
ARTIGO ORIGINAL

Padronização de método molecular para diagnóstico de tuberculose em decorrência de infecção causada pelo *Mycobacterium bovis* BCG

Maria Luiza Bazzo,¹ Luiz Alberto Peregrino Ferreira,¹ Mariana Chagas²

Resumo

A única vacina disponível contra a Tuberculose é a BCG, produzida com o Bacilo de Calmette-Guérin a partir de cepas atenuadas de *Mycobacterium bovis*. Diversos autores têm demonstrado que sua eficiência pode variar entre 0% e 80%. Há várias razões para esse fato: diferenças genótípicas nas cepas estudadas e utilizadas para vacina, utilização de diferentes doses da vacina e desenvolvimento de tuberculose em indivíduos vacinados e naqueles que fizeram uso terapêutico da vacina para tratamento de carcinoma de bexiga. Além disso, grande número de casos de infecção disseminada tem sido relatado em indivíduos imunocomprometidos, infectados ou não pelo HIV. Indivíduos que desenvolvem tuberculose em decorrência da vacinação devem ter diagnóstico diferencial em relação à infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Nosso objetivo foi padronizar um método molecular rápido para diagnosticar a infecção causada por *M. bovis* BCG decorrente da vacinação. A amplificação do DNA extraído pelo método de hidrólise alcalina foi feita por PCR multiplex com iniciadores específicos para região RD1 presente em cepas do complexo *M. tuberculosis* e deletada em cepas de *M. bovis* BCG. A separação dos produtos de PCR foi feita por

eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e visualização em UV após coloração com brometo de etídio. Uma banda de 200pb indicou amplificação da região flanking a RD1, evidenciando presença de *M. bovis* BCG, e uma banda de 150pb indicou amplificação da região RD1, presente no complexo *M. tuberculosis*. A disponibilização de uma técnica rápida para o diagnóstico diferencial entre a infecção decorrente da vacina BCG ou por *M. tuberculosis* é de grande interesse para a conduta clínica, uma vez que a baciloscopia negativa não pode excluir a infecção em presença de sintomatologia, e que a cultura, por suas características, possibilitará um resultado conclusivo após pelo menos 40 dias. Dessa forma, este teste está disponibilizado no LAQUAS - Laboratório Avançado de Qualidade em Saúde.

Descritores: 1. PCR;
2. *M. bovis* BCG;
3. *M. tuberculosis*.

Abstract

The only one available vaccine against tuberculosis is BCG, an attenuated derivative of a virulent strain of *Mycobacterium bovis*. It has been demonstrated that the BCG vaccine efficiency varies between 0% and 80%. This can be explained by reasons such as: use of diverse genotypic strains to study and make the vaccine, uses of different doses, and development of tuberculosis in vaccinated patients, as well as in patients that made therapeutic uses of the vaccine to treat bladder cancer. Moreover, a great number of cases of tuberculosis occur in immunodeficient patients after BCG vaccination. Patients that develop tuberculosis after BCG vaccination

1. Mestre em Ciências, Professora Assistente do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular LAQUAS - ACL - UFSC.

1. Mestre em Ciências, Professor Titular do Departamento de Análise Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina e Coordenador do Laboratório Avançado de Qualidade em Saúde LAQUAS - ACL.

2. Bioquímica do Setor de Imunogenética - HEMOSC - SC.

Instituições:

1. Laboratório de Biologia Molecular LAQUAS - ACL - CCS, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC);

2. Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina - HEMOSC.

need to have differential diagnostic for the infection caused by *Mycobacterium tuberculosis*. The aim of this work was to standardize a rapid molecular method to diagnosis an infection caused by *M. bovis* BCG after vaccination. Amplification of DNA was designed as multiplex-PCR with specific primers for RD1 region present in strains of *M. tuberculosis* complex and deleted in strains of *M. bovis* BCG. PCR products were visualized by ethidium bromide staining after 5% polyacrilamide gel electrophoresis. A 200bp product corresponds to the amplification of a RD1 flanking region, showing the presence of *M. bovis* BCG and a 150bp product indicated the RD1 region amplification, present in *M. tuberculosis* complex. The availability of a rapid test to differentiate the infection after BCG vaccination and the infection by *M. tuberculosis* is important to help in diagnostic, because a negative acid fast stain sample does not exclude the infection in the presence of clinical symptoms and the culture, that is very slow, needs at least 40 days for a final result. The rapid test to differentiate *M. bovis* BCG infection after vaccination and *M. tuberculosis* infection is available in LAQUAS - UFSC.

Keywords: 1. PCR;
2. *M. bovis* BCG;
3. *M. tuberculosis*.

Introdução

A tuberculose ainda é uma das doenças com maior número de óbitos em todo mundo, com aproximadamente 2 milhões de pessoas mortas por ano.¹ Um terço da população mundial está infectada com *Mycobacterium tuberculosis*. Estimativas indicam 8 milhões de novos casos a cada ano.² Mais de 90% de todos os casos de tuberculose ocorrem em países em desenvolvimento, onde os recursos são limitados para pesquisa, diagnóstico e tratamento adequado.¹

A única vacina disponível contra tuberculose derivada do *Mycobacterium bovis*, o Bacilo Calmette-Guérin (BCG), está disponível desde a década de 1920, tendo sido vacinadas pelo menos 3 bilhões de pessoas em todo mundo.² E a cada ano, a vacina é administrada a mais de 100 milhões de pessoas. A vacina BCG não impede a infecção e nem o desenvolvimento da tuberculose pulmonar, mas pode conferir certo grau de proteção para a meningite tuberculosa e para as formas disseminadas da doença.³ Embora a vacina induza uma forte resposta

imune humoral e celular, sua eficácia em prevenir tuberculose é extremamente baixa, particularmente a tuberculose pulmonar em adultos.²

A Portaria nº 452 de 06/12/1976, do Ministério da Saúde, dispõe que a vacinação é obrigatória para crianças menores de um ano e é prioritariamente indicada para as crianças da faixa etária entre 0 e 4 anos.⁴

No Brasil, a vacina BCG tem sido administrada desde 1968. Em 1995, aproximadamente 96% das crianças com idade entre 12 e 23 meses tinham recebido imunização contra BCG. A verificação de efeitos colaterais causados pela vacinação inclui linfadenopatia ou osteomielite, que resultam da disseminação generalizada do BCG.⁴

Além de sua utilização como vacina contra a tuberculose, a BCG também é utilizada por urologistas para o tratamento de carcinoma superficial de bexiga, através de infusão intravesical do Bacilo Calmette-Guérin. Em geral, essa terapia é bem tolerada e possui efeitos colaterais brandos, localizados e auto-limitados. Complicações em longo prazo, embora tenham uma baixa frequência, podem ser muito sérias. A utilização dessa terapia tem sido discutida, já que há relatos de casos de pacientes com carcinoma superficial de bexiga que foram tratados com BCG, desenvolveram infecção disseminada e foram a óbito.⁵

Algumas complicações como abscesso, formação de fístula, bacteremia, meningite e até morte, também já foram relatadas após vacinação com BCG.⁶ Ainda, um grande número de casos de infecção disseminada pelo BCG tem sido relatado, principalmente em pacientes com HIV e imunodeprimidos por outras causas.⁷ Kamphius et al.⁵ relatam o caso de um paciente com infecção sistêmica pelo *Mycobacterium bovis* que provocou hepatite granulomatosa e um aneurisma micótico da aorta abdominal após um ano da terapia intravesical com BCG. Frickmann et al.⁸ descreveram um caso de tuberculose miliar, e Borre et al.⁹ um caso de infecção disseminada induzida pelo Bacilo Calmette-Guérin após terapia com BCG para tratar carcinoma de bexiga.

Kumar et al.¹⁰ relatam o caso de uma criança de três meses de idade que foi a óbito 2 semanas após iniciar tratamento antituberculose para tratar infecção disseminada por BCG.

A vacina BCG é uma forma mutada do agente causador da tuberculose bovina, *Mycobacterium bovis*,³ que se tornou atenuado após uma série de subcultivos em meio ox bile, quando Calmette e Guérin queriam provar

a hipótese de que o bacilo presente no tubérculo de bovinos infectados poderia transmitir tuberculose pulmonar por administração oral como, por exemplo, ingestão de carne ou leite de animais infectados. Entretanto, após o 39º subcultivo, a cepa foi incapaz de matar animais experimentais, e ainda, depois de 200 subcultivos, a cepa não mostrou reversão da virulência, fato que permitiu concluir que a mutação de atenuação é uma deleção.¹²

Recentemente foi demonstrado que esta atenuação se dá pela perda da região genômica RD1.³ O locus RD1 está deletado em todas as cepas de *M. bovis* BCG, mas está presente nas cepas virulentas de *M. bovis* e *M. tuberculosis*.¹¹ A deleção da região RD1 provoca a perda da atividade citolítica do *M. bovis* BCG, o que resulta numa invasão reduzida dos tecidos.¹² Entretanto, outros estudos têm demonstrado que só a deleção da região RD1 não seria responsável pela atenuação do *M. bovis* e que outros genes estariam envolvidos.¹¹

As vantagens e as desvantagens da vacina BCG têm sido debatidas, uma vez que seu uso e os níveis de proteção fornecidos pela vacinação contra a doença pulmonar podem variar de 0% a 80%.² Assim, nosso objetivo foi padronizar um teste para diagnosticar tuberculose causada pelo *Mycobacterium bovis* BCG decorrente do uso da vacina BCG.

Métodos

Nosso estudo foi baseado no artigo publicado por Talbot et al.¹³ que descrevem um método para identificação do *Mycobacterium bovis* BCG.

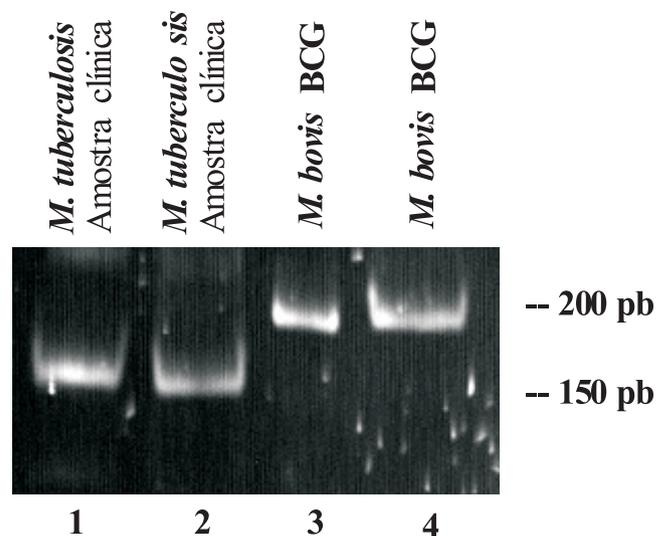
O teste baseou-se na presença e ausência da região RD1. A extração do DNA foi feita pelo método de hidrólise alcalina. E a amplificação do DNA foi realizada por PCR multiplex com iniciadores específicos para região RD1 presente em cepas do complexo *M. tuberculosis* e deletada em cepas de *M. bovis* BCG. A visualização dos produtos de PCR foi feita por fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida a 5%, coloração com brometo de etídio e exposição à luz UV (ultravioleta).

Resultados e Discussão

A presença de uma banda de 200 pares de base (pb) indicou amplificação da região flanqueadora à RD1, evidenciando presença de *M. bovis* BCG, e uma banda de 150 pb indicou amplificação da região RD1, presente no complexo *M. tuberculosis*. A Figura 1 apresenta, nas canaletas 1 e 2, produtos de PCR com 150 pb amplificados a partir de DNA extraído de amostras clínicas, tipi-

ficadas como *M. tuberculosis* e, nas canaletas 3 e 4, produtos de PCR com 200 pb amplificados a partir de DNA extraído da vacina BCG.

Figura 1 - Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídio dos produtos de PCR multiplex. Nas posições 1 e 2 são amostras clínicas subtipadas para *M. tuberculosis* e nas posições 3 e 4 são amostras de *M. bovis* BCG extraídas da vacina.



Mais recentemente, a BCG tem sido utilizada como um veículo recombinante para vacinas multivalentes contra outras doenças. A capacidade de diferenciar BCG de outros membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* é muito importante por duas razões. Primeiro: embora menos virulenta do que as cepas selvagens, a BCG pode causar doenças em humanos. Aproximadamente 5% dos pacientes submetidos a imunoterapia intravesical com BCG para o câncer de bexiga apresentaram reações adversas. E segundo, a capacidade de diferenciar BCG do complexo *M. tuberculosis* (MTB) é muito importante, principalmente em áreas onde a MTB é prevalente e a BCG é utilizada. Assim, pode-se estabelecer a taxa de complicação pelo BCG. E isto é especialmente relevante nos casos de co-infecção pelo HIV.¹³

O Bacilo Calmette-Guérin é geneticamente e fenotipicamente similar às cepas de *M. bovis* e a outras espécies do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. microti*). Tanto *M. bovis* como *M. bovis* BCG possuem uma deleção no fragmento genético MTP40, uma mutação específica no gene *pncA*, que confere resistência à pirazinamida e uma

mutação específica no gene *oxyR*. Algumas dessas características genéticas têm sido estudadas para distinguir *M. bovis* (inclusive BCG) de outras espécies do complexo *M. tuberculosis*.¹³

A disponibilização de uma técnica rápida para o diagnóstico diferencial entre a infecção decorrente da vacina BCG ou de *M. tuberculosis* é de grande importância para a conduta clínica, uma vez que a baciloscopia negativa não pode excluir a infecção em presença de sintomatologia e que a cultura, por suas características, possibilitará um resultado conclusivo após pelo menos 40 dias. Dessa forma, este teste está disponível no LAQUAS - Laboratório Avançado de Qualidade em Saúde - CCS - UFSC.

Conclusões

A PCR multiplex para diferenciação da infecção pelo *M. bovis* BCG proveniente da vacina BCG ou por *M. tuberculosis* se mostrou eficiente tanto nas amostras-padrão como nas amostras clínicas utilizadas. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados em indivíduos com suspeita clínica de infecção após a utilização de BCG em vacinação ou no tratamento de câncer de bexiga para determinar sua relevância em nosso meio.

Referências

1. Kabra SK, Lodha R, Seth V. Some current concepts on childhood tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004;120:387-97.
2. Gagliardi MC, Teloni R, Mariotti S, Iona E, Pardini M, Fattorini L, et al. *Bacillus Calmette-Guérin* shares with virulent *Mycobacterium tuberculosis* the capacity to subvert monocyte differentiation into dendritic cell: implication for its efficacy as a vaccine preventing tuberculosis. *Vaccine.* 2004;22:3848-57.
3. Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine.* 2003;21:4270-74.
4. Barouni AS, Augusto C, Queiroz MVNP, Lopes MTP, Zanini MS, Salas CE. BCG lymphadenopathy detected in a BCG-vaccinated infant. *Brazilian J Medical Biolog Res.* 2004;37:697-700.
5. Kamphuis JT, Buiting AGM, Miseré JFMM, Van Berge Henegouwen DP, Van Soolingen D, Rensma PL. BCG immunotherapy: be cautious of granulomas – Disseminated BCG infection and mycotic aneurysm as late complications of intravesical BCG instillations. *Netherlands J Medic.* 2001;58:71-5.
6. Han TI, Kim IO, Kim WS, Yeon KM. Disseminated BCG infection in a patient with severe combined immunodeficiency. *Korean J. Radiol.* 2000;1:114-7.
7. Fallo A, Matteo E, Preciado MV, Cerqueiro MC, Escoms S, Chabay P, et al. Epstein-Barr virus associated with primary CNS lymphoma and disseminated BCG infection in a child with AIDS. *Intern J Infect Dis.* 2005;9:96-103.
8. Frickman H, Jungblut S, Hanke P, Bargon J. Tuberculosis induced by *Bacillus Calmette-Guérin* immuno-prophylaxis-case study. *Pneumologie.* 2004;58:850-3.
9. Borre S, Brustia D, Rosa F, Brondolo R, Rizzo G, Garavelli PL. *Calmette-Guérin bacillus* disseminated infection after intravesical instillation. *Recenti Prog Med.* 2002;93:247-8.
10. Kumar PV, Monabati A, Kadivar R, Soleimanpour H. Peripheral blood and marrow findings in disseminated bacilli *Calmette-Guérin* infection. *J Pediatric Hematol Oncol.* 2005;27:97-9.
11. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, et al. The primary mechanism of attenuation of *Bacillus Calmette-Guérin* is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *PNAS.* 2003;100:1240-5.
12. Inwald J, Jahans K, Hewinson RG, Gordon SV. Inactivation of the *Mycobacterium bovis* homologue of the polymorphic RD1 gene Rv3879c (Mb3909c) does not affect virulence. *Tuberculosis.* 2003;83:387-93.
13. Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol.* 1997;35:566-9.

Endereço para correspondência:

Maria Luiza Bazzo.

Departamento de Análises Clínicas - CCS - UFSC.
Campus Universitário - Trindade - Florianópolis - SC.
CEP: 88040-900

Fones: (48) 33319113 - ramal 219

e-mail: mlbazzo@ccs.ufsc.br, mlbazzo@yahoo.com.br