Capítulo 20

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-20

DETECÇÃO MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE MAMÍFEROS SILVESTRES E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA

Laís Ferreira Inácio[1]; Vanessa Campos Paizan[2]; Luciana da Silva Ruiz Menezes[3]; Virgínia Bodelão Richini Pereira[4]

[1]Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública- NCBM– IAL- Bauru; E-mail: lais.f.inacio@unesp.br
[2]Mestranda do Programa de Doenças Tropicais, FMB-UNESP-Botucatu; [3]Pesquisador Científico VI e Diretor Técnico I, CLR II Bauru; [4]Pesquisador Científico VI e Diretor Técnico de Saúde II, CLR II Bauru

Resumo: A saúde única engloba a saúde animal, humana e ambiental, tornando-se cada vez mais relevante diante do crescente contato entre humanos e animais e às mudanças ambientais. Nesse contexto, o estudo das zoonoses é crucial e emerge como um desafio global, com ferramentas moleculares e análise espacial contribuindo para a compreensão da epidemiologia das doenças de importância em saúde pública. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de micobactérias, agentes causadores de diversas doenças, em animais silvestres mortos por atropelamento em duas regiões brasileiras: Sul e Sudeste. Foram analisadas 43 amostras de pulmão, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, utilizando *primers* da região da sequência repetitiva IS6110 do gênero *Mycobacterium*. Foi possível a amplificação de sete amostras, sendo três de Botucatu-SP e quatro de Santa Catarina. As amostras positivas foram sequenciadas, confirmando ser do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), em *Cerdocyon thous*; *Leopardus tigrinus*; *Didelphis albiventris*; *Cavia* sp.; *Akodon montensis*; roedor sem identificação e *Oligoryzomys* sp., demonstrando que a tuberculose pode circular em diversas espécies, aumentando o risco de transmissão. Portanto, a identificação de micobactérias em diferentes espécies e regiões ressalta a importância de estudos epidemiológicos para melhor compreensão da doença, além de reforçar a importância de implementar medidas de prevenção e controle da tuberculose zoonótica.

Palavras-chave: Reação em Cadeia da Polimerase, Saúde Única e Zoonoses

INTRODUÇÃO

A saúde humana, animal e ambiental estão interligadas e, as doenças emergentes e zoonóticas evidenciam essa relação. Essas doenças representam uma ameaça à saúde pública, economia e segurança global (NARROD *et al.*, 2012; RUPASINGHE; CHOMEL; MARTÍNEZ-LÓPEZ, 2022;). Segundo a organização mundial da Saúde (OMS), mais de 60% dos patógenos humanos têm origem zoonótica, incluindo bactérias, vírus, fungos, helmintos e protozoários sendo, seu surgimento e distribuição influenciadas por diversos fatores, como mudanças climáticas, urbanização, migração, comércio, turismo, biologia de vetores, além de fatores naturais e antropogênicos (KARESH, 2012).

O aumento do contato entre humanos e outras espécies, somados a mudanças no uso da terra e intensificação da agricultura, facilita a emergência de novas doenças em escala global. Isso ressalta a importância da abordagem de Saúde única para prevenção e controle de zoonoses (RUPASINGHE; CHOMEL; MARTÍNEZ-LÓPEZ, 2022). Dentre as zoonoses, aquelas causadas por micobactérias são especialmente relevantes.

As micobactérias são pertencentes à família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* com mais de 180 espécies com características diversas (GUPTA; LO; SON, 2018). Há três grupos principais: o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis*, além das micobactérias não tuberculosas (MNT) (HAN *et al.,* 2008; JAGIELSKI *et al.,* 2016). MTBC inclui agentes causadores da tuberculose, como *M. tuberculosis*, responsável pela tuberculose humana, além de diversas espécies adaptadas a diferentes hospedeiros como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium caprae*, causadores da tuberculose zoonótica que pode infectar humanos especialmente por meio do consumo de leite contaminado, destacando a interconexão entre saúde humana, animal e ambiental (GHIELMETTI *et al.,* 2021; MATOS *et al.,* 2016; CARNEIRO *et al.,* 2022).

A análise de animais atropelados é uma ferramenta valiosa para compreender a epidemiologia desses microrganismos, além de, contribuir para a conservação da fauna silvestre, uma vez que, é uma abordagem menos invasiva que permite utilizar técnicas moleculares para a detecção de patógenos (RICHINI-PEREIRA *et al.,* 2008; COBA-MALES *et al.,* 2023), oferecendo informações relevantes para saúde pública visto que, fornece dados sobre a diversidade de patógenos presente na fauna silvestre brasileira.

Com base nisso, a vigilância epidemiológica é essencial para prevenir e controlar doenças somadas à epidemiologia espacial, que analisa a distribuição geográfica e os fatores que influenciam a disseminação das doenças (ELLIOTT; WARTENBERG, 2004).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi analisar amostras de animais atropelados em Botucatu - SP e diversos municípios de Santa Catarina, utilizando biologia molecular na identificação de micobactérias do complexo tuberculose (MTCB), sendo extremamente relevante para o controle da tuberculose zoonótica. Além disso, investigar interações ecoepidemiológicas que podem auxiliar na compreensão da transmissão e distribuição das doenças, permitindo a implementação de medidas de controle mais eficazes e informando políticas públicas voltadas à saúde e manejo da fauna nas regiões estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 43 amostras de pulmão de diferentes espécies de animais silvestres coletadas no período de 2009 à 2012 em Botucatu - SP e de diversos municípios catarinenses (Blumenau, Dr. Pedrinho, Gaspar, Indaial, Navegantes, Águas de Chapecó, Chapecó, Itapoá) que estão de acordo com a Instrução normativa n°119, de 11 de outubro de 2006, Capítulo VI, Art. 26 do IBAMA. O projeto foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do Instituto Adolfo Lutz (CTC-IAL 42-P/2023).

As amostras foram maceradas e, em seguida submetidas a extração do material genético utilizando o kit Illustra tissue & cells genomic Prep Mini Spin (Cytiva, USA), conforme instruções do fabricante. Após, foram quantificadas em espectrofotômetro (Epoch-Biotek, USA) a fim de verificar a qualidade das amostras.A análise do DNA foi realizada pela Reação em cadeia da polimerase (PCR) e, para avaliar a qualidade endógena, foi amplificada uma região conservada do gene β-globulina (DNA nuclear) de vertebrados que resulta em um produto de 140 pares de bases (pb) com o uso dos *primers*: β-1 (5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTCAC-3') e β-2 (5'-

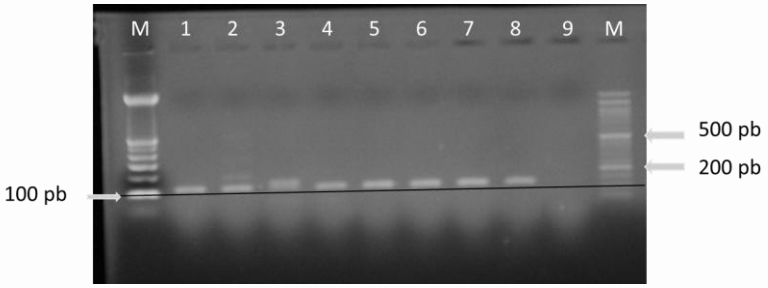
CTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC-3'), ou com o uso do gene gliceraldeído 3-fosfato, com os *primers* GAPDH-4F (5'-AGGCTGAGAACGGGAAACTT-3') e GAPDH-4R (5'-ATTAAGTTGGGGCAGGGACT-3'), que amplificam um produto de 911pb. Já para detecção de micobactérias foram utilizados *primers* da sequência repetitiva IS6110, IS6110 - F (5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3') e IS6110-R (5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'), resultando em um produto de 123 pb.

As amostras amplificadas foram purificadas com 4 µl da enzima ExoSap (GE) - USB ExoSap-IT ® (USB Affymetrix, USA) e 10µl do produto da PCR, conforme instruções do fabricante. Após esse procedimento as amostras foram sequenciadas pelo método Sanger no Instituto de Biotecnologia (IBTEC-UNESP - Botucatu), como serviço de terceiros. As sequências obtidas foram visualizadas no *software* Chromas 2.6.6, alinhadas no programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR *et al.*, 2018) e, comparadas com as sequências presentes no banco de dados NCBI via Blastn. Para os estudos ecoepidemiológicos, as informações de georreferenciamento foram coletadas via localização GPS (Sistema de Posicionamento Global).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo analisou 43 amostras de pulmão de animais silvestres mortos por atropelamentos no período de 2009 a 2012, sendo 20 da região de Botucatu - SP e 23 da região de Santa Catarina (Blumenau, Dr. Pedrinho, Gaspar, Indaial, Navegantes, Águas de Chapecó, Chapecó, Itapoá). Foi realizada a quantificação do material genético e a análise de genes constitutivos de mamíferos para validar a técnica e assegurar a confiabilidade dos resultados, passando pela análise molecular para detecção do gênero *Mycobacterium*, obtendo-se, sete animais foram positivos, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1- Gel de agarose a 1,5% utilizando os *primers Mycobacterium* IS6110 F e R de 123 pb.



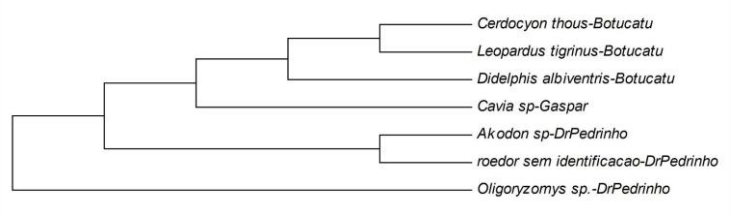
Legenda: M - DNA Ladder 100pb; 1 - *C. thous;* 2 - *L. tigrinus;* 3 - *D. albiventris*; 4 - *Cavia* sp.*;* 5 - *A. montensis;* 6 - roedor sem identificação;; 7 - *Oligoryzomys* sp.*;* 8 - DNA positivo utilizando cepa de MTBC; 9 - controle negativo; M- DNA Ladder 50pb. **Fonte:** Elaborada pela autora (2024)

A detecção de *Mycobacterium* em diferentes regiões do Brasil, como Sul e Sudeste destaca a influência de fatores ecoepidemiológicos na dispersão dessas bactérias (VERA *et al.*, 2020; CONCEIÇÃO *et al.*, 2021). Embora a tuberculose humana causada por *Mycobacterium tuberculosis* seja priorizada, a tuberculose zoonótica torna-se uma preocupação importante e reemergente em saúde pública (COUTO *et al.*, 2022). O presente trabalho confirmou, por meio do sequenciamento, a presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em diversas espécies (Figura 2), sendo a porcentagem de identificação observada na tabela 1, sugerindo que estratégias de controle e vigilância devem incluir a fauna silvestre na prevenção e manejo da doença.

Portanto, das 43 amostras analisadas 16,28% (7 amostras) foram positivas para micobactérias, destas, três eram da região de Botucatu-SP e, quatro do Médio Vale do Itajaí e

Oeste de Santa Catarina. O DNA de *Mycobacterium* spp. foi detectado em 20% (1/5) das amostras de *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) de Botucatu - SP. Em um estudo anterior, não foi encontrado *M. leprae* em animais atropelados nesta espécie (PEDRINI *et al.,* 2010). Porém, outros estudos identificaram *M. bovis* em canídeos silvestres atropelados (MATOS *et al.*,2016). O DNA também foi encontrado no único exemplar de *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato) e em 14,28% (1/7) das amostras de *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca), corroborando com achados de Abdala e colaboradores (2015). Além desses animais, o DNA de *Mycobacterium* foi identificado em roedores como *Cavia* sp. (preá), *Akodon montesis* (rato-do-mato), *Oligoryzomys* sp. (rato) e roedor sem identificação, embora esses roedores sejam considerados reservatórios de patógenos zoonóticos, há poucos trabalhos da presença de micobactérias naturalmente nessas espécies (ABDALA *et al.*, 2015; VALOIS *et al.*, 2024)

Figura 2: Árvore genética com a análise evolutiva inferida usando o método Neighbor-Joining, de amostras sequenciadas para *Mycobacterium* sp. em animais silvestres mortos por atropelamento.



Fonte: Elaborado pela autora, utilizando o MEGA X (2024)

Tabela 1 - Porcentagem de identidade de *Mycobacterium* nas amostras sequenciadas

Espécie	Município	% identidade	Acesso GenBank
Cerdocyon thous	Botucatu-SP	98,37%	CP069065.1*/CP096840.1+
Leopardus tigrinus	Botucatu-SP	100,00%	CP069065.1*/CP096840.1+
Didelphis albiventris	Botucatu-SP	95,89%	CP041872.1*/CP096848.1+
Cavia sp.	Gaspar-SC	98,68%	CP018302.1*/CP008744.1+
Akodon serrensis	Dr.Pedrinho-SC	99,20%	CP018302.1*/CP008744.1+
Roedor sem identificação	Dr. Pedrinho-SC	94,51%	CP130809.1*
Oligoryzomys sp.	Águas do Chapecó-SC	97,60%	CP018302.1*/CP008744.1+

Legenda: **M. tuberculosis; M. bovis* + **Fonte:** Elaborada pela autora (2024)

Diversos trabalhos identificaram *Mycobacterium* em animais silvestres pelo mundo (AKHTAR *et al.,* 2023), sendo a presença de *M. tuberculosis* em animais silvestres em cativeiro comum, devido ao contato frequente com humanos, levando a preocupações sobre zoonose reversa (LOPES *et al.*, 2021; ZACHARIAH *et al.*, 2017). Logo, a detecção de MTBC ressalta a interconexão entre humanos, animais silvestres e o meio ambiente enfatizando a necessidade de uma abordagem de saúde única (COUTO *et al.*, 2022). Além disso, o presente estudo contribui para a vigilância epidemiológica da tuberculose e destaca o potencial de usar animais silvestres atropelados para monitorar a circulação de patógenos, fornecendo uma alternativa para investigar a distribuição de doenças infecciosas.

CONCLUSÕES

O presente estudo identificou a presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) em amostras de animais silvestres atropelados em Santa Catarina e São Paulo, indicando a presença de patógenos na fauna brasileira. Além disso, ressalta a importância da utilização de ferramentas moleculares e de georreferenciamento nos estudos epidemiológicos, contribuindo significativamente para a saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Keila Zaniboni Siqueira Batista e Sérgio Luiz Althoff, da FURB Blumenau, pelo fornecimento do material biológico de Santa Catarina para a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABDALA, A. A. et al. [Mycobacterium bovis in wildlife of the dairy regions of Santa Fe (Argentina)]. **Revista Argentina De Microbiologia**, v. 47, n. 3, p. 174–182, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.04.005 .Access in: 29 ago. 2024

AKHTAR, K. et al. Molecular identification and infection pathology of Mycobacterium spp. in captive wild animals in Pakistan. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 17, n. 8, p. 1107–1113, 31 ago. 2023.Disponível em: https://doi.org/10.3855/jidc.17287 .Access in: 29 ago. 2024

ALVES-PALMEIRA, A. R. DE O. Análise espacial e detecção molecular de Leishmania spp. e Trypanosoma spp. em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil.Disponível em: http://hdl.handle.net/11449/153292 .Access in: 29 ago. 2024

CARNEIRO, P. A. M. et al. Milk Contamination by Mycobacterium tuberculosis Complex, Implications for Public Health in Amazonas, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 85, n. 11, p. 1667–1673, 1 nov. 2022.Disponível em: https://doi.org/10.4315/JFP-21-303 Access in: 29 ago. 2024

COBA-MALES, M. A. et al. From roads to biobanks: Roadkill animals as a valuable source of genetic data. **PLOS ONE**, v. 18, n. 12, p. e0290836, 7 dez. 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290836 . Access in: 10 set. 2024

CONCEIÇÃO, E. C., et al., Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Brazil before the whole genome sequencing era: a literature review. **Memórias do Instituto Oswaldi Cruz**, v. 116, e200517, Mar. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1590/0074-02760200517. Access in: 28 ago. 2024

COUTO, R. M, et al., One Health and surveillance of zoonotic tuberculosis in selected low-income, middle-income and high-income countries: A systematic reviem. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 6, e0010428. 6 jun. 2022 Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010428. Access in: 15 set. 2024

ELLIOTT, P., WARTENBERG, D. Spatial epidemiology: current approaches and future challenges. **Environmental Health Perspectives**. 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1289/ehp.6735 . Access in: 28 ago. 2024

GHIELMETTI, G. et al. Mycobacterium microti Infections in Free-Ranging Red Deer (Cervus elaphus). **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 8, p. 2025–2032, ago. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3201/eid2708.210634 .Access in: 20 ago. 2024

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus Mycobacterium into an Emended Genus Mycobacterium and Four Novel Genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 13 fev. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067. Access in: 20 ago. 2024

HAN, X. Y. et al. A New Mycobacterium Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–864, 1 dez. 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1309/AJCPP72FJZZRRVMM. Access in: 20 ago. 2024

JAGIELSKI, T. et al. Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 239–290, abr. 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1128/CMR.00055-15. Access in: 25 ago. 2024

KARESH, William B. et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1936-1945, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61678-x . Access in: 25 ago. 2024

KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol**. 2018 Jun 1;35(6):1547-1549. Disponível em: https://doi.org/10.1093/molbev/msy096. Access in: 23 ago. 2024

LOPES, B. C. et al. Molecular identification of Mycobacterium spp. isolated from Brazilian wild boars. Molecular Biology Reports, v. 48, n. 1, p. 1025–1031, 1 jan. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11033-020-06118-7.Access in: 23 ago. 2024

LOSNAK, D. O. et al. Molecular detection of fungi of public health importance in wild animals from Southern Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 455–463, jul. 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1111/myc.12767. Access in: 23 ago. 2024

MATOS, A.C., et. al, New insights into Mycobacterium bovis prevalence in wild mammals in Portugal. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.63, p. 5, e313-e322. 7 dec. 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1111/tbed.12306 .Access in: 23 ago. 2024

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose.** Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiMGI0YTk1MTMtNWM5ZS00MGI0LWI2NjgtZGI3OWMxNmVlOTgxIiwidCI6IjlhNTU0YWQzLWI1MmItNDg2Mi1hMzZmLTg0ZDg5MWU1YzcwNSJ9> Access in: 23 out. 2024

NARROD, C.; ZINSSTAG, J.; TIONGCO, M. A one health framework for estimating the economic costs of zoonotic diseases on society. **EcoHealth**, v. 9, p. 150-162, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10393-012-0747-9. Access in: 23 ago. 2024

PEDRINI, S. C. B. et al. Search for Mycobacterium leprae in wild mammals. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 47–53, 2010.Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1413-86702010000100010. Access in: 10 out. 2024

RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. Molecular detection of Paracoccidioides brasiliensis in road-killed wild animals. **Medical Mycology,** v. 46, n. 1, p. 35–40, 1 fev. 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1080/13693780701553002.Access in: 10 out. 2024

RUPASINGHE, R.; CHOMEL, B. B.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, B. Climate change and zoonoses: A review of the current status, knowledge gaps, and future trends. **Acta Tropica**, v. 226, p. 106225, 1 fev. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106225. Access in: 8 out. 2024

VALOIS, E.M.S, et. al., Molecular and spatial evaluation of small rodents and Didelphimorphis infected with Mycobacterium leprae in the southern Amazon, Brazil. **Zoonoses and public health**, v. 71, p. 736-743. Sep. 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1111/zph.13160 Access in: 20 out. 2024

VERA, M., et al., Genomic epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Santa catarina, Southern Brazil. **Scientific reports.** v. 10, 128971, 30 jul. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-020-69755-9. Access in 15 out. 2024

ZACHARIAH, A. et al. Mycobacterium tuberculosis in Wild Asian Elephants, Southern India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 504–506, mar. 2017. Disponível em: https://doi.org/10.3201/eid2303.161741.Access in: 15 out. 2024

Zoonoses. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>. Acesso em: 8 ago. 2024.