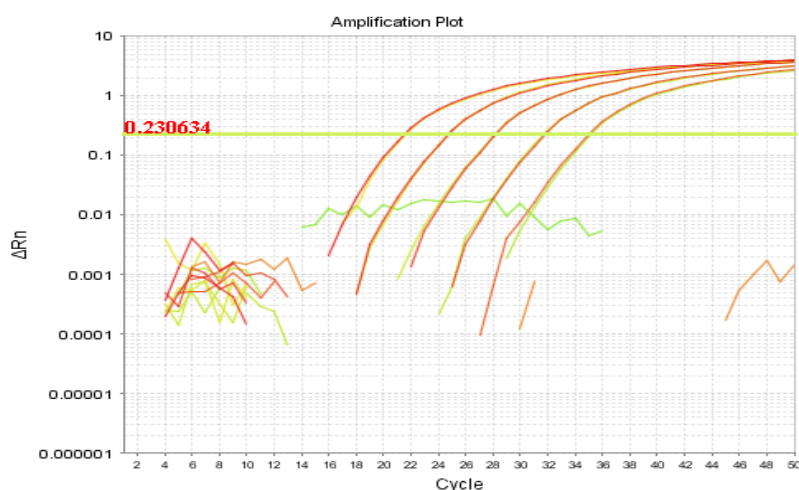


Figura 2. Amplificação da curva padrão IS1081 com diluição de 1:10 do DNA de *M. bovis* AN5.



A eficiência da curva RD4 foi obtida por meio de parâmetros utilizando o valor da reta (slope), da linha de regressão, de -3,39, garantindo eficiência de 97,16%. O R2 foi de 0,998, evidenciando uma boa reação, demonstrada na Figura 3. A curva padrão realizada na diluição 1:10 está indicada na Figura 4.

Figura 3. A eficiência da amplificação para o gene RD4 foi calculada por meio da curva padrão constituída com as diluições seriadas, utilizando o valor da inclinação da reta (slope) da linha de regressão.

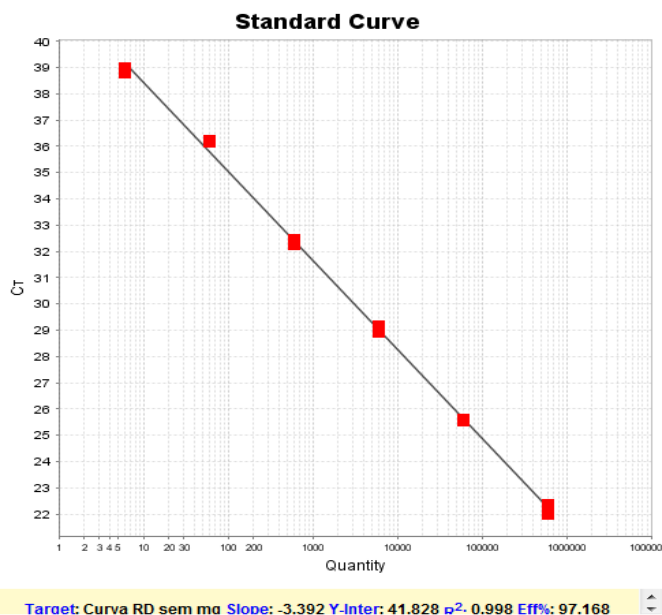
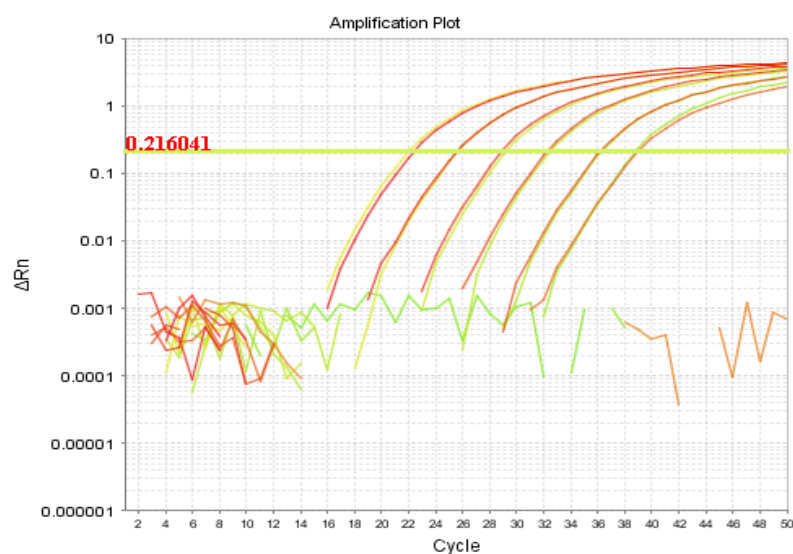


Figura 4. Amplificação da curva padrão RD4 com diluição de 1:10 do DNA de *M. bovis* AN5. O Ct é proporcionalmente inverso à quantidade de DNA.



A Tabela 6 demonstra os *Cts* de amplificação, em duplicata, obtidos na curva padrão de IS1081 e RD4, respectivamente.

Tabela 6. Cts obtidos na curva padrão de *M. bovis* para os genes IS1081 e RD4. Nessa análise a diluição 10-6 para o gene IS1081 foi desconsiderada devido a não replicação da duplicata.

Primer	10 ⁻¹ (Ct)	10 ⁻² (Ct)	10 ⁻³ (Ct)	10 ⁻⁴ (Ct)	10 ⁻⁵ (Ct)	10 ⁻⁶ (Ct)
Mbo.	21,55	24,73	28,16	31,84	34,96	-
IS1081	21,6	24,75	28,11	31,71	35,14	-
Mbo. RD4	22,37	25,55	28,89	32,25	36,16	38,98
	21,99	25,62	29,19	32,45	36,25	38,8

Considerando a sensibilidade analítica ao Cts médios em cada uma das análises foi 10-4 = 31,77 e 10-4 = 32,35, com Treshold de 0,230634 e 0,216041 para os genes IS1081 e RD4, respectivamente.

Os limites de detecção de *M. bovis* para os genes IS1081 e RD4 foram determinados por meio do Ct médio, cálculo do desvio padrão e intervalo de confiança de 95%. O ponto 10⁻⁶ para o gene RD4 e 10⁻⁷ para o gene IS1081 de amplificação máxima, foi analisado 8 vezes em um mesmo ensaio, com o objetivo de identificar a capacidade de detecção do limiar de positividade.

Dos 8 pontos de *M. bovis* analisados, 5 foram detectados como positivos para o gene IS1081, com Ct médio de 41,92, devendo, dessa forma, ser considerado no cálculo para o limiar de detecção de amostras positivas. Para o gene RD4, os 8 pontos foram considerados, com Ct médio de 39,01, demonstrado na Tabela 8.

Tabela 7. Cts obtidos em ensaio com os genes IS1081 e RD4 para determinar o limite de detecção da padronização do qPCR.

Primer	Limite de Detecção								Média (Ct)
	10 ⁻⁷ (Ct)	10 ⁻⁷ (Ct)	10 ⁻⁷ (Ct)	10 ⁻⁷ (Ct)	10 ⁻⁷ (Ct)	10 ⁻⁷ (Ct)	10 ⁻⁷ (Ct)	10 ⁻⁷ (Ct)	
Mbo. IS1081	-	-	42,537	-	43,436	41,159	42,589	41,983	41,92
Mbo. RD4	38,54	38,98	39	39,17	39,5	39,53	39,48	38,01	39,01

O limite de detecção para o gene IS1081 está demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8. Demonstrativo do Ct médio, desvio padrão, intervalo de confiança de 95% e cálculo do limite de detecção para o gene IS1081.

	Limite de Detecção	
Ct médio	38,9385714	41,9233333
DP	0,88146064	1,22663225
95%	0,37700002	0,98149218
LOD	39,3155714	42,9048255

O limite de detecção para o gene RD4 está identificado na Tabela 9.

Tabela 9. Demonstrativo do Ct médio, desvio padrão, intervalo de confiança de 95% e cálculo do limite de detecção para o gene RD4.

	Limite de Detecção	
Ct médio	36,15	39,00125
DP	0,10099505	0,53749253
95%	0,0431955	0,22988513
LOD	36,1931955	39,2311351

4.2 Resultados das análises das 167 amostras

Os resultados das técnicas de isolamento e identificação de *M. bovis*, da qPCR IS1081 e da qPCR RD4, realizadas nas 167 amostras constam da Tabela 10.

Tabela 10. Resultados das técnicas de isolamento e identificação de *M. bovis*, da qPCR IS1081 e da qPCR RD4.

número da amostra	procedência da amostra	resultado do teste: positivo=1; negativo=0			número da amostra	procedência da amostra	resultado do teste: positivo=1; negativo=0			número da amostra	procedência da amostra	resultado do teste: positivo=1; negativo=0			número da amostra	procedência da amostra	resultado do teste: positivo=1; negativo=0		
		Isolamento de <i>M. bovis</i>	qPCR IS1081	qPCR RD4			Isolamento de <i>M. bovis</i>	qPCR IS1081	qPCR RD4			Isolamento de <i>M. bovis</i>	qPCR IS1081	qPCR RD4			Isolamento de <i>M. bovis</i>	qPCR IS1081	qPCR RD4
1	MT	0	1	1	43	MT	0	1	1	85	MT	0	1	1	127	MT	0	0	0
2	MT	0	1	1	44	MT	1	1	1	86	MT	0	0	0	128	MT	0	0	0
3	MT	0	1	1	45	MT	0	0	0	87	MT	0	1	1	129	MT	0	0	0
4	MT	0	0	0	46	MT	1	0	0	88	MT	0	0	0	130	MT	0	0	0
5	MT	0	0	0	47	MT	1	1	1	89	MT	0	1	1	131	MT	0	0	0
6	MT	0	1	0	48	MT	1	1	1	90	MT	0	1	1	132	MT	0	0	0
7	MT	1	1	1	49	MT	0	0	0	91	MT	0	0	0	133	MT	0	0	0
8	MT	1	1	1	50	MT	0	1	0	92	MT	0	0	0	134	SC	1	1	1
9	MT	1	1	1	51	MT	0	0	0	93	MT	0	0	0	135	SC	1	1	1
10	MT	1	1	1	52	MT	0	0	0	94	MT	0	0	0	136	SC	1	1	0
11	MT	0	1	1	53	MT	0	0	0	95	MT	0	0	0	137	SC	1	1	1
12	MT	0	1	1	54	MT	0	0	0	96	MT	0	0	0	138	SC	1	1	1
13	MT	0	1	1	55	MT	0	0	0	97	MT	0	0	0	139	SC	1	1	1
14	MT	0	0	0	56	MT	0	0	0	98	MT	0	0	0	140	SC	0	0	0
15	MT	0	0	0	57	MT	0	0	0	99	MT	0	1	1	141	SC	1	1	1
16	MT	1	1	1	58	MT	0	0	0	100	MT	0	0	0	142	SC	1	1	1
17	MT	0	0	0	59	MT	0	0	0	101	MT	0	0	0	143	SC	1	1	1
18	MT	1	1	1	60	MT	0	0	0	102	MT	0	0	0	144	SC	1	1	1
19	MT	0	1	1	61	MT	0	0	0	103	MT	0	0	0	145	SC	1	1	1
20	MT	1	0	0	62	MT	0	1	0	104	MT	0	1	1	146	SC	1	0	0
21	MT	1	1	1	63	MT	0	0	0	105	MT	1	0	0	147	SC	1	1	1
22	MT	0	0	0	64	MT	0	0	0	106	MT	1	1	1	148	SC	1	1	1
23	MT	0	1	1	65	MT	0	0	0	107	MT	1	1	1	149	SC	1	1	1
24	MT	0	0	0	66	MT	0	0	0	108	MT	1	1	1	150	SC	1	1	1
25	MT	1	1	1	67	MT	0	0	0	109	MT	1	1	1	151	SC	1	1	1
26	MT	1	1	0	68	MT	1	1	1	110	MT	1	1	1	152	SC	1	1	1
27	MT	1	1	1	69	MT	0	0	0	111	MT	0	0	0	153	SC	1	1	1
28	MT	0	0	0	70	MT	1	1	1	112	MT	0	0	0	154	SC	1	0	0
29	MT	1	1	1	71	MT	0	0	0	113	MT	1	0	0	155	SC	1	0	0
30	MT	0	1	0	72	MT	0	0	0	114	MT	1	0	0	156	SC	1	1	1
31	MT	0	0	0	73	MT	1	1	1	115	MT	1	1	0	157	SC	1	1	1
32	MT	0	0	0	74	MT	1	1	1	116	MT	0	0	0	158	SC	1	0	0
33	MT	0	0	0	75	MT	0	0	0	117	MT	0	0	0	159	SC	1	1	1
34	MT	0	0	0	76	MT	0	0	0	118	MT	0	0	0	160	SC	1	0	0
35	MT	0	0	0	77	MT	0	0	0	119	MT	1	0	0	161	SC	1	1	1
36	MT	0	0	0	78	MT	0	0	0	120	MT	1	1	0	162	SC	1	1	1
37	MT	0	0	0	79	MT	0	0	0	121	MT	0	0	0	163	SC	1	1	1
38	MT	1	0	0	80	MT	0	0	0	122	MT	0	0	0	164	SC	1	1	1
39	MT	1	1	1	81	MT	0	0	0	123	MT	0	0	0	165	SC	1	0	0
40	MT	0	1	1	82	MT	0	0	0	124	MT	0	0	0	166	SC	1	1	1
41	MT	0	0	0	83	MT	0	1	0	125	MT	0	0	0	167	SC	0	0	0
42	MT	0	0	0	84	MT	0	0	0	126	MT	0	0	0					

4.3 Comparação entre as técnicas

Os resultados das comparações entre as técnicas de isolamento e identificação de *M. bovis*, de detecção do complexo *M. tuberculosis* (qPCR IS1081) e de detecção de *M. bovis* (qPCR RD4) estão sintetizados nas Tabelas 11 a 14.

Tabela 11. Resultados das técnicas de isolamento e identificação de *M. bovis* (padrão ouro) e de detecção do complexo *M. tuberculosis* pela qPCR IS1081.

técnicas		qPCR IS1081		Total
		positivo	negativo	
isolamento e identificação de <i>M. bovis</i>	positivo	52	13	65
	negativo	21	81	102
Total		73	94	167

Valor de p para o qui-quadrado < 0,01

Índice Kappa = 0,581 (associação ou concordância moderada)

Sensibilidade da qPCR IS1081 = 0,80 [0,69; 0,88]

Especificidade da qPCR IS1081 = 0,79 [0,71; 0,86]

Tabela 12. Resultados das técnicas de isolamento e identificação de *M. bovis* (padrão ouro) e de detecção do *M. bovis* pela qPCR RD4.

técnicas		qPCR RD4		Total
		positivo	negativo	
isolamento e identificação de <i>M. bovis</i>	positivo	48	17	65
	negativo	16	86	102
Total		64	103	167

Valor de p para o qui-quadrado < 0,01

Índice Kappa = 0,583 (associação ou concordância moderada)

Sensibilidade da qPCR RD4 = 0,74 [0,62; 0,83]

Especificidade da qPCR RD4 = 0,84 [0,76; 0,90]

Tabela 13. Resultados das técnicas de detecção do complexo *M. tuberculosis* pela qPCR IS1081 e de detecção do *M. bovis* pela qPCR RD4.

técnicas		qPCR RD4		Total
		positivo	negativo	
qPCR IS1081	positivo	64	9	73
	negativo	0	94	94
Total		64	103	167

Valor de p para o qui-quadrado < 0,01

Índice Kappa = 0,89 (associação ou concordância forte)

Tabela 14. Resultados das técnicas de isolamento e identificação de *M. bovis* e de detecção do complexo *M. tuberculosis* pela qPCR IS1081 interpretadas em paralelo (padrão ouro) e de detecção do *M. bovis* pela qPCR RD4.

técnicas		qPCR RD4		Total
		positivo	negativo	
isolamento e identificação de <i>M. bovis</i> + qPCR IS1081 em paralelo	positivo	64	22	86
	negativo	0	81	81
Total		64	103	167

Sensibilidade da qPCR RD4 = 0,74 [0,64; 0,83]

Especificidade da qPCR RD4 = 1,00 [0,96; 1,00]

5 DISCUSSÃO

As vantagens da qPCR em relação à bacteriologia clássica (isolamento e identificação do agente) para o diagnóstico direto da tuberculose bovina a partir de homogeneizados de lesões são evidentes: maior rapidez (1 dia contra 60) e menor risco para o operador, pois não há manipulação de culturas puras. O menor tempo requerido pela qPCR é de fundamental importância, pois a sua utilização em SV para bTb tem o objetivo de detectar e subsequentemente rastrear as propriedades foco da doença. Assim, quanto menor o tempo transcorrido entre a condenação da carcaça por tuberculose em abatedouro e o resultado laboratorial confirmando a presença de *M. bovis* na lesão, maior a probabilidade de sucesso das operações de rastreamento dos focos.

Em relação à estrutura laboratorial exigida para a realização segura da bacteriologia clássica e da qPCR para bTb, existe diferença significativa, visto que a bacteriologia clássica exige protocolos de biossegurança do nível 3, com pressão negativa do ambiente, uso de equipamentos especiais para a homogeneização, centrifugação e manipulação dos isolados (Stomacher específico, centrífuga com bandejas de fechamento hermético e capela de segurança biológica nível II), grande capacidade de incubação em estufas e uso de EPI completo. Para a realização da qPCR, é possível prescindir do ambiente com pressão negativa, das centrífugas e das estufas, sendo possível o trabalho seguro em capela de segurança biológica nível II conjugado ao uso de EPI completo para as operações de homogeneização da amostra e extração do DNA apenas. Evidentemente, há necessidade do equipamento de PCR em tempo real.

A grande vantagem da qPCR em relação à PCR convencional é a eliminação da etapa de revelação em eletroforese em gel de ágar. Além disso, Dykema et al. (2016) e Taylor et al. (2007) referem que a qPCR oferece maior rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade do que a PCR convencional.

Utilizando como padrão ouro o isolamento e identificação de *M. bovis*, ambas qPCR revelaram boa Sensibilidade e Especificidade diagnósticas, corroborando os resultados obtidos por Dykema et al. (2016) e USDA (2018), demonstrando que as regiões escolhidas são adequadas para detecção do agente (Tabelas 11 e 12).

O processo de extração do material genético, primeiro passo da padronização das reações de qPCR, é fator determinante para a sensibilidade do método e

desafiador pois trata-se de extração de DNA diretamente do tecido, com abundante presença de inibidores da reação (MICHEL et al., 2010). Assim, optou-se por método robusto e prático, mas capaz de realizar a lise de tecidos densos, como granulomas e linfonodos, permitindo a recuperação de boa quantidade de material genético. Foram testados três protocolos (DNeasy Blood & Tissue, kit Qiagen; PureLink Genomic DNA, kit Invitrogen e o método *in house Boom*), sendo que o primeiro apresentou maior capacidade de recuperação de DNA de qualidade (dados não relatados nos resultados), corroborando os relatos de Moura et. al. (2016).

O limite de detecção de *M. bovis* utilizando a região IS 1081 foi 10^{-7} (3 cópias) e 10^{-6} para RD4 (6 cópias), resultando em LOD de 42,90 e 39,23 CTs, respectivamente. Considerando a sensibilidade analítica, os Cts médios foram $10^{-4} = 31,77$ para IS1081, e $10^{-4} = 32,35$ para RD4. Ambas qPCR foram desenvolvidas para resultados qualitativos, portanto, a quantidade de DNA utilizada nas reações não foi precisa. O LOD mais sensível, passível de identificação, são 3 cópias por PCR, (WITTEWER et. al., 2004), considerando intervalo de confiança de 95%, conforme os resultados da Tabela 7.

A região IS1081, embora detecte espécies do complexo *M. tuberculosis*, é amplamente utilizada em ensaios para diagnóstico de tuberculose bovina (TAYLOR et. al., 2007, MOURA et.al., 2016). Essa prática se sustenta, pois o *M. tuberculosis* raramente ocasiona doença progressiva em bovinos (ACHA; ZYFRES, 2001) e o *M. bovis* é a espécie mais prevalente do complexo *M. tuberculosis* a infectar bovinos (SELIM, et.al., 2014).

Os resultados de ambas qPCR mostraram-se fortemente associados aos do isolamento e identificação do *M. bovis* ($p < 0,01$), com índice de concordância, medido pelo indicador Kappa, próximo ao limite superior da classificação de moderada (Tabelas 11 e 12).

Quando comparadas entre si, ambas qPCR exibiram resultados fortemente associados ($p < 0,01$), com índice de concordância forte, medido pelo indicador Kappa (Tabela 13).

Constatamos que a Sensibilidade das qPCR (IS1081 e PCR RD4) em relação ao isolamento foram estatisticamente iguais (Tabelas 10 e 11), embora os valores pontuais tenham sido melhores para a qPCR IS1081. Taylor et. al. (2007) e Dykema et al. (2016) verificaram valores de Sensibilidade superiores para a qPCR IS1081, justificando o resultado como decorrente da natureza multicópias do gene IS1081 no

genoma do *M. bovis*. Taylor et. al. (2007) relataram sensibilidade de 91% (78/86 casos) para a qPCR IS1081, superior a encontrada no presente estudo, apenas após melhorar o protocolo de extração de DNA, evidenciando que essa é uma etapa fundamental no resultado da qPCR. Além do que, consideramos como positivas apenas amostras clínicas com duplicatas perfeitas (que não diferissem 0,5 Ct entre si, levando em conta a diferença na pipetagem), fator que pode ter contribuído para o valor de sensibilidade obtido.

Os resultados positivos para as qPCR e negativas ao isolamento (Tabelas 11 e 12) sugerem que as qPCR são mais eficientes na detecção de infecção por *M. bovis* do que a bacteriologia clássica. Isso é consequência da alta sensibilidade analítica das qPCR, capaz de detectar pequenas quantidades de DNA de *M. bovis*, mesmo que as bactérias estejam inativas em função da inadequação do armazenamento e transporte das amostras. Naturalmente, para a bacteriologia clássica, o agente tem que estar viável para crescer em meio de cultura. Araujo et al. (2005) corroboram estas afirmativas.

Comparadas à bacteriologia clássica, as qPCR apresentaram valores estatisticamente iguais de Especificidade, embora o valor pontual para a qPCR RD4 tenha sido superior (Tabelas 11 e 12). Sales et. al. (2014), relataram Sensibilidade de 100% (IC = 98,02-100%) para a qPCR RD4, superior a encontrada no presente estudo, entretanto, a análise foi realizada diretamente com isolados bacterianos.

Considerando que o objetivo do presente estudo foi desenvolver metodologia de qPCR específica para *M. bovis*, fizemos uma estimativa da Sensibilidade e Especificidade da qPCR RD4, adotando como padrão ouro os resultados em paralelo dos outros métodos, obtendo valores bastante satisfatórios para Sensibilidade e de 1 para Especificidade (Tabela 14).

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos para as duas qPCR foram equivalentes e a qPCR RD4 tem potencial para substituir a bacteriologia clássica, com vantagens operacionais, nas ações de detecção de focos de bTb no âmbito do SV para a doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.; ZYFRES, B. (2001). Tuberculosis zoonótica. In P. ACHA; B. ZYFRES, Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales (pp. 266-283). Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud-OMS. Disponível em <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/Acha-Zoonosis-Spa.pdf>
- AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, E.M.D.; RODRIGUEZ, C.A.R.; FERREIRA NETO, J.S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Medical Microbiology*, 39(2), 2008.
- ARAUJO, C.P.; LEITE C.Q.F; PRINCE, K.A., JORGE, K.S.G.; OSÓRIO, A.L.A.R. *Mycobacterium bovis* identification by molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 749-752, 2005.
- ARAÚJO, C.P.; OSÓRIO, A.L.A.R.; JORGE, K.S.G.; RAMOS, C.A.; FILHO, A.F.S.; VIDAL, C.E.S.; ROXO, E.; NISHIBE, C.; ALMEIDA, N.F.; JÚNIOR, A.A.F.; SILVA, M.R.; NETO, J.D.B.; CERQUEIRA, V.D.; ZUMÁRRAGA, M.J.; ARAÚJO, F.R. Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine and Bubaline Tissues Using Nested-PCR for TbD1. *Plos One*, v.9, n.3, e91023, 2014.
- BRASIL. Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. Brasília. MAPA/DAS. 57p. 2015.
- BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCBET). Brasília: MAPA/SDA/DAS. 188p. 2006.
- BEER, J. Doenças Infecciosas em Animais Domésticos. São Paulo: Roca, 1998. p.178-183.
- CANEVARI-CASTELÃO, A.B. et al. Draft genome sequence of *Mycobacterium bovis* strain AN5, used for production of Purified Protein Derivative. *Genome Announc.*, v.2 p.e00277-14, 2014. from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3974946/> >. Accessed: Mar. 16, 2020.
- CHOI, Y.; HONG, S. R.; JEON, B. Y.; WANG, H. Y.; LEE, G. S.; CHO, S. N.; SHIM, T. S.; LEE, H. Conventional and real-time PCR targeting 16S ribosomal RNA for the

- detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 19, n. 9, p. 1102–1108, 2015.
- CORREIA, M.; CORREIA, N.M. *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. Editora: MEDSI, 1992, p.317-337.
- DYKEMA, P. E.; STOKES, K. D.; BECKWITH, N. R.; MUNGIN, J. W.; XU, L.; VICKERS, D. J.; REISING, M. M.; BRAVO, D. M.; THOMSEN, B. V.; ROBBEAUSTERMAN, S. Development and validation of a direct real-time PCR assay for *Mycobacterium bovis* and implementation into the United States national surveillance program. *Peer Journal PrePrints*, v. 4, p. e1703, 2016.
- FERREIRA NETO, J.S.; SILVEIRA, G.B.S.; ROSA, B.M.; GONÇALVES, V.S.P.; GRISI-FILHO, J.H.H.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, FERNANDO; HEINEMANN, M.B.; TELLES, E.O.; LAGE, A.P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3385-3402, 2016.
- INDEA-MT – Instituto de Defesa Agropecuária do estado de Mato Grosso. Portaria conjunta Sedraf-Indea/MT n. 009 de 14 de novembro de 2014. Institui o regulamento técnico do plano de vigilância para a Erradicação da Tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso e cria o Programa Estadual de Submissão de Granuloma do Estado de Mato Grosso. Disponível em <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=276860>.
- INNES, P.; JANSEN, J.; MARTIN, J.; WRIGHT, R. *Epidemiology Veterinary Science*. Ontário: OMAFRA, 2002.
- LORENTE-LEAL, V.; LIANDRIS, E.; CASTELLANOS, E.; BEZOS, J.; DOMÍNGUEZ, L.; DE JUAN, L.; ROMERO, B. Validation of a Real-Time PCR for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members in Bovine Tissue Samples. *Frontiers Veterinary Science*, v. 6, 2019.
- MICHEL, A.L.; MULLER, B.; VAN HELDEN, P.D. *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology*, v. 140, p. 371-378, 2010.
- MIYATA, M.; SANTOS, A. C. B.; MENDES, N. H.; CUNHA, E. A.; MELO, F. A. F.; LEITE, C. Q. F. Assessment of the quality of DNA extracted by two techniques from *Mycobacterium tuberculosis* for fast molecular identification and genotyping. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 774-777, 2011.

- MOURA, A., HODON, M. A., SOARES-FILHO, P. M., ISSA, M. A., OLIVEIRA, A. P., F., FONSECA-JUNIOR, A. A., Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real time PCR. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 46, n. 7, p. 1223-1228, 2016.
- NAHAR, Q.; PERVIN, M.T.; ISLAM, M.T.; KHAN, M.A.H.N.A. Application of PCR for the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Journal of The Bangladesh Agricultural University*, v.9, p. 73–78, 2011.
- NOVAIS C.M., PIRES-ALVES, M., SILVA, F.F PCR em tempo real – uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento – Edição nº 33- julho/dezembro 2004*.
- OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2018. Paris: OIE, 2018. chap. 1.1.5.
- SALES, M.L.; FONSECA JR, A.A.; ORZIL, L.; ALENCAR, A.P.; HODON, M.A.; SOARES FILHO, P.M.; SILVA, M.R.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS20 gene and the region of difference 4 for characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. *Mol. Res.* 13 (2): 4607-4616, 2014.
- SELIM, A.; EL-HAIG, M.; GAEDE, W. Real-time PCR assay targeting insertion elements IS1081 and IS6110 for detection of *Mycobacterium bovis* in lymph nodes of cattle. *Institute for Animal Husbandry*; 30 (1), p. 45-49, 2014.
- TAYLOR, G. M., WORTH, D.R., PALMER, S., JAHANS, K., HEWINSON, R.G.; Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*. 3:12, 2007.
- USDA – APHIS. United State Department of Agriculture. Animal and plant health inspection service. Riverdale: USDA, 2018.
- WARREN, R.M.; GEY van PITTIUS, N.C.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; KOCK, M.; GUTIERREZ, M.C.; CHEGE, G.K.; VICTOR, T.C.; HOAL, E.G.; van HELDEN, P.D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 10, p. 818-822. 2006.
- WITTEWER, C.T.; KUSAKAWA, N.; Real-time PCR. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang JW, Unger ER, Relman DA, White TJ, eds. *Molecular*

Microbiology: diagnostic, principles and practice. Washington: ASM Press; 2004. P 71-84.