

PATRÍCIA MARTINS PARREIRAS

T636.089 69

P259 A

2003



**TIPIFICAÇÃO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* UTILIZANDO *SPOLIGOTYPING*  
E MIRU-VNTR E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À QUIMIOTERÁPICOS  
DE ESTIRPES ISOLADAS EM MINAS GERAIS E DE OUTRAS  
REGIÕES BRASILEIRAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato.

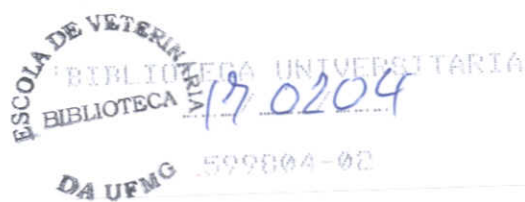
Belo Horizonte - MG  
UFMG – Escola de Veterinária  
2003

P259t Parreiras, Patrícia Martins, 1972-  
Tipificação de *Mycobacterium bovis* utilizando spoligotyping e MIRU-  
VNTR e avaliação da sensibilidade à quimioterápicos de estirpes isoladas  
em Minas Gerais e de outras regiões brasileiras / Patrícia Martins Parreiras.  
- 2003.  
39 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de  
Veterinária  
Bibliografia: p.

1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Micobactérias - Teses. 3. Tuberculose  
em bovinos - Teses. 4. Epidemiologia - Teses. I. Lobato, Francisco Carlos  
Faria, 1954- II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de  
Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 969 95



357315

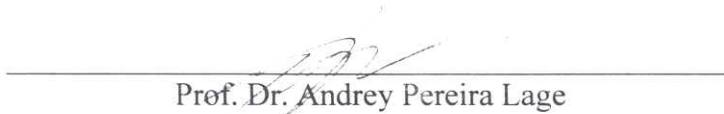
Tese defendida e aprovada em 17 de dezembro de 2003, pela Comissão Examinadora constituída por:



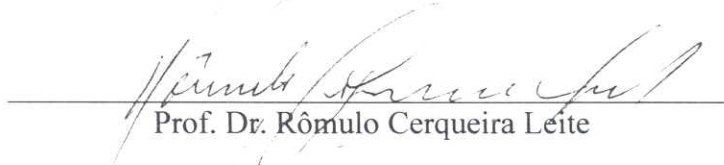
Prof. Dr. Francisco Carlos Faria Lobato



Dr. Philip Noel Suffys



Prof. Dr. Andrey Pereira Lage



Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite



Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

Sinto *Jesus* em cada frase...  
porque eu só fui um instrumento...

---

### AGRADECIMENTOS

À *Jesus Cristo* que está vivo e detém o mérito deste trabalho.

Agradeço à meus pais e minhas irmãs simplesmente por tudo. Ao meu marido pelo amor, carinho e incentivo.

Ao querido Prof. Francisco Lobato pela a orientação, amizade, confiança, incentivo e por ter aceitado ser instrumento da minha formação profissional.

Ao Dr. Philip Suffys pela recepção generosa e total acolhimento no Rio de Janeiro.

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite pela disponibilidade em ajudar, sempre.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage, pela amizade que cresce.

À Prof<sup>a</sup> Zélia Inês Portela Lobato, pelo atendimento sempre simpático.

Ao Dr. Luiz Heneine, por ainda ser companheiro.

À Dra. Manuela da Silva, pelo incentivo na finalização deste trabalho.

À toda equipe do colegiado de Pós-Graduação pela simpatia e pronto atendimento.

Aos amigos do LARA/PL especialmente Pedro Mota, Andrea Padilha e Patrícia Souza pelo apoio incondicional e veterinários dos SIF'S meu agradecimento.

A todos que compõem a equipe de trabalho do Laboratório de Doenças Bacterianas – EV-UFMG, Laboratório de Hanseníase - FIOCRUZ, Laboratório de Tuberculose – FUNASA por estarem sempre disponíveis.

Aos colegas Patrícia Cota, Guilherme Codo, Telma de Figueirêdo, Luciana Aramuni, Flávio Rocha, Lúcia Werneck, por todo incentivo, e de maneira especial, à Gisele Guimarães.

À Paróquia de Santo Afonso e à Comunidade Canção Nova, no Rio de Janeiro, onde sempre encontrei aconchego e incentivo nos momentos de saudade e dificuldades.

---

*...o homem só se  
completa quando chega à Deus..."*

Exedito Parreiras



## SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO .....	09
ABSTRACT .....	09
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. LITERATURA CONSULTADA .....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Local de Realização do Trabalho.....	17
3.2. Amostras .....	17
3.3. Coleta de Material .....	18
3.3.1. Amostras Trabalhadas.....	19
3.4. Descontaminação e Isolamento de <i>M. bovis</i> .....	19
3.5. Provas Bioquímicas.....	19
3.6. Determinação da sensibilidade a quimioterápicos.....	19
3.7. Tipificação por Métodos Moleculares.....	20
3.7.1. Extração do DNA e Detecção de DNA .....	20
3.7.2. <i>Spoligotyping</i> .....	20
3.7.3. MIRU-VNTR.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Identificação dos Isolados.....	22
4.2. Determinação da Sensibilidade à Quimioterápicos.....	25
4.3. Tipificação Molecular.....	26
5. CONCLUSÕES .....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Lesões tipo tuberculosas, encaminhadas ao LARA-MG, por estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) identificados por A à N, com número de lesões por SIF, municípios e regiões de origem e total de espécimes enviadas por veterinário de campo.....	19
Tabela 2.	Sequência de iniciadores utilizados para a amplificação dos 12 MIRU-VNTRs <i>loci</i> de <i>M. bovis</i> .....	21
Tabela 3.	Lesões tipo tuberculosas com isolamento de <i>M. bovis</i> , provenientes de diferentes regiões brasileiras e encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002, com as respectivas regiões de origem dos bovinos.....	23
Tabela 4.	Lesões tipo tuberculosas com isolamento de <i>M. bovis</i> , provenientes do Estado de Minas Gerais e encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002, com as respectivas regiões de origem dos bovinos no Estado.....	24

Tabela 5.	Distribuição dos perfis estabelecidos pelo <i>spoligotyping</i> das 65 estirpes de <i>M. bovis</i> , obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002, com o número de isolados em cada perfil com suas respectivas regiões de origem.....	28
Tabela 6.	Perfis das estirpes de <i>M. bovis</i> circulantes nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais determinados pelo <i>spoligotyping</i> , obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.....	29
Tabela 7.	Perfis das estirpes de <i>M. bovis</i> circulantes nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais determinados pelo <i>spoligotyping</i> , obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.....	30
Tabela 8.	Perfis dos grupos (GM) estabelecidos pelo MIRU-VNTR de estirpes de <i>M. bovis</i> do Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.....	31
Tabela 9.	Distribuição dos perfis estabelecidos pelo MIRU-VNTR nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras com o número de isolados em cada perfil, obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.....	31
Tabela 10.	Perfis das estirpes de <i>M. bovis</i> circulantes nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais determinados pelo MIRU-VNTR, obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.....	31
Tabela 11.	Diversidade alélica em cada <i>locus</i> do MIRU-VNTR, avaliados em 65 estirpes de <i>M. bovis</i> do Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras obtidas de lesões tipo tuberculosas, encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.....	32
Tabela 12.	Estirpes de <i>M. bovis</i> isoladas no Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001 e 2002, com seus respectivos grupos de perfis estabelecidos pelas técnicas do <i>spoligotyping</i> e MIRU-VNTR e número de isolados em cada perfil.....	32
Tabela 13	Estirpes de <i>M. bovis</i> isoladas no Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras isoladas a partir de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002, com seus respectivos grupos de perfis estabelecidos pelas técnicas do <i>spoligotyping</i> e MIRU-VNTR e número de isolados em cada perfil.....	33

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1.	Identificação em destaque dos estados do Brasil que encaminharam lesões tipo tuberculosas ao LARA-MG no período de 2001-2002 para fins de isolamento de <i>M. bovis</i> .....	17
Figura 2.	Identificação, em destaque, das regiões no Estado de Minas Gerais que encaminharam lesões tipo tuberculosas ao LARA-MG no período de 2001-2002 para fins de isolamento de <i>M. bovis</i> .....	18
Figura 3.	Total de amostras com lesão tipo tuberculosa encaminhadas ao LARA-MG, no período de 2001-2002, com número de micobactérias isoladas e número de lesões sem isolamento.....	23
Figura 4.	Correlação por dendograma de polimorfismos de DNA, obtidos pela técnica de <i>spoligotyping</i> , em 65 estirpes de <i>M. bovis</i> isoladas a partir de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG, no período de 2001-2002, por municípios de Minas Gerais e outras regiões brasileiras. Na figura, os perfis agrupados estão numerados de 1 a 9 e à direita estão os números de identificação das amostras.....	27



## RESUMO

Foram isoladas 65 estirpes de *Mycobacterium bovis*, de lesões macroscópicas tipo tuberculosas provenientes de bovinos abatidos em frigoríficos sob SIF de diferentes municípios do Estado de Minas Gerais e de materiais encaminhados por outras regiões brasileiras e analisadas pelas técnicas moleculares *spoligotyping* e MIRU-VNTR 12 *loci*. Perfis iguais foram obtidos de isolados de diferentes Estados, o que pode ser justificado pelo trânsito de bovinos no país. Constatou-se que o *spoligotyping* associado às informações epidemiológicas completas é importante para a compreensão da dinâmica da tuberculose e auxiliará o programa de controle da doença no Brasil. O *Spoligotyping* e o MIRU-VNTR resultaram, respectivamente, em 36 e 19 perfis diferentes para os isolados de *M. bovis*, demonstrando que os 12 *loci* do MIRU-VNTR não apresentaram bom poder discriminatório. Foi também avaliada a resistência dessas estirpes a quimioterápicos. Nenhuma estirpe isolada apresentou resistência aos principais quimioterápicos utilizados no tratamento da tuberculose humana, dentre eles a isoniazida, empregada no tratamento da tuberculose bovina. Portanto, os resultados dão suporte para a escolha da medicação em casos de pacientes humanos infectados com *M. bovis*, e acrescenta informação à área da medicina veterinária quanto à situação da sensibilidade à isoniazida.

Palavras chave: *Mycobacterium bovis*, *spoligotyping*, MIRU-VNTR

## ABSTRACT

Sixty five strains of *Mycobacterium bovis* were isolated from macroscopic lesions typical of tuberculosis from cattle slaughtered in slaughter house under SIF from different regions of Minas Gerais and other regions of Brazil and analyzed by the molecular techniques *spoligotyping* e MIRU-VNTR 12 *loci*. Same profiles were found in isolates from different regions of Brazil, what can be justified by the transit of the cattle in the country. *Spoligotyping* associated to complete epidemiologic information demonstrated to be important for the comprehension of the tuberculosis course and will collaborate with the control campaign of tuberculosis in Brazil. *Spoligotyping* and MIRU-VNTR analyses gave, respectively, 36 and 19 different profiles for *M. bovis* isolates, indicating that the 12 MIRU-VNTR *loci* were not good discriminators. The strain resistance to chemiotherapeutic agents was also studied. None of the isolated strains presented resistance to the main chemiotherapeutic agents applied for human tuberculosis treatment, among them the isoniazid, used for cattle tuberculosis treatment. Therefore, the results support the medication choice in the case of human patients infected by *M. bovis*, and add information to the veterinary field regarding the situation of isoniazid sensitivity.

Key words: *Mycobacterium bovis*, *spoligotyping*, MIRU-VNTR

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma das mais graves e antigas doenças conhecidas. Achados de lesões em ossos de homens pré-históricos na Alemanha sugerem a existência da tuberculose desde 8000 a.C. e acredita-se que os primeiros casos tenham sido por *Mycobacterium bovis*

A identificação do bacilo da tuberculose por Robert Koch em 1882 deu início ao desenvolvimento de inúmeras medidas de combate à doença com a utilização de drogas antimicrobianas e de campanhas de controle fazendo com que nas décadas de 60 e 70 do século passado esta enfermidade no homem fosse considerada como totalmente controlada, na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Entretanto, esse quadro reverteu-se, à medida que conjunturas mundiais sócio-econômicas levaram ao declínio de investimentos em programas de controle da doença, migrações descontroladas para os grandes centros urbanos, formando uma periferia em precárias condições sanitárias, além do aumento da pobreza no mundo, da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida-AIDS e do surgimento de resistência a drogas antimicrobianas.

Dentre as micobactérias tuberculosas, destaca-se *M. bovis* como zoonose de reconhecida importância, causando tuberculose em bovídeos e suínos domésticos e selvagens, homem, outros primatas e carnívoros, incluindo cães e gatos. No homem a doença é indiferenciável da causada pelo *M. tuberculosis* e é tratada da mesma forma. Sua prevalência nos bovinos é maior nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento e menor nos países desenvolvidos, onde se encontra em fase avançada de controle e/ou erradicação, porém, muitos aspectos epidemiológicos mantêm-se desconhecidos.

No Brasil não havia um programa de controle ou erradicação da tuberculose bovina. Esta atividade estava inserida em

um programa genérico, denominado Programa de Controle das Doenças Animais, desenvolvido pelo Ministério da Agricultura e Secretarias Estaduais de Agricultura. A legislação previa o sacrifício de animais positivos à tuberculinização com a indenização dos pecuaristas em um quarto do valor do animal sacrificado (Brasil, 1934, 1943). Entretanto, essas medidas foram economicamente inviáveis.

Dados de notificações oficiais de tuberculose bovina indicaram uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998. Um levantamento utilizando a tuberculinização realizado em 1999, no Triângulo Mineiro e nas regiões do Centro e Sul de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1600 propriedades e 23000 animais, estimou a prevalência de animais infectados em 0,8% (Belchior, 2001). No mesmo estudo foram detectados 5% de propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que este valor subiu para 15%, no universo de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção. O controle da doença apresentava-se difícil, cujas normas e procedimentos só agora passam a estar regulamentados no país, através do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2001).

A detecção de lesões sugestivas de tuberculose, durante a inspeção sanitária *post-mortem* de animais provenientes de estabelecimento de criação monitorado para esta doença, implica no envio de amostras de lesões suspeitas a laboratório oficial. Segundo o PNCEBT para o diagnóstico da tuberculose, todos os animais com idade igual ou superior a seis semanas devem ser submetidos a teste de diagnóstico indireto da tuberculose, a ser realizado pelo médico veterinário credenciado. Para os animais considerados reagentes, estes deverão ser isolados de todo o rebanho e sacrificados



no prazo máximo de trinta dias após o diagnóstico.

O princípio básico para o controle da tuberculose, como em qualquer processo de controle de epidemias, é interromper a cadeia de transmissão, atuando objetivamente nos "elos" que formam essa corrente, ou seja, detectando precocemente os casos, tratando-os adequadamente e, oportunamente, investigando seus contatos, a fim de prevenir a disseminação da doença. Métodos moleculares são ferramentas utilizadas para alcançar esses objetivos.

Os métodos moleculares *spoligotyping* e o MIRU-VNTR ("mycobacterial interspersed repetitive units – variable number of tandem repeats"), este último, relativamente novo, surgiram como métodos rápidos e podem oferecer um amplo campo de estudo e uma melhor compreensão da biologia molecular, epidemiologia molecular e reconstrução filogenética do *M. bovis* (Kwara et al., 2003). Na medicina humana, a construção de bancos de dados com perfis de *spoligotyping* provenientes de diferentes regiões do mundo, principalmente nos Estados Unidos da América e Europa, permitiu a possibilidade de se estabelecer especificidades geográficas para alguns padrões de *spoligotyping*, e estes, por sua vez podem ser utilizados na elaboração de potenciais relações filogenéticas entre as estirpes de *M. tuberculosis* (Sola et al., 2001). Tipagem de estirpes utilizando-se seqüências repetitivas, tipo VNTR, presentes em espécies do complexo *M. tuberculosis*, pode diferenciar estirpes com o potencial de também ser utilizada para estudos filogenéticos

A epidemiologia molecular da tuberculose humana no Brasil tem contribuído para melhorar a compreensão dos fatores de risco associados a transmissão da doença assim como tem possibilitado a monitorização do impacto dos programas de controle da tuberculose em hospitais e na comunidade. Da mesma forma, na Medicina Veterinária, este trabalho será auxiliar ao PNCEBT e contribuirá com o LARA-MG, referência em tuberculose animal no país,

no que se refere ao estabelecimento da epidemiologia dos perfis moleculares de *M. bovis* no Brasil.

A determinação da resistência bacilar aos quimioterápicos tem significado um grande avanço no conhecimento da biologia do *Mycobacterium* e no controle da terapia antituberculosa no homem.

Embora a legislação sanitária animal brasileira não esteja prevendo a utilização do tratamento no controle da tuberculose bovina (Brasil, 1934) esta foi empregada como uma alternativa aos programas clássicos de controle que se baseava no sacrifício dos animais. Houve uma difusão indiscriminada na utilização do tratamento com isoniazida no controle da tuberculose bovina em nosso meio, podendo ter surgido estirpes resistentes às drogas.

Há relatos de casos de infecção no homem por *M. bovis*, principalmente em populações de risco, grupos ocupacionais como tratadores de animais e agentes de inspeção, os primeiros observados na Argentina na cidade de Santa Fé, principal bacia leiteira da região (Fisanotti et al., 1998). Segundo a Organização Mundial da Saúde (1993) suspeita-se que *M. bovis* seja responsável por 4000 dos 80000 casos de tuberculose humana, por ano, no Brasil. Assim torna-se importante estudar a realidade da susceptibilidade do *M. bovis* às principais drogas empregadas no tratamento da tuberculose humana.

Este trabalho teve como objetivo determinar a distribuição espacial da tuberculose causada por *M. bovis* pelo isolamento e tipificação molecular; avaliar a sensibilidade do *M. bovis* às principais drogas para tratamento da tuberculose humana; estabelecer uma relação filogenética e biogeográfica das estirpes de *M. bovis* isoladas em Minas Gerais e outras regiões brasileiras por técnicas moleculares; avaliar a viabilidade do MIRU-VNTR e *spoligotyping* para tipificar estirpes de *M. bovis* e comparar lesão de frigorífico com resultado obtido de cultivo.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

As micobactérias são bacilos álcool ácidos resistente (BAAR), aeróbios, imóveis e pleomórficos, medindo de 0,2 a 0,6 por 1,0 a 10µm. As colônias podem ser pigmentadas, com coloração variando do rosa ao laranja, ou não pigmentadas. A temperatura de crescimento varia de acordo com a espécie, como no caso do *M. marinum*, 25 a 32°C ou *M. avium*, 32 a 43°C (Wayne e Kubica, 1986).

A propriedade de álcool ácido resistência é devido à constituição da parede celular, que contém ácido micólico de cadeia longa, com 60 a 90 átomos de carbono, sendo esta característica importante para o reconhecimento das micobactérias (Wayne e Kubica, 1986; Grange, 1996) e a provável responsável pela relativa resistência a agentes desinfetantes e descontaminantes (Meirelles Neto, 1982).

O gênero *Mycobacterium* constitui-se de mais de 100 espécies conhecidas. Segundo Roberts et al. (1991), cerca de 25 destas estão associadas à doenças no homem, podendo ser classificadas em espécies patogênicas obrigatórias, facultativas e potencialmente patogênicas (Baron et al., 1994). Em animais domésticos e silvestres existem mais de 20 espécies patogênicas, dentre elas, *M. bovis*, *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. fortuitum* (Hines et al., 1995).

*M. bovis* possui crescimento lento, variando entre três a oito semanas, a 37°C. Em primeiro isolamento não cresce muito bem, em meio contendo glicerol, utilizando com melhor eficiência o piruvato como fonte de carbono. Bastonetes curtos a moderadamente longos podem ser vistos por meio de coloração *Ziehl Neelsen*. No cultivo forma colônias brancas, pequenas, com bordas irregulares e superfície granular (Bacteriologia, 1988).

Algumas micobactérias, como o complexo *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* e *M. fortuitum*, podem dar origem a lesões semelhantes ao complexo *M. tuberculosis*.

Essas micobactérias receberam a denominação conjunta de "atípicas". Atualmente, reconhecendo-se que essas micobactérias não são atípicas, mas sim pertencentes a um grupo reconhecido de espécies, o termo micobactérias não tuberculosas ou micobactérias outras que a tuberculose (MOTT) é considerado adequado (Roberts et al., 1991; Nolte e Metchock, 1995).

*M. avium* e *M. intracellulare* são encontrados na água, solo e outras fontes ambientais. Eram considerados de baixa patogenicidade e, até pouco tempo, colonizadores que raramente causavam doença. Entretanto, nestas últimas duas décadas, um grande número de casos foram registrados e somente *M. tuberculosis* tem ocorrido com maior frequência que *M. avium* no homem (Falkinham, 1996).

A importância das micobactérias não tuberculosas em veterinária se deve principalmente às perdas econômicas por condenação de carcaças de suínos nos matadouros (Balian, 1995), sensibilização de bovídeos à prova tuberculínica e ao risco de transmissão para o homem (Acha e Szyfres, 1986).

Para isolamento do *M. bovis*, Córner e Nicolacopoulos (1988) e Grange (1996) analisaram os melhores meios de cultura para isolamento primário e sugeriram a utilização dos meios de cultura Löwenstein-Jensen (LJ) com piruvato de sódio, Stonebrink e Middlebrook 7H11 modificado. Pela incorporação de drogas a estes meios de cultura pode-se diferenciar micobactérias quanto a estirpes, espécies, características metabólicas e mesmo resistência à antibioticoterapia. A cultura bacteriológica ainda é considerada como padrão-ouro e teste definitivo para a confirmação do diagnóstico de tuberculose. Para provas de sensibilidade a antibióticos recomenda-se utilizar o meio de cultivo Stonebrink com glutamato, sem piruvato, pois este último interfere na atividade dos quimioterápicos (Bacteriologia, 1988).

A baciloscopia direta é o método mais rápido e barato para diagnóstico de



micobacteriose no homem permitindo identificar a característica álcool ácido resistente da micobactéria pela coloração de *Ziehl-Neelsen*, mas não permite identificação de espécies ou mesmo gênero. Apresenta vários inconvenientes para utilização em animais, principalmente pela dificuldade em obter amostras de expectoração confiáveis, que deverão conter acima de  $10^4$  microorganismos por mL (Sepkowitz et al., 1995). No homem, acredita-se que o número de casos de pacientes contaminados com *M. bovis* esteja subestimado (Zumarraga et al., 1999), pois neles raramente faz-se isolamento utilizando o meio de cultura Stonebrink para pesquisa de *M. bovis*.

De aproximadamente 300 milhões de animais que constituem a população bovina na América Latina e Caribe, apenas 80 milhões são encontrados em países nos quais as taxas de infecção por *M. bovis* são baixas ou nulas (Kantor e Ritaco, 1994; Oreilly e Daborn, 1995).

Os remanescentes 220 milhões são encontrados em países com moderada ou alta prevalência, ou onde informações recentes não são disponíveis. As maiores taxas de infecção são encontradas nas regiões produtoras de leite, localizadas nos arredores das grandes cidades da América do Sul (Kantor e Ritaco, 1994; Oreilly e Daborn, 1995).

Um estudo mais amplo demonstrou que nos Estados Unidos, no período de 1950 a 1990, houve uma queda na prevalência de bovinos infectados por *M. bovis* de 4,9% para 0,08%, enquanto no México em 1989, a doença foi diagnosticada em 11,3% das vacas e em 0,05% dos bovinos de corte, cuja carne é destinada ao consumo (Dankner et al., 1993). De 1982 a 1991, o número de bovinos importados do México aumentou de 329.000 para cerca de 1,2 milhões. Durante o mesmo período os bovinos mexicanos foram responsabilizados por 55 a 77% de todos os casos de tuberculose bovina confirmada nos rebanhos americanos, fato confirmado por Suazo et al. (2002) que descreve a disseminação da doença através da

movimentação de animais doentes e também relata a pressão de países de primeiro mundo quanto ao controle e erradicação da tuberculose animal como possível fonte de barreira comercial (Dankner et al., 1993).

No Paraguai, a prevalência da infecção por *M. bovis*, por rebanho bovino, nas bacias leiteiras de Asunción, Alto Paraná e Encarnación, era em 1975-76, de 57%, 29% e 44%, respectivamente. No período de 1981 a 1990, no país como um todo, a porcentagem de rebanhos infectados diminuiu de 9,8% para 1,3% (Kantor e Ritaco, 1994).

Argentina e Brasil, com uma população bovina de 51 milhões e 170 milhões respectivamente, devem abrigar juntos, 3.5 milhões bovinos infectados por *M. bovis* (Kantor e Ritaco, 1994; Oreilly e Daborn, 1995). Na Argentina, a perda na produção de leite de vacas tuberculosas gira em torno de 18%, como resultado de um atraso na primeira lactação e da diminuição no número e duração das lactações (Kantor e Ritaco, 1994).

Ainda hoje, apesar da pasteurização do leite e abate de bovinos reagentes à tuberculinização, um dos problemas que ocorrem em várias regiões do Brasil é o abate clandestino, que é difícil de estimar. Há produtores de bovinos de leite, com altos índices de condenação por tuberculose que enviam seus animais para serem abatidos em locais sem controle sanitário. Além disso, é bastante freqüente que bovino de leite e o de corte de pequenas propriedades, também sejam abatidos clandestinamente (Andrade et al. 1991). Dados oficiais fornecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, para o ano de 2002, mostram que apenas 8% dos animais reagentes ao teste alérgico são enviados para abate em frigoríficos sob inspeção, os demais permanecem circulando no país.

Dados concretos sobre a prevalência da tuberculose humana causada pelo *M. bovis* no Brasil são desconhecidos. Em São Paulo, no período de setembro de 1970 a

outubro de 1973, 200 estirpes de micobactérias foram isoladas de diferentes casos humanos, com diagnóstico clínico de tuberculose, sendo que sete (3,5%) estirpes de *M. bovis* foram encontradas. A tuberculose pulmonar foi responsável por cinco (2,5%) casos e a tuberculose renal, por dois (1,0%) (Corrêa e Corrêa, 1974).

Atualmente, a tuberculose humana por *M. bovis* tem uma prevalência de cerca de 0,1% na França, sendo que em outros países industrializados este quadro varia de 0,1% a 1,4% e atingindo, aproximadamente, 5% no Reino Unido. Taxas maiores têm sido registradas em países em desenvolvimento e em imigrantes provenientes da América Latina, nos Estados Unidos (Bouvet et al., 1993). Nos países onde a tuberculose em bovinos tem sido comum, cerca de 10% dos casos de tuberculose clínica em humanos são causadas pela infecção por *M. bovis* (Oreilly e Daborn, 1995). A Organização Mundial de Saúde, estima que no Brasil, a taxa de infecção humana por *M. bovis* seja de 5%.

Em uma população bacteriana numerosa, haverá sempre germes naturalmente resistentes às diferentes drogas antituberculosas. A esta condição, geneticamente determinada e independente de uma exposição prévia à droga, dá-se o nome de resistência natural (Bacteriologia, 1979; David et al., 1994; Kantor e Lesslie, 1974; Manual, 1994; Rosemberg et al., 1990). Assim, por exemplo, numa população de um bilhão de bacilos haverá cerca de 10 mil bacilos naturalmente resistentes a isoniazida (Manual, 1994).

A utilização incorreta das drogas ou a utilização de apenas uma droga (monoterapia) é responsável pela seleção e multiplicação de germes resistentes a essa mesma droga, fato a que se dá o nome de resistência adquirida (Bacteriologia, 1979; David et al., 1994; Manual 1994; Raviglione et al., 1995; Rosemberg et al., 1990). Como o tratamento é longo e a população bacteriana elevada, as células mutantes resistentes podem se multiplicar e se tornar a maioria (David et al., 1994; Manual, 1994).

Para evitar surgimento de resistência bacteriana adquirida no início do tratamento, no homem deve-se empregar, associadamente, mais de uma droga. Por exemplo, isoniazida, rifampicina, etambutol e estreptomina cuja associação é considerada capaz de impedir a seleção de mutantes resistentes. Na fase inicial do tratamento, uma cavidade tuberculosa com 2cm de diâmetro pode albergar até 10 bilhões de bacilos. Assim, por exemplo, nessa população bacteriana existirão 10.000 germes naturalmente resistentes a isoniazida e outros tantos naturalmente resistentes à estreptomina. Com a associação dessas duas drogas, no início de tratamento, a isoniazida irá destruir os mutantes geneticamente resistentes à estreptomina, mas a ela sensíveis. Em contrapartida, os mutantes geneticamente resistentes a isoniazida serão destruídos pela estreptomina. Assim, evitar-se-á o aparecimento da resistência adquirida (Manual, 1994).

Até 1944, várias drogas foram testadas no tratamento da tuberculose, sem sucesso. Em 1944, Waksman, pela primeira vez, empregou a estreptomina no tratamento da tuberculose, mudando o curso da doença, apesar de tê-la descoberto em 1940 (Manual, 1994; Paula, 1988). Depois disso, gradualmente, novas drogas foram incorporadas ao arsenal terapêutico; em 1947, o ácido para-aminosalicílico; em 1950, a isoniazida e, em 1969, a rifampicina (Festenstein e Grange, 1991; Manual, 1994).

De maneira genérica, as drogas antituberculosas interferem no sistema enzimático do bacilo ou bloqueiam a síntese de algum metabólito essencial para o seu crescimento. Assim, por exemplo, a isoniazida intervém no metabolismo de lipídeos do germe e interfere na composição de certos ácidos aminados, necessários ao equilíbrio das proteínas, dificultando a formação de DNA e RNA; a estreptomina interfere na síntese de proteínas da membrana externa microbiana e penetra nos ribossomos, ocupando o lugar das poliaminas que, em decorrência, não podem ligar-se ao RNA mensageiro; a



rifampicina inibe a atividade da enzima RNA polimerase, se unido a esta, formando um composto sólido, estável e insolúvel, impedindo sua síntese (Rosemberg et al., 1990).

Por isso, a ação das drogas só é exercida se os bacilos estão ativos em multiplicação. Se os germes estão "hibernando", em estado quiescente, sem se multiplicar e, portanto, sem atividade metabólica, as drogas não têm como agir. A isoniazida tem o maior poder bactericida, pois ela sozinha pode destruir 90% da população bacilar nas lesões. Ela é seguida pela rifampicina e etambutol, ficando por último, com ação fraca, a estreptomina, a pirazinamida e a etionamida, esta com características mais bacteriostáticas. Para todas as drogas, a atividade bactericida aumenta consideravelmente se associada a isoniazida (Rosemberg et al., 1990). A rifampicina e a pirazinamida são os fármacos dotados da mais importante ação esterilizante, devido à sua aptidão de destruir os bacilos "dormentes" que sobrevivem à ação bactericida da isoniazida e que são responsáveis pelas recaídas após o tratamento (Rosemberg et al., 1990).

A interrupção precoce do tratamento possibilita a multiplicação das micobactérias que se encontram em estado de semilátência, causando a recidiva da tuberculose. O bacilo, escapando às ações da droga, pode permanecer no interior do macrófago ou do material caseoso em estado de latência ou de atividade metabólica extremamente reduzida. Esta persistência bacteriana explica a reativação de um foco tuberculoso, após o tratamento em paciente até então considerado como curado (Manual, 1994; Rosemberg et al., 1990).

Alguns autores consideram a quimioterapia impraticável em animais por causa do tempo de duração e alto custo do tratamento, a freqüente recorrência da doença quando o tratamento é interrompido e a possibilidade de desenvolvimento de estirpes multidroga-resistente (MDR) de *M. bovis* (Flamand, et al., 1994; Oreilly e Daborn, 1995; Pritchard, 1988). Para alguns

autores, só é justificado o tratamento de animais raros ou de grande valor genético (Greth et al., 1994).

Pesquisadores estudam a viabilidade de que a isoniazida seja usada para tratar bovinos tuberculoso, por causa de sua alta especificidade, baixa toxicidade e baixo preço, em países que não podem adotar o abate dos reatores e indenização dos proprietários (Langenegger et al., 1991; Oreilly e Daborn, 1995).

No Brasil o tratamento da tuberculose bovina iniciou-se com trabalhos de Penha et al. (1963), tratando bovinos reagentes a tuberculina. Dezesesseis bovinos receberam isoniazida administrada por via subcutânea, diariamente. O período deste tratamento foi variável sendo suspenso logo que a tuberculinização dos animais apresentava-se negativa. Sorensen et al. (1993), trataram com isoniazida 331 bovinos no Estado de São Paulo, onde 32% eram reagentes ao teste alérgico. Após seis meses do início do tratamento, os animais tornaram-se negativos ao teste alérgico. Langenegger et al. (1981) aplicaram o tratamento da tuberculose bovina em rebanho altamente infectado, obtendo eficiência terapêutica de 93,28%, certificada através da dessensibilização alérgica durante dois anos e quatro meses.

Recentemente, Mota (2003) tratou experimentalmente um grupo de 240 bovinos de um rebanho naturalmente infectado pelo *M. bovis*. No início do tratamento, 36,6% dos animais foram reagentes positivos e 2,9% inconclusivos. A cura de 98,95% dos animais tratados foi verificada por meio da dessensibilização alérgica realizada pela tuberculinização e de apenas um animal que não apresentou cura isolou-se *M. bovis* que submetido à prova de sensibilidade à isoniazida apresentou-se sensível ao respectivo quimioterápico.

O complexo *M. tuberculosis* é formado por quatro espécies relacionadas, sendo elas, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* e *M. tuberculosis*. Estas espécies compartilham 85 a 100% de identidade em DNA,

possuindo seqüências altamente conservadas, mas diferindo nos seus hospedeiros, assim como na sua distribuição geográfica e na sua patogenicidade. A distinção entre as espécies deste grupo tem sido conseguida através da análise de seqüências de DNA repetitivas [*spoligotyping* ("DR direct repeat"), VNTR ("variable number of tandem repeats") *loci* como os MIRU-VNTR-*loci* ("mycobacterial interspersed repetitive units")] (Sola et al., 2003).

A utilização das técnicas moleculares na epidemiologia da tuberculose bovina podem fornecer subsídios aos programas de controle e erradicação da doença, também em países que possuem reservatórios silvestres do *M. bovis* (Clifton Hadley, 1996).

Surtos epidêmicos de tuberculose causados por mais de um tipo de *M. bovis*, sugerem múltiplas fontes de infecção, possivelmente por causa da compra de animais infectados de outras propriedades, ou infecção simultânea de rebanhos vizinhos, ou reservatórios selvagens. A freqüente movimentação de animais entre fazendas, em uma pequena região geográfica, é comum na Irlanda do Norte e a transmissão inter-bovinos é reconhecida como altamente significativa na manutenção da doença na população bovina. Por isso, a tipificação de estirpes de *M. bovis* pela técnica do *spoligotyping*, em conjunção com o registro e observação dos movimentos dos bovinos entre as propriedades, poderão ser extremamente úteis em elucidar a epidemiologia da tuberculose bovina em diferentes países (Skuce et al., 1994). Zumarraga et al. (1999) analisando perfis de *M. bovis* na América do Sul, utilizando o *spoligotyping* para tipificação, relataram a ampla distribuição dos mesmos em diferentes países. Tal situação ocorre principalmente devido a intensa movimentação de animais, através da comercialização dos mesmos, entre os países daquele continente.

Um dos maiores retrocessos no estudo epidemiológico da propagação da infecção

por *M. bovis* entre animais e homens, e particularmente entre bovinos, ou de animais selvagens para bovinos, tem sido a falta de um sistema confiável para a diferenciação de estirpes ou sub-espécies de *M. bovis*. Acredita-se que as estirpes de *M. bovis* na Irlanda, sejam particularmente homogêneas e que as diferenças genéticas sejam muito pequenas, por isso, requerem análises sofisticadas de DNA para sua demonstração (Cousins et al., 1993; Grange et al., 1990; Barry et al., 1993). Daí a necessidade de técnicas mais discriminatórias como o MIRU-VNTR ou que seja feito uma associação de técnicas de tipificação molecular de modo a aumentar a confiabilidade dos resultados.

Na Nova Zelândia, verificou-se que o perfil das estirpes que infectavam bovinos eram diferentes daqueles que infectavam o marsupial, que é o reservatório do *M. bovis* na região quando estas duas espécies não estavam em contato (Collins et al., 1994). Em áreas onde os bovinos entravam em contato com as populações do reservatório, as estirpes que foram encontradas infectando os bovinos possuíam um perfil idêntico ao perfil das estirpes isoladas da população de reservatórios. Dados semelhantes foram obtidos em relação ao texugo no Reino Unido e aos cervídeos nos Estados Unidos (Collins et al., 1994; van Embden et al., 1995). No Brasil, pouco se sabe sobre reservatórios silvestres de *M. bovis*.

A maior contribuição dos métodos moleculares na tipificação de *M. bovis* está sendo o auxílio na elucidação da epidemiologia da tuberculose. Os métodos empregados vão desde análise dos padrões de restrições do DNA das estirpes, até técnicas muito mais complexas como *spoligotyping* ("spacer oligotyping") (Collins et al., 1994; van Embden et al., 1995; Kamerbeek et al., 1997) e MIRU-VNTR (Supply et al., 2000).

O *spoligotyping* é uma técnica que mistura amplificação por PCR e hibridação por sondas específicas. Permite a identificação de *M. bovis*, diferenciando esta das outras



espécies do complexo *M. tuberculosis*, além de fornecer um perfil de grande utilidade no estudo da epidemiologia da doença (Roring et al., 2002). Estudos demonstram que a tipagem de estirpes, utilizando-se seqüências repetitivas, tipo VNTR, presentes em espécies do complexo *M. tuberculosis*, pode diferenciar estirpes, com

o potencial de também ser utilizada para estudos filogenéticos (Skuce et al., 2002). No caso de seqüências MIRU-VNTR, a análise combinada de doze *loci* será capaz de discriminar as espécies do complexo *M. tuberculosis* e estirpes individuais (Frothingham e Meeker-O'Connell, 1998).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

O trabalho foi realizado no Laboratório de Tuberculose do Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA-MG do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA em Pedro Leopoldo-MG e nos Laboratórios de Tuberculose do Centro de Referência Hélio Fraga da Fundação Nacional de Saúde e no Laboratório de

Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz, estes últimos no Rio de Janeiro.

#### 3.2. AMOSTRAS

Foram analisadas lesões tipo tuberculosas, de animais abatidos no Estado de Minas Gerais, em frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal e lesões de animais com suspeita clínica de tuberculose enviadas ao Laboratório Regional de Apoio Animal – MG obtidas de material de campo do Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras, em destaque na Figura 1.



Figura 1: Identificação em destaque dos estados do Brasil que encaminharam lesões tipo tuberculosas ao LARA-MG no período de 2001-2002 para fins de isolamento de *M. bovis*.

Foram analisadas estirpes de *M. bovis* do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento gentilmente fornecidas pelo Dr. Pedro Moacir Pinto Coelho Mota.

### 3.3. COLETA DE MATERIAL

Os materiais foram coletados em frigoríficos sob Inspeção Federal em diferentes regiões do Estado, sendo elas, Uberlândia, Belo Horizonte, Ituiutaba, Teófilo Otoni, Betim, Nanuque, Igarapé, São Sebastião do Paraíso, Campo Belo, Varginha, Governador Valadares, Uberaba, Pará de Minas, Pouso Alegre, Poços de Caldas, Caratinga, Passos e Paracatu, destacados

na Figura 2. As lesões suspeitas foram coletadas pelos fiscais agropecuários do Ministério da Agricultura na linha de matança.

As lesões assim coletadas foram acondicionadas em potes de plástico PVC e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o envio em caixa de isopor com gelo reciclável para o laboratório. As lesões foram enviadas ao laboratório acompanhadas do formulário de encaminhamento para diagnóstico (Anexo) que além de informações sobre a amostra continha dados epidemiológicos. O mesmo procedimento foi feito com as amostras enviadas por veterinários de campo.

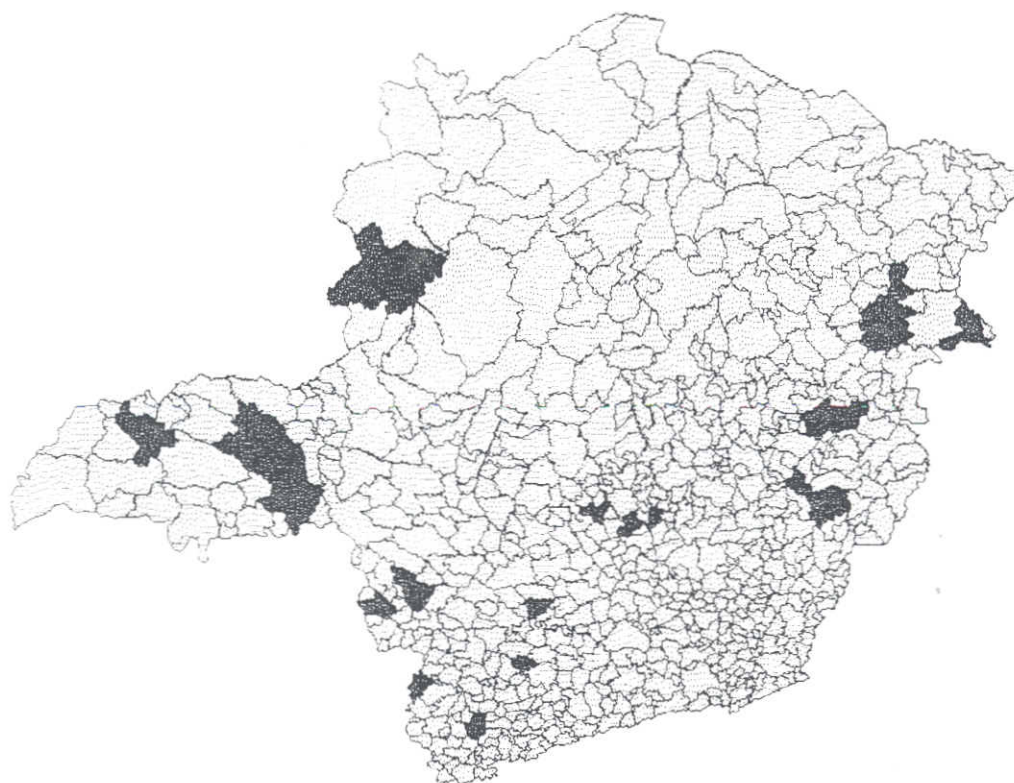


Figura 2: Identificação, em destaque, das regiões no Estado de Minas Gerais que encaminharam lesões tipo tuberculosas ao LARA-MG no período de 2001-2002 para fins de isolamento de *M. bovis*.

### 3.3.1. AMOSTRAS TRABALHADAS

sugestivas de tuberculose conforme Tabela 1.

Dos 20 frigoríficos sob SIF participantes do trabalho, 14 encaminharam lesões

Tabela 1: Lesões tipo tuberculosas, encaminhadas ao LARA-MG, por estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) identificados por A à N, com número de lesões por SIF, municípios e regiões de origem e total de espécimes enviadas por veterinário de campo.

SIF	Município	Região	Nº de lesões enviadas
A	Campo Belo	Centro Oeste de Minas	13
B	Teófilo Otoni	Jequitinhonha/Mucuri	02
C	Ituiutaba	Triângulo Mineiro	47
D	Belo Horizonte	Central	02
E	Uberaba	Triângulo Mineiro	02
F	Uberlândia	Triângulo Mineiro	02
G	Teófilo Otoni	Jequitinhonha/Mucuri	01
H	Betim	Central	18
I	Nanuque	Jequitinhonha/Mucuri	10
J	Igarapé	Central	02
K	Pará de Minas	Central	01
L	Ituiutaba	Triângulo Mineiro	17
M	São Sebastião do Paraíso	Sul de Minas	09
N	Passos	Sul de Minas	03
Amostras de campo			56
Total			185

### 3.4. DESCONTAMINAÇÃO E ISOLAMENTO DE *M. bovis*

De cada material era retirado o tecido conjuntivo adjacente e seccionado em fatias de dois a três milímetros de espessura. Para cada material foi utilizado instrumental recém-esterilizado. Das amostras com lesões, retirava-se aproximadamente 10 gramas de material, constituído da parte alterada e pequena quantidade de tecido normal. A descontaminação de todo material coletado foi realizada de acordo com Mota (1985) utilizando solução de ácido sulfúrico a 6% (v/v), durante 30 minutos, incluindo 15 minutos de centrifugação a 500 x g. O sedimento foi lavado duas vezes com salina 0,85% e depois inoculado em quatro tubos contendo meio Stonebrink. As culturas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante dois meses.

O material restante era estocado a -20°C para posterior utilização se a primeira inoculação fosse inviabilizada devido a contaminação ou a ausência de isolamento.

Neste caso, o processo era repetido por mais duas vezes. Após incubação, culturas positivas foram examinadas pela coloração de *Ziehl-Neelsen* e caracterizadas por métodos bioquímicos e moleculares.

### 3.5. PROVAS BIOQUÍMICAS

As provas bioquímicas foram realizadas conforme metodologia descrita pelo Centro Panamericano de Zoonosis (Bacteriologia, 1988). Foram realizados testes da fita de niacina (Difco-USA), reação de redução de nitratos, cultivo em Löwenstein-Jensen (LJ) contendo 100µg/mL de pirazinamida, prova de hidrólise do Tween (5-10 dias) e teste da atividade da catalase a 68°C.



### 3.6. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE A QUIMIOTERÁPICOS

O meio de cultura Stonebrink com glutamato de sódio, sem piruvato, adicionado de quimioterápicos foi utilizado para verificar sensibilidade do *M. bovis* às drogas. A concentração dos quimioterápicos no meio Stonebrink para estreptomicina, rifampicina, etambutol, etionamida e isoniazida foram, respectivamente, 4,0µg/mL, 40,0µg/mL, 2,0µg/mL, 20,0µg/mL e 0,2µg/mL conforme recomendações do Centro Panamericano de Zoonosis (1988).

### 3.7. TIPIFICAÇÃO POR MÉTODOS MOLECULARES

#### 3.7.1. EXTRAÇÃO DO DNA E DETECÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi realizada pelo método CTAB (Hexadecyl Trimethylammonium Bromide) (van Embden et al., 1993). A partir da cultura em meio Stonebrink, aproximadamente uma alça descartável calibrada para 10 µl repleta do crescimento bacteriano, foi transferida para microtubos contendo 500µL de tampão TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM, pH 8.0). Os cultivos foram aquecidos em banho-maria a 80°C por 20 minutos para inativação das micobactérias. A lise bacteriana ocorreu pela adição de 50µL de lisozima (Sigma Chemical CO, USA) e a mistura foi agitada em homogeneizador automático e em seguida incubada a 37°C por 18 horas. Após este período foram acrescentado 60µL de proteinase K (Sigma Chemical CO, USA) a 10mg/mL e 70µL de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) a 10% (v/v) (Sigma Chemical CO, USA), sendo a mistura então incubada em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100µL de solução de NaCl 5M e 80µL de CTAB (Sigma Chemical CO, USA) a 10% (p/v), seguido de incubação por 10 minutos em banho-maria a 65°C.

Em seguida, volumes iguais de clorofórmio (350µL) (Merck) e álcool isoamílico (350µL) (Merck) foram adicionados e os tubos agitados em homogeneizador automático e centrifugados por cinco minutos a 12000 x g a 4°C.

A fase superior aquosa foi transferida para novos tubos e adicionados de 450µL de isopropanol (Merck) a 4°C. Os tubos foram mantidos durante à noite a -20°C. Após este período os tubos foram centrifugados à 12000 x g por 20 minutos e o sedimento lavado com 250µL de etanol 70% (Merck) a 4°C. Após evaporação do etanol foi adicionado ao sedimento 50µL de tampão TE 1X e estocado a -20°C.

O resultado da extração do DNA foi verificado em gel de agarose (GIBCO/BRL, USA) a 0,8% (p/v) preparada em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89mM, EDTA 2,5mM, ácido bórico 89mM, pH 8.0) (Sigma Chemical CO, USA) e corado com brometo de etídio (10mg/mL) (Sigma Chemical CO, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 75mA por um período de 30 minutos e a concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro a 260nm.

#### 3.7.2. SPOLIGOTYPING

A técnica de tipagem molecular *spoligotyping* foi realizada conforme descrito por Kamerbeek et al. (1997).

A amplificação das regiões espaçadoras pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi efetuada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Dra e Drb. As seqüências dos iniciadores são as que se seguem:

Dra – 5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3' biotinilado

Drb – 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3'

As concentrações utilizadas de cada reagente para a reação de PCR foram de 10 a 20 ng de DNA alvo, 20 pmol de cada iniciador (Dra e Drb – GIBCO/BRL, USA), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (GIBCO/BRL, USA), uma unidade de Taq polimerase (GIBCO/BRL, USA), tampão de enzima 1X (GIBCO/BRL, USA) e água destilada q.s.p. Em cada reação foram utilizados dois controles negativos e dois positivos, sendo estes últimos BCG Moureau e H37RV *M. tuberculosis*.

Os ciclos de amplificação utilizados foram 3 minutos a 96°C para desnaturação inicial, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 96°C por 60 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por cinco minutos.

Para hibridização dos produtos de PCR alíquotas de 30µl do produto de PCR amplificado foram diluídas em 150 µl de tampão 2X SSPE (0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,6M NaCl, 20Mm EDTA, pH 7.4) / 0,1% SDS e desnaturadas a 99°C durante 10 minutos, em seguida foram imediatamente colocadas em banho de gelo. Esta mistura foi então aplicada ao "miniblotter" (Immunetics, Cambridge-MA) onde previamente foi montada a membrana na qual estavam adsorvidas as 43 sequências correspondentes às regiões espaçadoras ("spacers") conhecidas do complexo *M. tuberculosis*. A hibridização foi realizada à 60°C por um período de 60 minutos em uma superfície horizontal sem agitação. Após este período a membrana foi lavada duas vezes com 200 mL de tampão 2X SSPE/0,5% SDS a 60°C por 10 minutos, e então incubada com 10µL do conjugado estreptavidina-peroxidase (Pharmacia Biotech) a 42 °C por um período de 45 a 60 minutos. Em seguida a membrana foi

lavada mais duas vezes com 2X SSPE a temperatura ambiente. Ao final das lavagens, a membrana foi incubada com aproximadamente 20 mL do líquido de detecção ECL (Kit ECL Amerhans – Pharmacia Biotech) para em seguida detectar por quimioluminescência a presença na membrana de produto de PCR híbrido após 60 minutos da exposição da membrana a um filme sensível à luz. Os perfis obtidos foram analisados em programa de computador Gelcompar® e posteriormente as estirpes foram distribuídas em grupos, denominados neste trabalho de GS, em função dos seus perfis genéticos semelhantes. Em seguida, os perfis obtidos foram pesquisados no banco de perfis disponível na Internet, no site www.Mbovis.br com o objetivo de identificar aqueles comuns a outros países.

### 3.7.3. MIRU-VNTR

O MIRU-VNTR foi aplicado conforme descrito por Supply et al. (2000). O perfil de MIRU-VNTR de diferentes isolados de *M. bovis* foi determinado através da técnica de PCR em 12 *loci* variáveis, sendo eles, MIRU-VNTR'S 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 e 40. Os iniciadores utilizados para cada *locus* foram os apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência de iniciadores utilizados para a amplificação dos 12 MIRU-VNTRs *loci* de *M. bovis*

<i>Locus</i>	PCR iniciadores 5' a 3'	<i>Locus</i>	PCR iniciadores 5' a 3'
MIRU-VNTR 2	TGGACTTGCGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT	MIRU- VNTR 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU-VNTR 4	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGTCAGC	MIRU- VNTR 26	CCCGCCTTCGAAACGTCGCT TGGACATAGGCGACCAGGCGAATA
MIRU-VNTR 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGTACCT	MIRU- VNTR 27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU-VNTR 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCCTCGTGCCAGCCCTGGTAC	MIRU- VNTR 31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGGGTCTTGAT
MIRU-VNTR 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	MIRU- VNTR 39	CGCATCGACAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU-VNTR 23	CAGCGAAACGAAGTGTGCTATCAC CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT	MIRU- VNTR 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA



As concentrações utilizadas de cada reagente para a reação de PCR foram de 10 a 20 ng de DNA alvo, 100 pmol do iniciador (GIBCO/BRL, USA), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (Invitrogen, Life Technologies, New Zealand), uma unidade de Taq DNA polimerase (Biotools do Brasil), tampão de enzima 1X (Biotools do Brasil) e água destilada q.s.p. As concentrações de MgCl<sub>2</sub> (Biotools do Brasil) foram de 1mM para as reações 20 e 26, 1.5mM para as reações 16, 24 e 27, 2.5mM para a reação 39 e 2mM para as demais. Cada "mix" continha um volume final de 25µL.

As condições de amplificação para os MIRU-VNTR'S 24 e 26 foram um ciclo à 95°C por cinco minutos para desnaturação inicial seguido de 40 ciclos a 95°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos para anelamento, 72°C por 90 segundos para extensão e um ciclo a 72°C por 10 minutos para extensão final.

As condições de amplificação para os MIRU-VNTR'S 2, 4, 10, 16, 20, 23, 27, 31, 39 e 40 foram um ciclo a 95°C por cinco minutos para desnaturação inicial seguido de 40 ciclos a 95°C por um minuto, 60°C por um minuto para anelamento, 72°C por um minuto e meio para extensão e um ciclo a 72°C por 10 minutos para extensão final. Para controle da amplificação, em cada reação foi utilizado a BCG Moureau e dois controles negativos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (GIBCO/BRL, USA) a 2% (p/v) preparada em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89mM, EDTA 2.5mM, ácido bórico 89mM, pH 8.0) (Sigma Chemical CO, USA) e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Sigma Chemical CO, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 75 mA por um período de 120 minutos. Foi utilizado marcador de peso molecular de

100pb (Invitrogen, Life Thechnologis, Carlsbad, CA).

Os resultados obtidos após a visualização dos produtos de PCR foram convertidos para uma matriz numérica conforme Supply et al. (2000). Os perfis genéticos obtidos (combinação dos 12 *loci* para cada isolado) foram inseridos em programa de análise numérica Excel® para agrupamento de perfis idênticos com fórmula editada  $y=SE(N_x=N_{x-1}, "**", "**")$  onde N é a coluna que se inseri a combinação numérica do MIRU-VNTR, x se inseri a identificação da estirpe em análise, sendo  $x>1$ . Posteriormente as estirpes foram distribuídas em grupos, denominados neste trabalho de GM, em função dos seus perfis genéticos semelhantes.

A diversidade alélica foi calculada utilizando a equação  $h = 1 - \sum x_i^2 / [n(n - 1)]$ , onde h é a diversidade alélica, n é o número de isolados e  $x_i$  a frequência do alelo no *locus* (Roring et al., 2002).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Foram enviadas um total de 185 lesões tipo tuberculosas, sendo 129 de frigoríficos sob SIF e 56 foram enviadas por veterinários de campo ou pelo proprietário do animal. Dessas, após inoculação em meio Stonebrink, foram obtidos 89 isolados dos quais 65 foram *M. bovis* sendo 49 obtidos de lesões provenientes de regiões do Estado de Minas Gerais (Tabela 4), 12 a partir de lesões provenientes de outras regiões brasileiras fornecidas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Tabela 3) e de quatro isolados não se tem informação sobre região de origem. Os demais 24 isolados foram identificados como MOTT.

Tabela 3: Lesões tipo tuberculosas com isolamento de *M. bovis*, provenientes de diferentes regiões brasileiras e encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002, com as respectivas regiões de origem dos bovinos.

Número de identificação da amostra	Origem
10	Manaus/AM
17	Tabatinga/DF
18	Tabatinga/DF
158	Santa Catarina
160	Campo Grande/MS
162	Concórdia/Santa Catarina
163	Santa Catarina
164	Mafra/Santa Catarina
166	Patos/PB
169	Presidente Prudente/SP
172	Campo Grande/MS
178	João Pessoa/PB

No isolamento, em 65 tubos observou-se cultivo macroscópico de crescimento lento, com poucas e pequenas colônias chatas, lisas, sem pigmento e caracterizadas como bacilo álcool ácido resistente (BAAR). Nas provas bioquímicas as estirpes apresentaram ausência de atividade de redução de nitrato, negativas para o teste da fita de niacina, crescimento positivo em presença de pirazinamida, negativo nas provas de hidrólise do Tween e negativo na prova da catalase a 68°C, resultados estes característicos de *M. bovis*.

Do total de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG, em aproximadamente 50% delas, não houve isolamento de micobactérias conforme Figura 3.

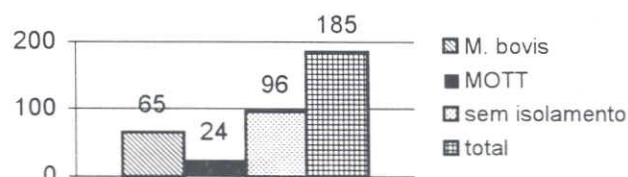


Figura 3: Total de amostras com lesão tipo tuberculosa encaminhadas ao LARA-MG, no período de 2001-2002, com número de micobactérias isoladas e número de lesões sem isolamento.

Estes resultados nos permitem inferir que há casos de condenação de peças e carcaças em frigoríficos que não são devido à *Mycobacterium sp.* Nestes casos podem ser lesões devido à outros agentes, tais como, *Nocardia sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Actinomyces sp.*, *Actinobacillus sp.* ou devido à migração de larvas nos tecidos. Pode também estar relacionado a falha no isolamento, que segundo alguns autores, culturas falso-negativas podem ocorrer pois é necessário acima de  $10^3$  microorganismos viáveis por mililitro de material como concentração mínima para cultivo. Esta

concentração nem sempre é possível devido à contaminação dos cultivos por outros microorganismos, sendo necessários processos de descontaminação à base de ácidos (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou álcalis (NaOH) que podem inviabilizar até mesmo as micobactérias (Sepkowitz et al., 1995).

Segundo Liebana et al. (1995) os melhores resultados de descontaminação e isolamento de *M. bovis* ficam ao redor de 70% e neste trabalho foram isolados *M. bovis* apenas em 35% das lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG.



Assim o apoio laboratorial para confirmação do diagnóstico macroscópico se faz necessário, através da confirmação da lesão tipo tuberculosa por micobactérias e se constitui em uma das metas do PNCEBT.

Tabela 4: Lesões tipo tuberculosas com isolamento de *M. bovis*, provenientes do Estado de Minas Gerais e encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002, com as respectivas regiões de origem dos bovinos no Estado.

Número de amostras (%)	Região do Estado
01 (1,54)	Rio Doce
06 (9,2)	Zona da Mata
07 (10,8)	Triângulo Mineiro
08 (12,30)	Centro Oeste
12 (18,46)	Sul
15 (23,00)	Central

Das lesões positivas com isolamento de *M. bovis*, para o Estado de Minas Gerais, a maioria 27 (41,5%) foram oriundas da região Centro-Sul de Minas Gerais, resultados estes que podem ser corroborados pelo trabalho de Belchior (2001), que através do teste de tuberculinização comparada obteve índices de prevalência de 0,88% de animais positivos para as regiões Sul e Sudoeste do Estado, como as de maior número de rebanhos positivos ao teste alérgico seguidos da região do Alto Paranaíba com 0,71% e Vale do Rio Doce com 0,15%.

As regiões Sul e Sudoeste do Estado de Minas Gerais são bacias leiteiras tradicionais com um sistema de produção semi-intensivo a intensivo. O risco de ocorrer tuberculose bovina é maior nos sistemas de produção de leite e com maior tecnificação da produção como ocorre no Sul do Estado conforme já relatado por Belchior (2001). Propriedades com este sistema de produção apresentam uma prevalência superior de casos de tuberculose em relação àquelas com menor grau de tecnificação.

Bovinos criados nestas regiões pelo próprio tipo de manejo que são submetidos, tendem a ser mais susceptíveis a contaminação por

estarem em alta densidade e aglomerados, fato que permite contaminação intensa por via aerógena. Além disso, o estresse metabólico constante em que ficam submetidos leva-os a uma baixa imunidade e aumenta as chances de manifestação clínica da tuberculose.

Neste trabalho, foram obtidos 24 isolados com crescimento de micobactérias atípicas que apresentaram crescimento rápido e com aspecto mucoso. Essas micobactérias atípicas representaram 26,9% do total de isolados e este resultado poderá ter importância epidemiológica também na tuberculose humana já que algumas micobactérias como o complexo *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* e *M. fortuitum* podem dar origem à lesões semelhantes ao complexo *M. tuberculosis* já descrito por Roberts et al. (1991); Nolte e Metchock (1995), principalmente em pacientes HIV positivos.

Neste trabalho, quase 50% das micobactérias atípicas foram obtidas de lesões encaminhadas pelo SIF identificado pela C situado na Região do Triângulo Mineiro do Estado de Minas Gerais. Belchior (2001) também já havia relatado reações inespecíficas no teste alérgico em bovinos no Estado de Minas Gerais, sugerindo infecção com micobactérias atípicas, em 34,9% de fazendas de um total de 1586 propriedades avaliadas, porém sem referência a regiões de maior prevalência.

A região do Triângulo Mineiro é sabidamente uma região com grandes áreas produtoras de grãos e conseqüentemente com grande efetivo de suínos e aves. A utilização dos dejetos desses animais como adubo e fonte de alimentação suplementar para bovinos, pode ser um fator de fonte de infecção de transmissão de micobactérias atípicas, justificando o aparecimento desses isolados nas lesões oriundas daquela região.

*M. avium* e *M. intracellulare* são encontrados na água, solo e outras fontes ambientais. Eram considerados de baixa patogenicidade e, até pouco tempo,

colonizadores que raramente causavam doença. Entretanto nestas últimas duas décadas, conforme descrito por Falkinham (1996) um grande número de casos foram registrados no homem e somente *M. tuberculosis* tem ocorrido com maior frequência que *M. avium*.

Nos últimos anos a importância das micobactérias não tuberculosas em veterinária, de acordo com Acha e Szyfres (1986) e Balian (1995), se deve não somente às perdas econômicas por condenação de carcaças principalmente de suínos nos matadouros, sensibilização de bovídeos à prova tuberculínica mas também ao risco de transmissão para o homem. Entretanto a identificação molecular das mesmas não foi realizada por não ser objeto deste trabalho.

#### 4.2. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE À QUIMIOTERÁPICOS

Não foi verificado, em nenhuma estirpe isolada, resistência aos principais quimioterápicos utilizados no tratamento da tuberculose humana, sendo eles, estreptomina, rifampicina, etambutol, etionamida e isoniazida, esta última empregada no tratamento de tuberculose em bovinos. Assim, os resultados servem como uma informação auxiliar aos profissionais da área de saúde no sentido de orientar a escolha da medicação em casos de pacientes humanos com infecção por *M. bovis* e acrescenta informação à área da medicina veterinária quanto à sensibilidade a isoniazida.

Observa-se crescente preocupação da comunidade científica com o aumento de casos de tuberculose tanto no homem como em animais causada por estirpes resistente à quimioterápicos. No Brasil, quanto ao *M. bovis* resistente a drogas, Corrêa e Corrêa (1974) observaram três estirpes (1,5%) de *M. bovis* multirresistentes em estudo com 200 estirpes de micobactérias isoladas de tuberculose humana. Zanini (2002) isolou 135 estirpes de *M. bovis* isoladas de lesões tipo tuberculosas e submetendo as mesmas

à prova de sensibilidade à isoniazida encontrou quatro resistentes.

A importância do monitoramento de micobactérias resistentes a medicamentos vem de encontro com a constante preocupação da OMS, que desde 1993 declarou que a tuberculose mantém-se como um grave problema de saúde pública e que esta situação vêm se agravando com o crescimento do número de indivíduos portadores da AIDS e o aparecimento de estirpes com resistência múltipla a drogas (estirpes MDR) já descrito por Blásquez et al. (1997). Conforme descrito por Oreilly e Daborn (1995), a AIDS aumentou o risco de manifestação da doença em humanos, tanto por *M. tuberculosis* como possivelmente por *M. bovis*.

O tratamento da tuberculose bovina principalmente nas bacias leiteiras de Minas Gerais e São Paulo tornou-se rotina em rebanhos infectados. Esta rotina, conforme descrito por Belchior (2001) tornou-se tão popular que algumas cooperativas, com objetivo de "facilitar" a vida dos cooperados, adquirem isoniazida em grandes quantidades e repassam esta droga aos proprietários rurais sem nenhum controle.

Atualmente existe no Brasil uma grande polêmica a respeito do tratamento da tuberculose bovina, tendo argumentos a favor e contra tal procedimento, articulados por grupos de pesquisadores. Movimentos contra o tratamento da tuberculose bovina, baseiam-se na dificuldade de se fazer o controle dessa doença sem a utilização do sistema de teste e abate dos positivos. Além disso, aqueles que utilizam tratamento, têm risco maior de disseminação do agente, pois bovinos infectados e não curados poderão estar eliminando o agente e aumentando a difusão da doença entre propriedades e entre regiões. Outro argumento negativo sobre a utilização do tratamento de bovinos com tuberculose é que a indução de resistência de *M. bovis* à quimioterápicos poderá trazer complicações para a área humana por se tratar de uma zoonose. Caso ocorra contaminação de humanos por



este agente, estirpes MDR complicariam e/ou dificultariam o tratamento.

A favor do tratamento são os proprietários de animais que têm resistência em aderir ao sistema de teste e abate, sobretudo em regiões de alta prevalência da doença, como também os resultados de trabalhos de pesquisa que utilizaram o tratamento com sucesso no controle da tuberculose bovina.

No Brasil, Langenegger et al. (1981, 1991) demonstraram a eficiência do tratamento da tuberculose bovina no país. Esses autores aplicaram o tratamento da tuberculose bovina em rebanho altamente infectado obtendo eficiência terapêutica de 93,28% certificada através da dessensibilização alérgica durante dois anos e quatro meses. Recentemente, Mota (2003), tratou com isoniazida bovinos de um rebanho naturalmente infectado por *M. bovis* na região da Zona da Mata no Estado de Minas Gerais e obteve 98,9% de cura dos animais tratados verificada por meio da dessensibilização alérgica e exame bacteriológico.

Associando a abordagem acima, onde pesquisadores obtiveram sucesso utilizando isoniazida no tratamento da tuberculose bovina, com dessensibilização alérgica dos mesmos e associados com os resultados obtidos neste experimento, onde nenhuma estirpe isolada apresentou resistência a esta droga sugere-se que o tratamento da tuberculose bovina com isoniazida poderia ser utilizado em casos excepcionais sob acompanhamento criterioso de Médico Veterinário Oficial.

#### 4.3. TIPIFICAÇÃO MOLECULAR

O método *spoligotyping* aplicado às 65 estirpes de *M. bovis* isoladas dos diferentes municípios de Minas Gerais e outras regiões brasileiras, constituiu-se no maior número de estirpes de *M. bovis* isoladas no Brasil e submetidas a esta técnica. O resultado demonstrou a presença de 36 diferentes perfis sendo nove agrupados, conforme dendograma na Figura 4.



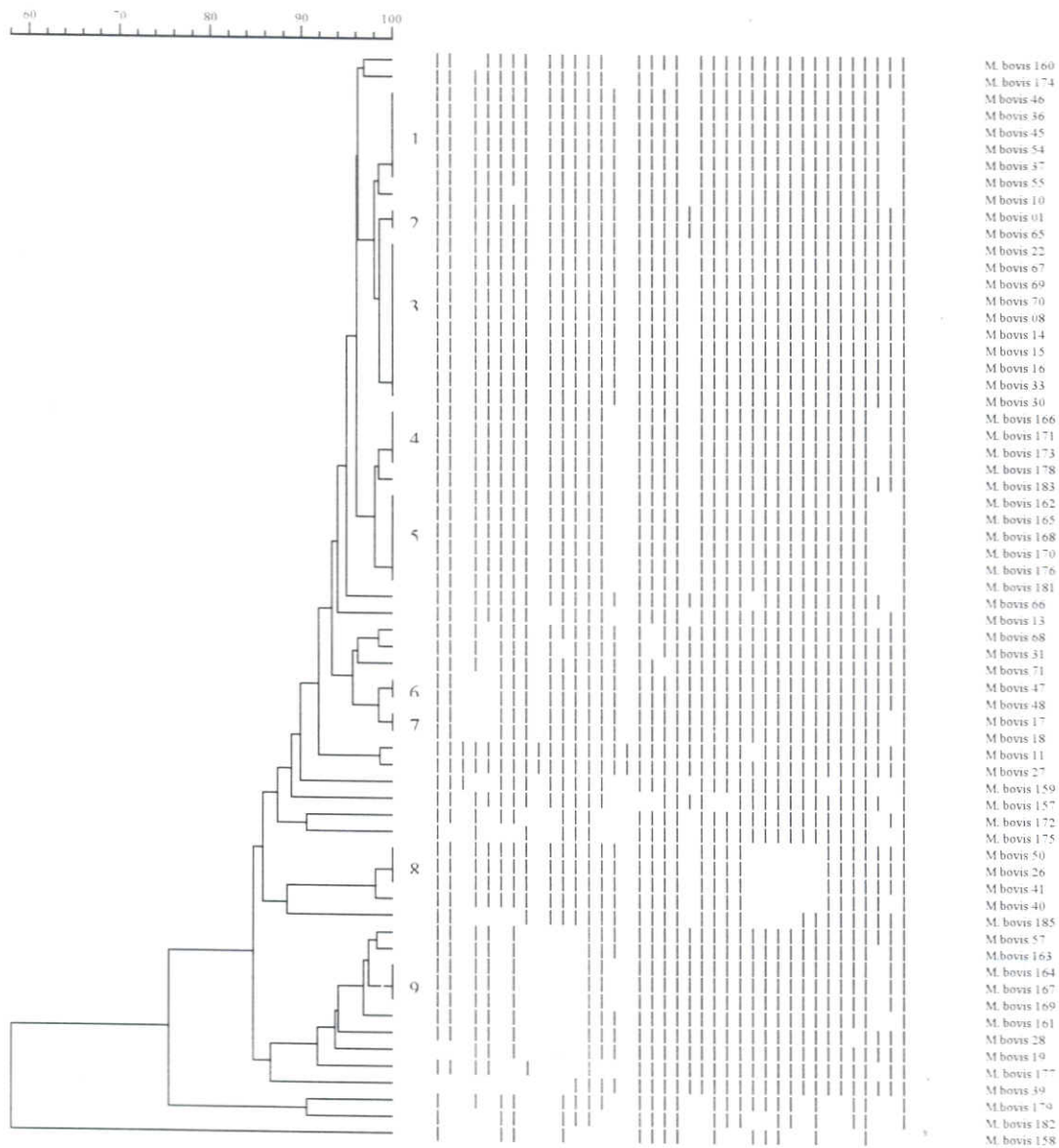


Figura 4 : Correlação por dendrograma de polimorfismos de DNA, obtidos pela técnica de *spoligotyping*, em 65 estirpes de *M. bovis* isoladas à partir de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG, no período de 2001-2002, por municípios de Minas Gerais e outras regiões brasileiras. Na figura, os perfis agrupados estão numerados de 1 a 9 e à direita estão os números de identificação das amostras.

No programa Gel Compar® o perfil de cada estirpe foi identificado individualmente. No dendograma, os perfis semelhantes foram colocados próximos entre si e as estirpes com perfis idênticos foram agrupadas. A Tabela 5 apresenta a distribuição dos perfis estabelecidos pelo *spoligotyping* com o

número de isolados em cada perfil das estirpes de *M. bovis* trabalhadas neste experimento. As estirpes com perfis que não foram agrupados no dendograma foram denominadas estirpes com perfis individuais.

Tabela 5: Distribuição dos perfis estabelecidos pelo *spoligotyping* das 65 estirpes de *M. bovis*, obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002, com o número de isolados em cada perfil com suas respectivas regiões de origem.

Grupo	Nº isolados	Região
GS 1	06	Central e Triângulo Mineiro
GS 2	02	Centro Oeste e Triângulo Mineiro
GS 3	10	Central, Centro Oeste, Sul, Zona da Mata
GS 4	04	Central, Triângulo Mineiro, Paraíba
GS 5	06	Centro Oeste e Sul
GS 6	02	Sul
GS 7	02	Distrito Federal
GS 8	03	Central, Centro Oeste, Rio Doce
GS 9	01	Zona da Mata, Santa Catarina, São Paulo
Perfis individuais	27	Central, Triângulo Mineiro, Sul, Centro Oeste, Zona da Mata, São Paulo, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Amazonas

Foram observadas as maiores frequências para os grupos GS 3, com 10 (15,38%) estirpes, e a menor frequência para os grupos GS 2, GS 6 e GS 7, sendo duas estirpes em cada.

Neste trabalho, foram encontradas duas estirpes, sendo elas as de número 01 e 65 do grupo GS 2, com o perfil de ausência de hibridização com os espaçadores 3, 9, 16 e 39 a 43, corroborando com resultados encontrados por Zumarraga et al. (1999), que analisando perfis de *M. bovis* isolados na América do Sul, verificou que este mesmo perfil foi detectado em diversos países da América do Sul.

Foram encontrados perfis com ausência de hibridização com os espaçadores 3, 9, 16, 21 e 39 à 43, em 10 estirpes analisadas sendo elas as de número 08, 14, 15, 16, 22, 30, 33, 67, 69 e 70 do grupo GS 3. Estes resultados foram similares ao obtidos por Zumarraga et al. (1999) que descreveu este

perfil também como típico de estirpes brasileiras. O mesmo autor descreveu para o Brasil perfil com ausência de hibridização com os espaçadores 3, 4, 9, 16 e 39 à 43 porém em nenhuma amostra estudada foi encontrado o referido perfil.

Em 24 estirpes obteve-se ausência de hibridização com o espaçador 37, sendo que esta característica foi observada também por Aranaz et al. (1996) em nove estirpes isoladas na Espanha e por Njanpop-Lafourcade et al. (2001) em duas estirpes isoladas em Camarões. Estes resultados chamam atenção, pois indica que pode estar ocorrendo a disseminação de estirpes entre diferentes países.

Conforme Tabela 5, os perfis GS 4 e GS 9 foram encontrados em regiões do Estado de Minas Gerais como também em outras regiões brasileiras. O perfil GS 9 foi encontrado na Zona da Mata e nos Estados de Santa Catarina e São Paulo. O perfil GS



4 foi encontrado nas regiões Central e Triângulo Mineiro e também no Estado da Paraíba sugerindo, nestes casos, movimentação de animais dentro do país, da região sudeste para a região nordeste e sul ou em sentido inverso.

Esses resultados ilustram a disseminação de perfis no país conforme já relatado por Zumarraga et al. (1999) que para a América do Sul este fato deve-se ao trânsito de animais por exposições agropecuárias, leilões e principalmente pelo comércio dos mesmos.

O perfil GS 6 foi encontrado em dois isolados de lesões de bovinos, que conforme ficha de encaminhamento de amostras (Anexo), foram enviados juntos ao laboratório por um mesmo SIF e provavelmente da mesma propriedade. O mesmo ocorre com o perfil GS 7 que foi observado em duas estirpes enviadas juntas para análise, como material de campo.

Para o perfil GS 8 não foi possível estabelecer especificidade geográfica já que o mesmo foi encontrado nas regiões Central, Rio Doce e Centro Oeste. Para os demais isolados foram obtidos perfis individuais não apresentando correlação geográfica entre eles.

Analisando os perfis circulantes nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, com base na análise de perfis feita pelo *spoligotyping*, tem-se para a região Central, conforme Tabela 6, a predominância dos perfis GS 1, GS 3, GS 4 e GS 8, no Triângulo Mineiro os perfis GS 1, GS 2 e GS 4, no Centro Oeste os perfis GS 2, GS 3, GS 5 e GS 8, na região Sul GS 3, GS 5 e GS 6, na Zona da Mata os perfis GS 3 e GS 9 e Rio Doce apenas o perfil GS 8, neste caso, única amostra positiva desta região. Assim, nas regiões Central e Centro Oeste do Estado de Minas Gerais, houve maior diversidade de perfis que pode ser correlacionado com intenso trânsito de animais por se tratar do centro do Estado e

ser comumente rota de passagem para outras localidades.

Tabela 6: Perfis das estirpes de *M. bovis* circulantes nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais determinados pelo *spoligotyping*, obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.

Região	Perfil (s)
Central	GS1, GS3, GS4, GS 8
Triângulo Mineiro	GS1, GS2, GS4
Centro Oeste	GS2, GS3, GS5, GS8
Sul	GS3, GS5, GS6
Zona da Mata	GS3, GS9
Rio Doce	GS 8

A diversidade genética dos isolados de *M. bovis* em bovinos provavelmente seja devido a movimentação indiscriminada dos mesmos, que no Brasil, ocorrem principalmente devido a feiras, exposições agropecuárias e leilões, o que permite contato direto de animais oriundos de diferentes regiões. No Estado de Minas Gerais tem-se que os animais abatidos em seus frigoríficos são oriundos de 13 estados brasileiros diferentes e há pouco controle do tempo de permanência desses animais no município de abate e bem como sobre o contato dos mesmos com outros animais durante o transporte.

Trabalho semelhante foi realizado no México por Suazo et al. (2002) onde foram coletadas lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos em frigoríficos, de fazendas situadas em uma área de aproximadamente 500.000 km<sup>2</sup>, semelhante a superfície do Estado de Minas Gerais. Os autores discutiram a dificuldade de estabelecer especificidade geográfica para os isolados de *M. bovis* e relataram que tal situação se deve ao intenso trânsito sem controle de animais na região, entretanto nenhum dos perfis isolados por este pesquisador foi encontrado neste trabalho.

Outro trabalho realizado em Minas Gerais por Zanini et al. (2001), de forma semelhante, obteve 135 isolados de *M.*

*bovis* a partir de lesões tipo tuberculosas encaminhadas para análise laboratorial. Do total de isolados o autor tipificou sete estirpes por *spoligotyping*. Os perfis encontrados refletem dados da literatura e corroboram com resultados encontrados neste trabalho, com perfis considerados típicos para a América do Sul, sendo eles, a ausência dos espaçadores 3, 9, 16 e 39 a 43, sendo o grupo GS 2 neste trabalho.

É difícil estimar qual perfil é mais predominante em cada região do Estado de Minas Gerais, baseando-se no *spoligotyping*, já que este trabalho foi um dos pioneiros para o Estado e na literatura poucos perfis foram descritos. O trabalho de Zanini et al. (2001), embora bastante recente, tipificou por *spoligotyping* um número reduzido de isolados, apenas sete de um total de 135.

Foram encontrados, consultando o banco de perfis disponível na internet, perfis de *M. bovis* do Brasil comuns em outros países,

principalmente da Europa. O perfil GS 1, GS 5 e GS 7, conforme Tabela 7, já foram isolados na Holanda, Espanha, Camarões e descrito como comum na América do Sul. O perfil GS 2 em Minas Gerais (Brasil), Bélgica e descrito como comum na América do Sul. Os perfis GS 3, GS 6 e o perfil individual da estirpe 183 deste trabalho já foram isoladas na Bélgica, o perfil GS 8 e o perfil individual da estirpe 40 na França. O perfil das estirpes individuais 19 e 39 já foram isoladas na Venezuela e os perfis individuais 57 e 19 na Argentina.

Segundo Feldman (1955) desde o Brasil colônia há importação de bovinos para o Brasil, principalmente da Europa e nas décadas de 20 e 30 esta atividade intensificou-se. Nesta época não se fazia teste alérgico nos animais e em Minas Gerais as primeiras tuberculinizações se iniciaram no ano de 1937. Dessa forma, acredita-se que animais infectados tenham entrado no país neste período.

Tabela 7: Grupos de perfis e perfis individuais de *M. bovis* estabelecidos pelo *spoligotyping*, isolados de lesões tipo tuberculosas de bovinos encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002, provenientes do Estado de Minas Gerais e de outras regiões brasileiras e suas distribuições no Mundo.

Perfil	Distribuição no mundo
GS 1, GS 5, GS 7	Holanda, Espanha, Camarões, América do Sul
GS 2	Minas Gerais (Brasil), Bélgica, América do Sul
GS 3, GS 6	Bélgica
GS 8	França
Estirpes 19 e 39	Venezuela
Estirpes 57, 19	Argentina
Estirpe 40	França
Estirpe 183	Bélgica

Baseando-se neste estudo, o *spoligotyping* foi útil para avaliação da epidemiologia molecular dos isolados, permitindo um estudo em maior escala dos perfis de *M. bovis*.

O MIRU-VNTR, aplicado as 65 estirpes de *M. bovis* dos diferentes municípios de Minas

Gerais e outras regiões brasileiras, demonstrou 19 diferentes perfis moleculares sendo que oito foram distribuídos em grupos denominados neste trabalho de GM. Os perfis dos grupos estabelecidos pelo MIRU-VNTR estão apresentados na Tabela 8.



Tabela 8: Perfis dos grupos (GM) estabelecidos pelo MIRU-VNTR de estirpes de *M. bovis* do Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.

Grupo	Perfil
GM 1	142324253322
GM 2	242224153322
GM 3	242224263322
GM 4	242226233322
GM 5	242324243322
GM 6	242324252422
GM 7	242324253322
GM 8	242326233322

Tabela 9 apresenta a distribuição dos perfis estabelecidos pelo MIRU-VNTR com o número de isolados em cada perfil das estirpes de *M. bovis* trabalhadas neste experimento. As estirpes com perfis que não foram agrupados foram denominadas de estirpes com perfis individuais.

Tabela 9: Distribuição dos perfis estabelecidos pelo MIRU-VNTR nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras com o número de isolados em cada perfil, obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.

Grupo	Nº isolados	Região
GM 1	02	Central
GM 2	02	Sul e Zona da Mata
GM 3	02	Central, Zona da Mata
GM 4	13	Central, Triângulo Mineiro, Zona da Mata, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul
GM 5	06	Zona da Mata, Central, Rio Doce, Centro Oeste
GM 6	04	Sul, Triângulo Mineiro
GM 7	17	Sul, Central, Triângulo Mineiro, Centro Oeste, Zona da Mata, Amazonas, Distrito Federal
GM 8	08	Central, Centro Oeste, Sul
Perfis individuais	11	Central, Triângulo Mineiro, Sul, Centro Oeste

Conforme Tabela 9, os perfis GM 4 e GM 7 foram encontrados em regiões do Estado de Minas Gerais como também em outras regiões brasileiras. O perfil GM 4 foi encontrado nas regiões Central, Triângulo Mineiro, Zona da Mata de Minas Gerais e nos Estados de Santa Catarina e Mato Grosso do Sul. O perfil GM 7 foi encontrado nas regiões Sul, Central, Triângulo Mineiro, Centro Oeste e Zona da Mata e em regiões do Amazonas e Distrito Federal sugerindo nestes casos, conforme observado na análise feita no *spoligotyping*, movimentação de animais dentro do país.

Analisando os perfis circulantes nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, com base na análise de perfis feita pelo MIRU-VNTR, tem-se para a região Central, conforme Tabela 10, a predominância dos perfis GM 1, GM 3, GM 4, GM 5, GM 7 e GM 8, no Triângulo Mineiro os perfis GM 4, GM 6 e GM 7, no Centro Oeste os perfis GM 5, GM 7 e GM 8, na região Sul GM 2, GM 6, GM 7 e GM 8, na Zona da Mata os perfis GM 2, GM 3, GM 4, GM 5 e GM 7 e Rio Doce apenas o perfil GM 5, neste caso, única amostra positiva desta região. Para todas as regiões observa-se maior diversidade de perfis circulantes quando comparado com o *spoligotyping*. Observando os agrupamentos de perfis obtidos no MIRU-VNTR, torna-se difícil estabelecer com confiança a predominância de cada perfil em regiões específicas no Estado de Minas Gerais utilizando resultados deste trabalho.

Tabela 10: Perfis das estirpes de *M. bovis* circulantes nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais determinados pelo MIRU-VNTR, obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.

Região	Perfil (s)
Central	GM 1, GM 3, GM 4, GM 5, GM 7, GM 8
Triângulo Mineiro	GM 4, GM 6, GM 7
Centro Oeste	GM 5, GM 7, GM 8
Sul	GM 2, GM 6, GM 7, GM 8
Zona da Mata	GM 2, GM 3, GM 4, GM 5, GM 7
Rio Doce	GM 5

A diversidade alélica é um bom indicador da taxa de heterogeneidade da estirpe e um bom indicador do poder discriminatório do *locus* em estudo. A diversidade alélica varia entre 0,00 e 1,00 e quanto mais próximo de 1,00 maior é o poder discriminatório do *locus* avaliado. Os resultados da diversidade alélica estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Diversidade alélica em cada *locus* do MIRU-VNTR, avaliados em 65 estirpes de *M. bovis* do Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras obtidas de lesões tipo tuberculosas, encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002.

<i>Locus</i>	Diversidade alélica
MIRU-VNTR 2	0.07
MIRU-VNTR 4	0.01
MIRU-VNTR 10	0.00
MIRU-VNTR 16	0.44
MIRU-VNTR 20	0.02
MIRU-VNTR 23	0.48
MIRU-VNTR 24	0.07
MIRU-VNTR 26	0.61
MIRU-VNTR 27	0.13
MIRU-VNTR 31	0.16
MIRU-VNTR 39	0.00
MIRU-VNTR 40	0.05

Baseado neste indicador, apenas o MIRU-VNTR 26 pôde ser designado como altamente discriminatório ( $h > 0,6$ ), os MIRU-VNTR's 16 e 23 foram designados como

moderadamente discriminatórios ( $0,3 \leq h \leq 0,6$ ) e por fim os MIRU-VNTR's 2, 4, 10, 20, 24, 27, 31, 39 e 40 foram fracamente discriminatórios ( $h < 0,3$ ). Estes resultados corroboram com o encontrado por Cowan et al. (2002) e Sola et al. (2003) que descreveram o MIRU-VNTR 26 como o de maior poder discriminatório ( $h > 0,6$ ) e o MIRU-VNTR 16 e 23, como moderadamente discriminatórios ( $h > \text{ou} = 0,48$ ) quando avaliaram estirpes de *M. tuberculosis*. O propósito de se estudar a diversidade alélica dos MIRU-VNTR's tem como objetivo encontrar os *loci* com maior poder discriminatório e então designá-los para teste na rotina de estudos de perfis, reduzindo-se dessa forma mão-de-obra pela utilização de *loci* específicos com poder de diferenciar perfis de estirpes dentro da mesma espécie. Observando os resultados da diversidade alélica, tem-se que apenas os MIRU-VNTR 23 e 26 poderão ser utilizados para discriminar estirpes de *M. bovis* que estiverem em grupos homogêneos, que foram classificados respectivamente, como moderadamente e altamente discriminatórios.

Para fins de comparação entre as técnicas de tipificação molecular avaliadas neste experimento, na Tabela 12 estão apresentadas as estirpes de *M. bovis* com os seus grupos de perfis obtidos pelas técnicas do *spoligotyping* e MIRU-VNTR.

Tabela 12: Estirpes de *M. bovis* isoladas no Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras obtidas de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001 e 2002, com seus respectivos grupos de perfis estabelecidos pelas técnicas do *spoligotyping* e MIRU-VNTR e número de isolados em cada perfil.

Perfil no <i>spoligotyping</i>	Nº isolados (%)	Perfil no MIRU	Nº isolados
GS 1	06	GM 1	02
		GM 7	02
		GM 6	01
		Individual	01
GS 2	02	GM 6	01
		GM 7	01
GS 3	10	GM 7	09
		Individual	01
GS 4	04	GM 8	01
		Individual	03
GS 5	06	GM 4	01
		GM 8	05
GS 6	02	GM 6	02
GS 7	02	GM 7	02
GS 8	03	GM 5	03
GS 9	03	GM 4	02
		Individual	01



As 65 estirpes tipificadas pelo *spoligotyping* apresentaram 36 perfis diferentes sendo nove agrupados (GS), Tabela 12, e quando tipificadas pelo MIRU-VNTR resultaram apenas em 19 perfis diferentes sendo oito distribuídos em grupos (GM).

Perfis anteriormente discriminados pelo *spoligotyping* em perfis individuais, um total

de 27 que corresponde a 41,5% das estirpes trabalhadas, conforme Tabela 13, foram agrupados quando tipificados pelo MIRU-VNTR em GM 2, GM 3, GM 4, GM 5, GM 7, GM 8, demonstrando assim, o menor poder discriminatório desta técnica.

Tabela 13: Estirpes de *M. bovis* isoladas no Estado de Minas Gerais e outras regiões brasileiras isoladas a partir de lesões tipo tuberculosas encaminhadas ao LARA-MG no período de 2001-2002, com seus respectivos grupos de perfis estabelecidos pelas técnicas do *spoligotyping* e MIRU-VNTR e número de isolados em cada perfil.

Perfil no <i>spoligotyping</i>	Nº isolados (%)	Perfil no MIRU	Nº isolados
Individual	27 (41,5)	GM 2	02
		GM 3	02
		GM 4	10
		GM 5	03
		GM 7	03
		GM 8	02
		Individual	05

No Brasil, até o momento, não há publicações de estudos de perfis de *M. bovis* e *M. tuberculosis* por MIRU-VNTR 12 *loci* o que inviabiliza comparação com outros trabalhos. Na Argentina, 18 estirpes brasileiras avaliadas empregando-se o MIRU-VNTR<sup>1</sup>, apresentaram repetições nos MIRU-VNTR'S 2, 16, 24, 26, 39 e 40, semelhantes aos resultados obtidos neste trabalho, além disso, foi observado também o menor poder discriminatório do MIRU-VNTR para os 12 *loci* estudados.

No passado, o genoma do complexo *M. tuberculosis* foi considerado homogêneo. Atualmente, novas técnicas baseadas no polimorfismo de DNA, dentre elas os MIRU-VNTRs *loci*, são considerados valiosas ilhas de polimorfismo que poderão auxiliar na pesquisa da epidemiologia da tuberculose.

A intenção de associar o MIRU-VNTR às análises de tipificação feita pelo método do *spoligotyping* baseou-se em dados da literatura, Roring et al. (2002), Skuce et al. (2002), Sola et al. (2003), que relatam a

necessidade de se combinar duas metodologias de tipagem molecular para se obter melhor confiabilidade da análise dos perfis. Escolheu-se o MIRU-VNTR pois relata-se que esta metodologia poderia ser mais discriminatória que o *spoligotyping* e que juntas seriam boas ferramentas para estudar marcadores genéticos de *M. bovis*. Entretanto, observando os perfis obtidos pela análise numérica com auxílio do programa Excel®, tem-se que esta metodologia apresentou menor capacidade de discriminar grupos homogêneos obtidos no *spoligotyping*. Estes marcadores foram inicialmente desenvolvidos para tipificar isolados de *M. tuberculosis* e talvez por isso não foram tão discriminatórios para *M. bovis*.

Alguns trabalhos com *M. tuberculosis* como o de Kwara et al. (2003), que comparou os métodos de *spoligotyping* e MIRU-VNTR, relata que estirpes epidemiologicamente correlacionadas permanecem agrupadas no MIRU-VNTR, como ocorreu neste trabalho, já que são estirpes de uma mesma região e/ou possuem uma mesma evolução do marcador genético. Uma possível existência da correlação entre as estirpes isoladas em

<sup>1</sup> CATALDI, A. Comunicação pessoal. 2003. (Instituto de Tecnologia Agropecuária – INTA, Argentina)



Minas Gerais, pode ser obtida a partir do trabalho de Belchior (2001), que constatou através da aplicação de um questionário a produtores rurais de diversas regiões do Estado, que 76% dos produtores de um total de 1586 entrevistados, e atualmente 90%, compram bovinos dentro de sua região, e em razão deste fato, o MIRU-VNTR no que se refere aos 12 *loci* estudados, tem menor poder discriminatório, pois trata-se de estirpes epidemiologicamente correlacionadas.

Segundo Sola et al. (2003) a combinação de *spoligotyping* e MIRU-VNTR tem sido considerado as melhores técnicas para tipificação de *M. tuberculosis*. Espera-se uma automação do MIRU-VNTR e simplificação do método, possibilitando a pesquisa de *loci* específicos com maior poder discriminatório para *M. bovis*, já que os 12 MIRU-VNTR *loci* aqui trabalhados, foram padronizados inicialmente para tipificar estirpes de *M. tuberculosis*.

Esses estudos de tipificação molecular visam a melhor compreensão da epidemiologia da tuberculose causada pelo *M. bovis*, servindo como o auxílio a rastreabilidade animal.

No futuro, caso algum perfil, típico de um lugar ("perfil regional"), estabelecido à partir de técnicas moleculares, seja encontrado em outra região, será indicativo de disseminação da estirpe através da movimentação de animais no Estado. Assim, este rastreamento servirá como suporte para as autoridades sanitárias justificarem a necessidade de intensificação do controle de trânsito animal e evitar difusão de estirpes de *M. bovis* de uma região para outra. Há portanto necessidade de mais estudos empregando técnicas moleculares em outras regiões do país, para conhecimento dos perfis de *M. bovis* circulantes em cada região, auxiliando desta forma o PNCEBT.

## 5. CONCLUSÕES

- dentre as lesões estudadas, aquelas provenientes das regiões Central e Sul do Estado de Minas Gerais, apresentaram o maior número de isolamento de *Mycobacterium bovis*;
- nas estirpes estudadas não foi encontrado resistência às principais drogas utilizadas para tratamento da tuberculose humana, sendo elas, estreptomina, rifampicina, etambutol, etionamida e isoniazida;
- baseando-se no perfil molecular, isolados podem ser agrupados por localização geográfica sugerindo associação com origem geográfica e filogenética;
- o *spoligotyping* é mais viável para tipificar estirpes epidemiologicamente correlacionadas e poderá ser ferramenta útil para estudo da epidemiologia de *M. bovis*;
- os 12 MIRU-VNTR *loci* apresentaram menor poder discriminatório para tipificar as estirpes de *M. bovis*;
- os MIRU-VNTR 23 e 26 poderão ser utilizados para discriminar cepas de *M. bovis* que estiverem em grupos homogêneos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P.N., SZYFRES, B. *Zoonoses y enfermedades transmissibles comunes al hombre y los animales*. 2 ed. Whashington: Organization Panamericana de la Salud, 1986.
- ANDRADE, G.B.; CORREA, F.R.; MIELKE, P.V. et al. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.11, n.3-4, p.81-6, 1991.

- ARANAZ, A.; LIEBANA, E.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONZOLEZ, O.; FERRI, E.F.R.; BUNSCHOTEN, A.E.; EMBDEN, J.D.A.; COUSINS, D. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.11, p.2734-2740, 1996.
- BACTERIOLOGIA de la tuberculosis humana y animal: Centro Panamericano de Zoonosis, 1979. (Série de Monografias Científicas y Tecnicas, 11).
- BACTERIOLOGIA de la tuberculosis: Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires, 1988, 63 p.
- BALIAN, S.C. *Estudo de linfadenites tuberculóides em suínos abatidos em matadouros da região da grande São Paulo, no período de 1993 a 1994, aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias*. 1995. (Dissertação, Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo.
- BAPTISTA, F. *Tuberculose e outras causas de condenação de bovinos em frigoríficos de Minas Gerais*. 1999. (Tese, Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Medicina Veterinária da UFMG.
- BARON, E.J.; PETERSON, L.R.; FINEGOLD, S.M. *Diagnostic Microbiology*, 9 ed. St. Louis: Mosby, 1994. Cap.42: Mycobacteria, p. 590-633.
- BARRY, T.; GLENNON, M.; SMITH, T. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR probe methods. *Veterinary Record*, v.132, n.1, p.66-7, 1993.
- BELCHIOR, A.P. *Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais*. 2001. (Dissertação Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Medicina Veterinária da UFMG.
- BOUVET, E.; CASALINO, E.; MENDOZA-SASSI, G. et al. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV-infected: a case-control study. *AIDS*, v.7, n.11, p.1453-60, 1993.
- BRASIL. Decreto nº24.548 de 03 de julho de 1934. Regulamento do serviço de defesa sanitária animal. Cap. VI, art. 63, p.9.
- BRASIL. Lei nº 569, de 21 de dezembro de 1943, art. 3, p.27.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº2, 10 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de janeiro de 2001.
- CLIFTON-HADLEY, R.S. Badgers, bovine tuberculosis and the age of reason. *British Veterinary Journal*, v.152, n.3, p.243-245, 1996.
- COLLINS, D.M.; RADFORD, A.J.; LISLE, G.W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1, p.83-94, 1994.
- COUSINS, D.V.; WILLIAMS, S.N.; ROSS, B.C. et al. Use of a repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v.37, n.1, p.1-17, 1993.
- COWAN, L.S.; MOSHER, L. DIEM, J.P.; MASSEY, J. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal Clinical Microbiology*, n.40, n.1, p.1592-1602, 2002.
- DANKNER, W.M.; WAECKER, N.J.; ESSEY, M.A. et al. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Veterinary Medicine*, v.72, n.1, p.11-37, 1993.



- FALKINHAM, J.O. Epidemiology of infection by nontuberculosis mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v.9, n.2, p.177-215, 1996.
- FELDMAN, J. *Tuberculose humana de origem bovina: contribuição ao seu estudo no Estado de Minas Gerais*. 1955. (Tese Doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais.
- FESTENSTEIN, F.; GRANGE, J.M. Tuberculosis and the acquired immune deficiency syndrome: a review. *Journal of Applied Bacteriology*, v.71, n.1, p.19-30, 1991.
- FISANOTTI, J.C.; ALITO, A.; BIGI, F.; LATINI, O. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from South America. *Veterinary Microbiology*, v.60, n.2, p.251-257, 1998.
- FLAMAND, J.R.B.; GRETH, A.; HAAGSMA, J. et al. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of arabian oryx (*Oryx leucoryx*): diagnosis and monitoring. *Veterinary Record*, v.134, n.3, p.115-8, 1994.
- GRANGE, J.M.; COLLINS, J.D.; O'REILLY, L.M. et al. Identification and characteristics of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle, badgers and deer in the Republic of Ireland. *Veterinary Journal*, n. 43, n.2, p.33-5, 1990.
- GRANGE, T.L. The biology of the genus *Mycobacterium*. *Journal of applied bacteriology*, v.81, n.2, p.1-9, 1996.
- GRETH, A.; FLAMAND, J.R.B.; DELHOMME, A. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of arabian oryx (*Oryx leucoryx*): management. *Veterinary Record*, v.134, p.165-7, 1994.
- HINES, M.E.; KREEGER, J.M.; HERRON, A.J. Mycobacterial infections of animals; pathology and pathogenesis. *Laboratory Animal Science*. v.45, n.4, p.334-351, 1995.
- KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; AGTERVELD, M.; SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; van EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.2, p.907-914, 1997.
- KANTOR, I.N.; LESSLIE, I.W. Aislamiento de mutantes resistentes a drogas antituberculosas en estirpes salvajes de *M. bovis*. *Medicina Veterinaria*, v.34, n.2, p. 244-8, 1974.
- KANTOR, I.N.; RITACO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean current status, control and eradication programs. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1, p.5-14, 1994.
- KWARA, A.; SCHIRO, R.; COWAN, L.S. Evaluation of the elidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.6, p.2683-2685, 2003.
- LAFOURCADE-NJANPOP, B.M.; INWALD, J.; OSTYN, A.; DURAND, B.; HUGHES, S.; THOREL, M.F.; HEWINSON, G.; HADDAD, N. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.1, p.222-227, 2001.
- LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; OLIVEIRA, J. Tratamento da tuberculose bovina com isoniazida. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.1, n.1, p.1-6, 1981.
- LANGENEGGER, J.; LEITE, G.O.; OLIVEIRA Jr., J. Tratamento intermitente da tuberculose bovina com isoniazida. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.11, n.3-4, p.55-9, 1991.
- LA TUBERCULOSIS bovina en la Republica Argentina: Comision Nacional de Zoonosis, 1982.

MEIRELLES NETO, J.R. *Atividade tuberculocida de detergentes catiônicos*. 1982. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

MANUAL de bacteriologia de tuberculose. 2. ed. Rio de Janeiro: Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga, 1994.

MOTA, P.M.P.C *Estudo da esofagostomose como fator predisponente de reações alérgicas inespecíficas da tuberculose bovina*. 1985. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia) - Escola de Veterinária UFMG.

MOTA, P.M.P.C. *Tuberculose bovina: diagnóstico e controle*. 2003. (Tese, Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Medicina Veterinária da UFMG.

NOLTE, F. S.; METCHOCK, B. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P.R. *Manual of Clinical Microbiology*. 6 Ed. Washington: ASM, 1995. p. 400-437.

OREILLY, L.M., DABORN, C.J. The Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuberculosis Lung Diseases*, v.76, n.1, p.1-46, 1995.

PAULA, A. Tuberculose: ontem, hoje e amanhã. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v.55, p.74-100, 1988.

PENHA, A.M.; AMARAL, L.B.S. Métodos de erradicação da tuberculose bovina para países subdesenvolvidos. *Biológico*, v.29, n.1, p.41-45, 1963.

PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *Journal of Comparative Pathology*, v.99, n.1, p.357-99, 1988.

RAVIGLIONE, M.C.; SNIDER, D.E.; KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosids: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *Journal of American Medical Association*, v.273, n.2, p.220-6, 1995.

ROBERTS, G.D., KONEMAN, E.W., KIM, Y.K. *Mycobacterium*. In: BALOWS, A. *Manual of clinical microbiology*. 5 ed. Washington: ASM, Cap. 34, 1991.

RORING, S.; SCOTT, A.; BRITAIN, D. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using exact tandem repeats and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.6, p.2126-2133, 2002.

ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A.B.; PAULA, A. et al. Tuberculose. In: Tarantino, A.B. *Doenças Pulmonares*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.p.233-97.

SEPKOWITZ, K.; RAFFALLI, J.; RILEY, L. Tuberculosis in the AIDS era. *Clinical Microbiology Review*, v.8, n.2, p.180-199, 1995.

SKUCE, R.A.; BRITAIN, D.; HUGHES, M.S. et al. Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal Clinical Microbiology*, v.32, n. 2, p.2387-92, 1994.

SKUCE, R. A.; MCCORRY, T.P.; MACCARROLL, J.F.; RORING, S.M.M.; SCOTT, A. N.; BRITAIN, D.; HUGHES, S.L.; HEWINSON; NEILL, S.D. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, v.148, n. 1, p.519-528, 2002.

SOLA, C.; FILLIOL, I.; GUTIERREZ, M.C.; MODROUSOV, I.; VINCENT, V.; RASTOGI, N. Spoligotype database of *M. tuberculosis*: Biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Journal of Molecular Evolution*, v.7, n.3, p. 390-396, 2001.



SOLA, C.; FILLIOL, I.F.; LEGRAND, E.; LESJEAN, S.; LOCHT, C.; SUPPLY, P.; RASTOGI, N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRU-VNTR's: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, v.3, n.1, p.125-133, 2003.

SUAZO, F.M.; RUÍZ, V.B.; CASILLAS, C.R. Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, v.55, n.2, p. 255-264, 2002.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, v.36, p.762-771, 2000.

Van EMBDEN, J.D.A., CAVE, M.D., CRAWFORD, J.T. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.1, p.406-409, 1993.

Van EMBDEN, J.D.A.; SCHOOLS, L.M.; van SOOLINGEN, D. Molecular techniques: applications in epidemiologic studies. In: Thoen, C. O.; Steele, J. H. (Ed). *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Ames: Iowa State University, 1995. p.15-27.

WAYNE, L.G.; KUBICA, G.P. The mycobacteria. In: SNEATH, P.H.A.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 8 ed., Baltimore: Williams e Wilkins, 1986. v.2, p. 1435-1437.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; FIORAVANT, R.L., ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A.; SALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.6, p.809-813, 2001.

ZANINI, M.S. Polimorfismo de DNA em *Mycobacterium bovis* e sensibilidade à isoniazida no Brasil. 2002. (Tese Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da UFMG.

ZUMARRAGA, M.J.; MARTIN, C.; SAMPER, S. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* – related infections in south America. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.2, p.296-303, 1999.

ANEXO

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA/MG Setor de Tuberculose
<b>Formulário de encaminhamento de amostras para diagnóstico</b>

Espaço reservado para o LARA/MG Cond. na recepção: ( ) Congelada ( ) Resfriada ___/___/___ ( ) Satisf. ( ) Insatisf.	BI n.º: ___/___/___ Data receb.: Receb. por:
---	--

**I – DADOS DO REMETENTE**

1. Local: \_\_\_\_\_

2. Registro: \_\_\_\_\_ (este campo destina-se à peças originárias de matadouros sob Insp. Federal, Estadual ou Municipal)

3. Endereço:

Rua, Av.: \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_

Complemento: \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

Correio eletrônico: \_\_\_\_\_

**II – DADOS DA AMOSTRA**

1. Origem do animal (propriedade, localização, município):  
 \_\_\_\_\_

2. Espécie animal: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

3. Raça: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

4. Animal tuberculinizado: ( ) Sim Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado\*:  $\Delta$  B: \_\_\_\_\_ mm  
 $\Delta$  Av: \_\_\_\_\_ mm  
 ( ) Não  
 ( ) Não se sabe

5. O animal foi: ( ) Sacrificado Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 ( ) Encontrado morto Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 ( ) Abatido (matadouro) Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

6. Outras mortes ou casos na propriedade: ( ) Sim mesma espécie animal? \_\_\_\_\_  
 ( ) Não

7. Histórico: \_\_\_\_\_

8. Destino da carcaça: ( ) cond. total ( ) cond. parcial ( ) destruição na propriedade

9. Peça anatômica enviada ao laboratório: \_\_\_\_\_

10. Nº Lacre: \_\_\_\_\_

11. Responsável pela colheita: \_\_\_\_\_ CRMV: \_\_\_\_\_

12. Data da colheita: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

13. Encaminhamento ao laboratório: ( ) Congelada ( ) Resfriada

Obs.:

\*  $\Delta$  B: diferença em mm após 72h da inoculação da PPD bovina  
 $\Delta$  Av: diferença em mm após 72h da inoculação da PPD aviária