

MARCO ANTONIO CARDOSO

Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* em linfonodos de bovinos  
pela reação em cadeia da polimerase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias e Saúde do Homem

Orientador: Profa. Dra. Maria Valdrinez Campana Lonardoní

Maringá

2006

## RESUMO

A tuberculose bovina é uma importante zoonose em todo mundo e seu diagnóstico laboratorial apresenta, até hoje, dificuldades relacionadas ao cultivo e identificação do *Mycobacterium bovis*. Para um diagnóstico mais rápido em amostras teciduais bovinas e de leite tem sido aplicada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Neste estudo avaliou-se a eficiência de seis métodos de extração de DNA e padronizou-se a técnica da PCR para o diagnóstico da tuberculose bovina a partir de amostras de linfonodos, utilizando como referência o isolamento do bacilo em meio de cultura. Dos seis métodos de extração avaliados quatro apresentaram resultados satisfatórios, porém um foi selecionado devido sua eficiência e menor custo. Este método consistia de tratamento da amostra pelo método de Petroff seguido de banho de água fervente, acrescido de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). Foram analisadas 35 amostras de linfonodos de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose ou teste tuberculínico positivo, abatidos em frigoríficos da região noroeste do Estado do Paraná, Brasil. Dezesete amostras apresentaram crescimento de *M. bovis* em meio de Stonebrink, sendo que destas 14 apresentaram resultados positivos na PCR. Duas amostras com cultura negativa apresentaram resultado positivo na PCR. A sensibilidade da PCR em relação à cultura foi de 82,35%. Estes resultados sugerem que a PCR representa uma ferramenta importante e pode ser utilizada na detecção e identificação direta de *M. bovis* em amostras de linfonodos tornando o diagnóstico laboratorial da tuberculose bovina mais rápido, prático e útil no controle da doença.

Palavras Chave: *Mycobacterium bovis*; Linfonodos; Tuberculose Bovina; Diagnóstico; Reação em Cadeia da Polimerase.

## ABSTRACT

The laboratorial diagnosis of bovine tuberculosis presents a labor and lengthy work, considering the conventional culture conditions and identification of *Mycobacterium bovis*, a slowly growing micobacteria. Polymerase Chain Reaction (PCR) has been investigated to provide a more sensitive and a faster test to confirm bovine tuberculosis. In this study six different methods for extracting cromossomal DNA from bovine lymph nodes samples were investigated and an in house-PCR assay was standardize for detection of *M. bovis* in bovine lymph nodes considering the microbiological culture as a gold standard assay. Four methods for DNA extration showed good results, but one was choosen considering its low cost and efficacy. This method consisted of treatment of the sample for the method of Petroff following by bath of boiling water, added of YOU (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). Thirty-five bovine lymph nodes samples with suggestive macroscopic lesions or with a positive intradermal tuberculin results. Obtained from cattle in a slaughterhouse from northeast Paraná State, Brazil were investigated. The PCR assay detected *M. bovis* in fourteen lymph nodes sample from seventeen culture positive sample and in two that presented negative result culture. The sensitivity of PCR assay was 82,35% when compared with culture. The PCR assay results showed to be able to detect and provide the direct identification of *M. bovis* in bovine lymph nodes samples even though when the bacilli is nonviable for conventional culture and identification. It can make the laboratorial diagnosis of bovine tuberculosis faster, simple and it can support excellent applicability for epidemic manage of the disease.

Key words: *Mycobacterium bovis*; Lymph Nodes; Bovine Tuberculosis; Diagnostic; Polymerase Chain Reaction.