

Carta ao Editor

Limitações do uso do fragmento *mtp40* como marcador de diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*.

CRISTINA VIANA-NIERO, SYLVIA CARDOSO LEÃO

Os bacilos que causam a tuberculose estão agrupados no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por: *M. tuberculosis*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. africanum* e *M. microti*, além da cepa vacinal *M. bovis* BCG. Tem sido proposta a inclusão de novas espécies neste complexo, como *M. canettii*, uma variante de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália⁽¹⁾, *M. caprae*, agente etiológico de tuberculose em caprinos⁽²⁾, e *M. pinnipedii*, que causa tuberculose em leões marinhos, mas que também pode infectar o homem⁽³⁾.

Estudos de hibridação DNA-DNA, seqüenciamento de 16SrDNA, das seqüências intergênicas 16S-23S e do gene que codifica para a proteína de choque térmico *hsp65*⁽⁴⁾ evidenciam que os membros deste complexo constituem, de fato, uma única espécie. Por razões essencialmente ligadas à importância médica e veterinária do grupo, tais como poder patogênico e espectro de hospedeiros de cada espécie, a nomenclatura permanece.

M. tuberculosis é a principal bactéria deste complexo patogênica para o homem. Casos de tuberculose humana devidos a *M. africanum* e *M. canettii* foram reportados, principalmente na África⁽¹⁾. *M. bovis*, agente etiológico de tuberculose bovina, também pode infectar o homem e outros animais. Estudos na Argentina e Inglaterra reportaram que esta espécie é responsável por 0,4% a 1% dos casos de tuberculose humana^(5,6). De acordo com a Organização Panamericana da Saúde⁽⁷⁾, surgem 7.000 novos casos por ano na América do Sul. Não existem dados sobre a incidência de tuberculose humana causada por *M. bovis* no Brasil. Esta espécie é naturalmente resistente a pirazinamida, droga utilizada no tratamento da tuberculose humana, o que justifica a diferenciação destas espécies em determinados casos, principalmente quando houver evidência

epidemiológica que justifique esta suspeita, ou quando houver falha na resposta ao tratamento com esquemas que incluem pirazinamida.

O diagnóstico da doença causada por *M. tuberculosis* ou por *M. bovis* pode ser feito pela análise dos dados clínicos e radiológicos. Entretanto, o diagnóstico bacteriológico é necessário para confirmação do diagnóstico e identificação da espécie. *M. tuberculosis* e *M. bovis* podem ser diferenciados usando-se testes fenotípicos como os testes de niacina e produção de nitratos e as provas de crescimento na presença de TCH (hidrazida do ácido tio-feno-2-carboxílico) e pirazinamida (4). A reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) tem sido introduzida na rotina de muitos laboratórios como alternativa para o diagnóstico rápido, sensível e específico. Esta técnica permite diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis* por amplificação diferencial de fragmentos dos genes *pncA* e *oxyR*⁽⁸⁾, por análise de restrição enzimática do gene *gyrB* amplificado por PCR⁽⁹⁾, por amplificação múltipla (multiplex-PCR) de regiões do fragmento DR, da seqüência IS6110 e do gene *hsp65*⁽¹⁰⁾, e pela amplificação do fragmento *mtp40*, exclusivo de *M. tuberculosis* (ausente do genoma de *M. bovis*)⁽¹¹⁾.

O fragmento *mtp40*, contido no gene *plcA*, que codifica para a enzima fosfolipase C de *M. tuberculosis*, tem sido amplamente utilizado para diagnóstico específico de *M. tuberculosis* a partir de amostras clínicas não cultivadas⁽¹¹⁾ e de cultivos de cepas de coleção⁽¹²⁾. A ausência do fragmento *mtp40* em *M. bovis* foi confirmada por diferentes autores, mas sua presença em todos os isolados clínicos de *M. tuberculosis* tem sido questionada⁽¹³⁾.

Em nosso laboratório analisamos os resultados de amplificação do fragmento *mtp40*, realizada usando os *primers* PT1 (CAACGCGCCGTCGGTGG) e

PT2 (CCCCCACGGCACCGC) obtidos com 790 isolados de *M. tuberculosis* no laboratório de referência da Holanda (RIVM, Bilthoven, Holanda), e com 105 cepas de *M. africanum* e 10 de *M. canettii* no laboratório de referência do Instituto Pasteur (CNRM, Paris, França). Resultados positivos de amplificação foram obtidos com 94,6%, 54,6% e 70% dos isolados de cada espécie, respectivamente (dados do RIVM, Holanda; 14).

Estudamos detalhadamente um conjunto de 32 cepas, pertencentes a estas duas coleções. Essas cepas foram escolhidas por apresentarem resultados variáveis na PCR-*mtp40*, sendo que em 17 delas foi amplificado fragmento de tamanho esperado (396 pb), em 13 não houve amplificação e, em duas cepas de *M. tuberculosis*, foi amplificado um fragmento de tamanho maior do que o esperado (1700 pb). Foi avaliada a existência de polimorfismos genéticos envolvendo os genes de fosfolipase C, que explicassem a ausência do fragmento *mtp40* nesses isolados. Os resultados mostraram que a ausência de amplificação do fragmento *mtp40* é resultante, na maioria dos casos, da deleção completa do gene *plcA* e também de genes adjacentes. Foi observada também a inserção de cópia do elemento IS6110 no fragmento *mtp40* em dois isolados, impedindo a amplificação do fragmento de tamanho correto (Figura 1)⁽¹⁵⁾.

Não há dados disponíveis sobre a relevância da utilização deste marcador em cepas brasileiras. No entanto, a existência de isolados de *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canettii* apresentando polimorfismos genéticos serve de alerta na escolha de marcadores moleculares destinados à identificação de *M. tuberculosis* e sua diferenciação dos outros membros do complexo. É aconselhável, no momento, a utilização conjunta de diferentes marcadores fenotípicos e/ou genotípicos para o diagnóstico diferencial de *M. tuberculosis* e *M. bovis*.

Cristina Viana-Niero, Sylvia Cardoso Leão.
Departamento de Microbiologia, Imunologia
e Parasitologia, UNIFESP-EPM.
email cviana@ecb.epm.br
AUXÍLIO FINANCEIRO:
FAPESP (proc 00/02525-3)
e CABBIO-CNPq (proc. 480382/01-8)

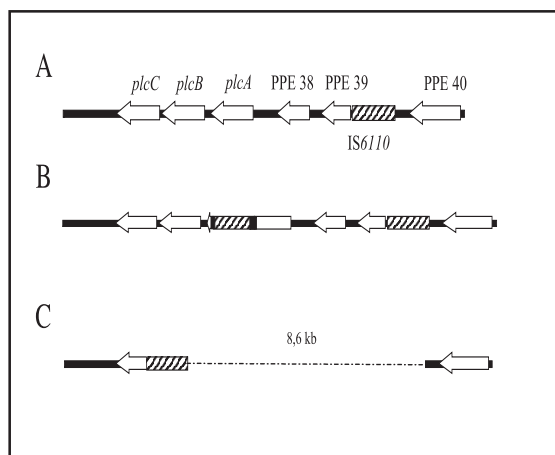


Figura 1. Localização do fragmento *mtp40* no genoma de *M. tuberculosis*: A.: *M. tuberculosis* H37Rv; B.: inserção de uma cópia do elemento IS6110 dentro do fragmento *mtp40*; C.: deleção do fragmento de 8,6 kb incluindo o fragmento *mtp40*. O quadrado preto dentro do gene *plcA* representa o fragmento *mtp40* e o retângulo hachurado representa a seqüência de inserção IS6110. *M. bovis* não possui esta região no genoma.

REFERÊNCIAS

1. van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PEW, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canettii: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47(4):1236-45.
2. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53:1785-9.
3. Cousins D, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. A Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53:1305-14.
4. Euzéby JP. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature – Societé de Bactériologie Systématique et Vétérinaire – France. Disponível em (URL: <http://www.bacterio.cict.fr>). Acesso em 20 out 2003.
5. Barrera L, De Kantor IN. Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Trop Geogr Méd* 1987; 39:222-7.
6. Yates MD, Grange JM. Incidence and nature of human tuberculosis due to bovine tubercle bacilli in South-East England: 1977-1987. *Epidemiol Infect* 1988; 101:225-9.
7. Pan American Health Organization. 1991. Health conditions in the Americas, vol I. Scientific publication nº524. Pan American Health Organization, Washington, DC.

8. Espinosa de los Monteros LE, Galan JC, Gutierrez M, Samper S, Garcia Marin JF, Martin C, Dominguez L, et al. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J Clin Microbiol* 1998; 36:239-42.
9. Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism (*gyrB*-RFLP) analysis. Submetido a Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004.
10. Yeboah-Manu D, Yates MD, Wilson SM. Application of a Simple Multiplex PCR To Aid in Routine Work of the Mycobacterium Reference Laboratory. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11): 4166-8.
11. Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29(10):2163-8.
12. Liébana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1996; 34(4):933-8.
13. Vera-Cabrera L, Hoard ST, Laszlo A, Johnson WM. Analysis of genetic polymorphism in the phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997; 35(5):1190-5.
14. Viana-Niero C, Vincent V. 1999. Étude moléculaire des bacilles de la tuberculose d'origine africaine: *Mycobacterium africanum* et souches "canetti". Tese de mestrado apresentada à Université Paris V et Université Paris XI.
15. Viana-Niero C, de Haas PE, van Soolingen D, Leão S C. Analysis of genetic polymorphisms affecting the four phospholipase C (*plc*) genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates. *Microbiol* 2004; 150:967-78.