

Marcos Santos Zanini

**POLIMORFISMO DE DNA EM *Mycobacterium bovis* E SENSIBILIDADE À  
ISONIAZIDA NO BRASIL**

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

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária - UFMG**  
**2002**

---

Z31p  
2002

Zanini, Marcos Santos, 1956-

Polimorfismo de DNA em Mycobacterium bovis e sensibilidade à isoniazida no Brasil / Marcos Santos Zanini. - Belo Horizonte: UFMG-Escola de veterinária, 2002.

59p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Polimorfismo (Genética) - Teses. 3. Tuberculose em bovino - Teses. 4. Micobactérias - Teses. I. Título.

CDD - 636.089 699 5

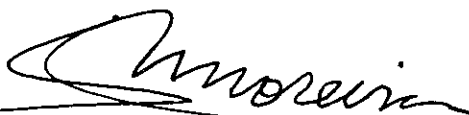
Tese defendida e aprovada em 11 de janeiro de 2002, pela Comissão Examinadora constituída

por:



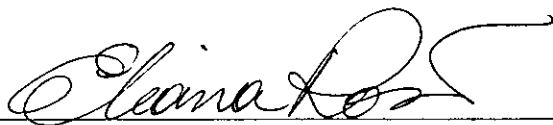
---

Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo  
(Orientador)



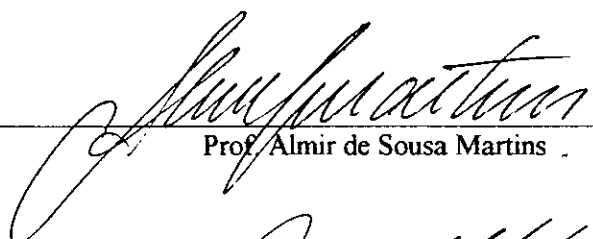
---

Prof. Elvio Carlos Moreira



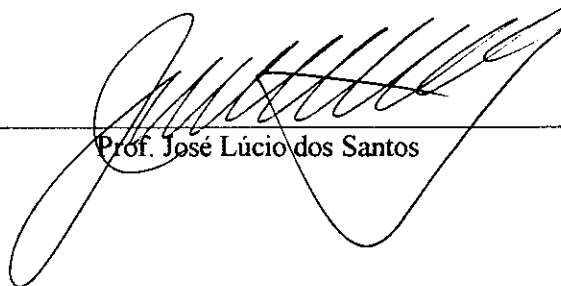
---

Dra. Eliana Roxo



---

Prof. Almir de Sousa Martins



---

Prof. José Lúcio dos Santos

## **Agradecimentos**

A Deus e a meus entes queridos que já se foram pela proteção e vida nos milhares de quilômetros percorridos nas estradas da região sudeste do Brasil durante estes últimos seis anos.

Ao povo brasileiro que, da escola primária ao curso de pós-graduação, subvencionou meu crescimento intelectual.

À minha família, Surama, Júlio, Felipe, Arthur, Ruth e Dante pelo estímulo e compreensão, privados de dias e dias de nosso convívio diário em favor do empreendimento deste trabalho.

A meu pai, Flávio José Zanini, por sempre me encorajar a enfrentar novos desafios.

À minha banca examinadora de tese, pela contribuição amigável e precisa na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Salas, meu orientador, pela dedicação e abertura do mundo da biologia molecular.

Ao Prof. Élvio, por haver constantemente mostrado o caminho da coerência e habilidade em transpor os obstáculos.

À acadêmica de Medicina Veterinária - UFMG, Liz Adhara Naveda, pela disposição e preocupação constante em ajudar e dar continuidade a este trabalho.

À Dra. Eliana Roxo, Instituto Biológico – SP, por haver me acolhido e apoiado em momentos difíceis deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Sylvia Leão e a bióloga Rosangela, Escola Paulista de Medicina, pela cooperação, carinho, atenção e amizade sempre demonstrados ao longo deste trabalho.

Ao bioquímico Cláudio José Augusto e sua equipe, responsáveis pelo Setor de Tuberculose, Instituto Eziquiel Dias, Governo do Estado de Minas Gerais, pelo inestimável apoio a este trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz, que através das doutoras Lucilene Ferrazoli e Maria Alice Telles, cooperaram pacientemente em meu aprendizado de técnicas e confirmação de resultados deste trabalho.

À Escola de Medicina Veterinária – UFMG, seus professores e funcionários, particularmente as meninas da secretária da Pós-graduação, que me acolheram tão carinhosamente durante estes últimos seis anos e me propiciaram desenvolver este trabalho.

Ao Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFMG, seus professores e funcionários, que me permitiram uma vivência eclética do mundo das ciências biológicas.

Ao Serviço de Inspeção Federal – SIF e Laboratório de Referência Animal – Pedro Leopoldo, Ministério da Agricultura e do Abastecimento pelo apoio no fornecimento e processamento de amostras.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG que cumprem histórica função no desenvolvimento da pesquisa em nosso País.

## **Agradecimentos**

A Deus e a meus entes queridos que já se foram pela proteção e vida nos milhares de quilômetros percorridos nas estradas da região sudeste do Brasil durante estes últimos seis anos.

Ao povo brasileiro que, da escola primária ao curso de pós-graduação, subvencionou meu crescimento intelectual.

À minha família, Surama, Júlio, Felipe, Arthur, Ruth e Dante pelo estímulo e compreensão, privados de dias e dias de nosso convívio diário em favor do empreendimento deste trabalho.

A meu pai, Flávio José Zanini, por sempre me encorajar a enfrentar novos desafios.

À minha banca examinadora de tese, pela contribuição amigável e precisa na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Salas, meu orientador, pela dedicação e abertura do mundo da biologia molecular.

Ao Prof. Élvio, por haver constantemente mostrado o caminho da coerência e habilidade em transpor os obstáculos.

À acadêmica de Medicina Veterinária - UFMG, Liz Adhara Naveda, pela disposição e preocupação constante em ajudar e dar continuidade a este trabalho.

À Dra. Eliana Roxo, Instituto Biológico – SP, por haver me acolhido e apoiado em momentos difíceis deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Sylvia Leão e a bióloga Rosangela, Escola Paulista de Medicina, pela cooperação, carinho, atenção e amizade sempre demonstrados ao longo deste trabalho.

Ao bioquímico Cláudio José Augusto e sua equipe, responsáveis pelo Setor de Tuberculose, Instituto Eziquiel Dias, Governo do Estado de Minas Gerais, pelo inestimável apoio a este trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz, que através das doutoras Lucilene Ferrazoli e Maria Alice Telles, cooperaram pacientemente em meu aprendizado de técnicas e confirmação de resultados deste trabalho.

À Escola de Medicina Veterinária – UFMG, seus professores e funcionários, particularmente as meninas da secretária da Pós-graduação, que me acolheram tão carinhosamente durante estes últimos seis anos e me propiciaram desenvolver este trabalho.

Ao Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFMG, seus professores e funcionários, que me permitiram uma vivência eclética do mundo das ciências biológicas.

Ao Serviço de Inspeção Federal – SIF e Laboratório de Referência Animal – Pedro Leopoldo, Ministério da Agricultura e do Abastecimento pelo apoio no fornecimento e processamento de amostras.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG que cumprem histórica função no desenvolvimento da pesquisa em nosso País.

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO</b> .....	11
	<b>ABSTRACT</b> .....	12
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2.	<b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....	13
2.1	Protocolos utilizados para identificar e caracterizar <i>M. bovis</i> .....	13
2.2	Resistência do gênero <i>Mycobacterium</i> aos antibióticos.....	14
2.3	Métodos moleculares para identificação de <i>M. bovis</i> .....	16
3.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1	Identificação de <i>M. bovis</i> em lesão tipo tuberculosa (LTTs).....	18
3.2	Identificação molecular de micobactéria sensível e resistente a INH..	19
3.2.1	Extração de DNA.....	19
3.2.2	PCR.....	21
3.2.3	Protocolos de RFLP utilizados.....	22
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	25
4.1	Identificação de <i>M. bovis</i> em tecido com lesão tipo tuberculosa .....	25
4.2	Crescimento em meio de cultura 7H11 contendo 0,1 µg/ml de INH...	25
4.3	Extração de DNA do Complexo <i>M. tuberculosis</i> com tiocianato de guanidina e PCR diretamente da LTTs.....	25
4.4	Polimorfismos genômicos observados.....	26
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	35
5.1	Identificação de <i>M. bovis</i> em tecido com lesão tipo tuberculosa	35
5.2	Crescimento em meio de cultura 7H11 contendo 0,1 µg/ml de INH...	36
5.3	Extração de DNA do Complexo <i>M. tuberculosis</i> com tiocianato de guanidina e PCR diretamente de LTTs	38
5.4	Polimorfismos genômicos.....	39
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	41
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
	<b>ANEXOS</b> .....	47

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Lesões tipo tuberculose (LTTs) coletadas e analisadas entre agosto/1998 e novembro 2000.....	22
Tabela 2 - Resistência de amostras INH resistentes frente à outros antibióticos	30
Tabela 3 - Frequência de polimorfismos de DNA pelo <i>spoligotyping</i> em 35 amostras de <i>M. bovis</i> .....	30

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Comparação de DNA extraído e pós-digestão com <i>PvuII</i> , <i>AluI</i> frente ao marcador de peso molecular, Lambda DNA – <i>Hind III</i>	29
Figura 2 - Seleção de polimorfismos de DNA em <i>M. bovis</i> observados com <i>spoligotyping</i> .....	31
Figura 3 - Seleção de polimorfismos em 60 DNAs de <i>M. bovis</i> digerido com <i>PvuII</i> e hibridizados com sonda IS6110.....	31
Figura 4 - A-B: Polimorfismos em 60 DNAs de <i>M. bovis</i> digerido com <i>AluI</i> e hibridizados com sonda PGRS.....	32
Figura 5- Polimorfismos de DNA resultantes de digestão com <i>AluI</i> e hibridização com sonda PGRS de amostras <i>M. bovis</i> INH-resistentes.....	33
Figura 6 - Identificação de <i>M. bovis</i> por PCR a partir de DNA extraído com tiocianato de guanidina x cultivo em meio LJ.....	34
Figura 7 - Número de fragmentos observados no RFLP-PGRS x número de amostras hibridizadas.....	34

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

µl: microlitro  
µg: microgramas  
ng: nanograma  
bp: pares de bases nucleotídicas  
C: citosina  
CTAB: hexadecyl trimethyl ammonium bromide  
dATP: desoxiadenosina tri-fosfato  
dCTP: desoxicitidina tri-fosfato  
dGTP: desoxiguanosina tri-fosfato  
DNA: ácido desoxirrinucleico  
DR: direct repeat  
*E. coli*: *Escherichia coli*  
dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfato  
dTTP: desoxitimidina tri-fosfato  
EDTA: etilene-diamina-tetra-acetato  
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
G: guanina  
g: gravidade  
INH: hidrazida do ácido isonicotínico  
IS: Insertion Segment  
Kb: kilobases  
kDa: quilodalton  
LARA-MA: Laboratório de Referência Animal-Ministério da Agricultura  
LJ: meio de cultura Löwenstein-Jensen  
LTTs: lesões tipo tuberculosas  
M: molar  
*M. avium*: *Mycobacterium avium*  
*M. bovis*: *Mycobacterium bovis*  
*M. intracellulare*: *Mycobacterium intracellulare*  
*M. leprae*: *Mycobacterium leprae*  
*M. paratuberculosis*: *Mycobacterium paratuberculosis*  
*M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*  
mg: miligrama  
min: minutos  
mL: mililitro  
mM: milimolar  
nm: nanômetros  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PCI: fenol-clorofórmio-isoamil  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PGRS:  
PNCEBT: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal  
PPD: Derivado Protéico Purificado  
qsp: quantum satis  
EDTA: dissódio etilenediaminatetra-acetato  
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism  
RNA: ácido ribonucléico  
T: timina  
Taq: *Thermus aquaticus*  
TBE: Tris-borato-EDTA  
TE: Tris-EDTA  
TLLs: tuberculous-like lesions



Tris-HCl: Tris (hydroxymethyl) aminomethane  
tRNA: ácido ribonucleico transportador  
U: unidade  
UTP: uridina-tri-fosfato  
u.v: luz ultravioleta  
∞: incontável  
<: menor  
>: maior  
%: porcentagem  
°C: graus centígrados

## RESUMO

Foram identificadas por PCR e testes microbiológicos 163 amostras de *Mycobacterium bovis* isoladas de 254 lesões tipo tuberculosas (LTTs) provenientes de diferentes bovinos abatidos em matadouros. Repiques da cultura das 163 amostras foram sementeadas em meio de cultura 7H11 contendo 2 µg/mL isoniazida, sendo observado o crescimento de quatro amostras. Uma fração (n=54) das LTTs tiveram o DNA da micobactéria extraído diretamente do tecido pelo uso de tiocianato de guanidina 5M, resultando em 70,3% (n=38) de positivos para o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* identificados por PCR. O isolamento do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* do grupo (n=54) de LTTs por cultivo microbiológico foi de 42,5% (n=23). Uma outra fração das amostras (n=60), incluindo as amostras resistentes à isoniazida, foi submetida a testes de genotipagem, DR-*spoligo*typing, IS6110-RFLP e PGRS-RFLP observando-se polimorfismos já relatados na literatura e outros ainda não observados. Os testes de genotipagem realizados não demonstraram perfis exclusivos para o DNA das amostras resistentes à isoniazida.

Palavras-chave: identificação de *Mycobacterium bovis*, polimorfismo de DNA, resistência à isoniazida, Brasil.

## ABSTRACT

Identification of 163 samples of *Mycobacterium bovis* by PCR and microbiological tests were carried out on 254 tuberculous-like lesions (TLLs) collected in cattle during slaughter. Isoniazid resistance was investigated on positive cultures (163) by subculturing in 7H11 media containing 2 mg/mL isoniazid. Four isolates grew under this condition. A group of TLLs (n=54) had their DNA isolated and analyzed by PCR in the presence of  $\alpha$ -casein into the 5M thiocyanate extraction mix. The PCR was positive for *Mycobacterium Complex tuberculosis* in 70,3% (n=38) of these samples. Primary isolation by culture of the Complex *Mycobacterium tuberculosis* in the same group (n=54) of TLLs was positive in 42,5% (n=23) of the samples. Another group of samples (n=60), including those resistant to isoniazid, were submitted to genotyping analysis by DR-*spoligotyping*, IS6110-RFLP and PGRS-RFLP. Several polymorphisms were observed, some of them new others already described in the literature. The genotype analysis did not demonstrate exclusive profiles for DNA of the isoniazid resistant samples.

Key words: *Mycobacterium bovis* identification, DNA polymorphism, isoniazid resistant, Brazil

## 1 – INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina, causada pela espécie *Mycobacterium bovis* pertence classicamente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, onde se incluem o *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium africanum* (Goh et al., 2001). A tuberculose bovina, epidemiologicamente, classifica-se como uma zoonose, sendo uma enfermidade de ocorrência mundial, que determina prejuízos à pecuária e riscos à saúde da população que consome produtos de origem animal ou que tem contato direto com animais infectados.

Reis (1965), em “Controle da tuberculose bovina em alguns países”, cita conclusões do Comitê de Expertos em Tuberculose da OMS (Genebra, 1950), “o Comitê reconhece o sério problema que representa a infecção humana de origem bovina, nos países onde esta enfermidade prevalece no gado. Há perigo de que a infecção se transmita por contacto direto entre os animais enfermos e os trabalhadores rurais e suas famílias, assim como, através de produtos alimentícios contaminados. A diminuição da tuberculose bovina contribui para elevar os níveis econômicos e de nutrição de um país, devido ao melhoramento da qualidade do leite e a produtividade do rebanho”. Seguem-se, no mesmo texto, observações do “I Simpósio Internacional sobre Erradicação da Tuberculose Bovina”, reunindo especialistas de 20 países (Madrid, 1954) “a profilaxia (da tuberculose) pode abranger de início rebanhos ou regiões, mas deve alcançar a totalidade do gado. As condições variam profundamente em diferentes países e a experiência demonstrou que podem ser empregados programas diferentes, adaptados às necessidades locais”. Comparando-se as mais diversas observações deste texto que descreve medidas tomadas internacionalmente para controle da tuberculose bovina desde 1898 (Dinamarca) com o atual “Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT” recentemente publicado (D.O.U 16/01/2001), veremos uma grande identidade entre intenções e formas de ação, destacando sempre a importância de aspectos epidemiológicos da doença e a persistência de medidas de consenso instituídas junto a uma insubstituível vontade política. Assim, sem esquecer nossa realidade

agropecuária e observando Programas de Controle e Erradicação da Tuberculose Bovina em países onde a bovinocultura possui relevância econômica (Austrália, EUA, Nova Zelândia) apresentamos, como ferramenta indispensável neste processo, o aperfeiçoamento e aferição dos métodos de diagnóstico dessa doença envolvendo técnicas de biologia molecular voltadas ao rastreamento epidemiológico.

## 2 – LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Protocolos microbiológicos utilizados para identificar e caracterizar o *Mycobacterium bovis*

#### *Baciloscopia*

A baciloscopia direta é o método mais rápido e barato para diagnóstico de micobacterioses permitindo identificar a característica álcool ácido resistente da micobactéria pela coloração pelo método 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  $10^4$  microrganismos por mL (Sepkowitz et al., 1995) para identificação pela baciloscopia. A fim de identificar o bacilo, indiretamente podem-se utilizar animais de laboratório para inocular líquidos resultantes de extratos suspeitos, como nódulos tuberculoides, tecidos ganglionares e fluidos orgânicos tais como sangue, leite e saliva. Estes animais, ao serem sacrificados, apresentam processos infecciosos locais e ganglionares que, ao exame microscópico por Ziehl-Neelsen ou auramicina-rodamina, podem apresentar bacilos do tipo micobacteriano.

#### *Cultivo em meios nutrientes*

Corner & Nicolacopoulos (1988) e Grange et al. (1996) analisaram os melhores meios de cultura para isolamento primário de *M. bovis* e sugeriram a utilização dos meios de cultura; Löwenstein-Jensen (LJ) com piruvato de sódio, Stonebrink's e Middlebrook 7H11 modificado. Pela incorporação de drogas a estes meios de cultura pode-se diferenciar micobactérias quanto a cepas, 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-doença, porém é um procedimento extremamente

lento que pode levar mais de 2 meses para sua conclusão (Corner, 1994). Ainda duas ou três semanas adicionais são requeridas para a identificação bioquímica das amostras isoladas. A sensibilidade da cultura não é de 100%, e culturas falso-negativas podem ocorrer, pois é necessário de  $\geq 10^3$  organismos viáveis por mililitro de material como concentração mínima para cultivo. Esta concentração nem sempre é possível devido à contaminação dos cultivos por outros microrganismos, sendo necessários processos de descontaminação à base de ácidos (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), álcalis (NaOH) e mucolíticos (duodecil sulfato de sódio-SDS e N-acetil-L-cisteína-NALC). Somam-se a estes processos de perda da viabilidade, as sucessivas centrifugações, necessárias para separar a micobactéria de fluidos orgânicos e descontaminantes que diminuem a concentração do microrganismo a ser cultivado (Sepkowitz et al., 1995). No Brasil, para o *Mycobacterium bovis* após diferentes processos de descontaminação, Zanini et al. (2001), registraram 42,6% de culturas positivas (23 positivos/54 LTTs) e Roxo et al. (1999) em 112 LTTs (lesões tipo tuberculosas), observaram variações entre 5 a 66,66% dependendo do lote de LTTs processada. Em condições controladas de coleta e armazenamento, os melhores resultados de descontaminação e isolamento citados na literatura consultada foram ao redor de 70% de sucesso no isolamento (Liebana et al 1995; Corner, 1994). Existem, ainda, sistemas comerciais (Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, USA) que utilizam meios de cultura incorporados com substâncias radiométricas e drogas seletivas que reduzem o tempo de resultado de identificação e sensibilidade a antibióticos.

## 2.2 Resistência do gênero *Mycobacterium* aos antibióticos

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou entre 1990-1999 uma incidência de tuberculose humana de 88 milhões de casos com 30 milhões de óbitos sem precisar o percentual de casos de *M. bovis*, indicando também média mundial de 4,1% (390 mil pacientes/ano) dos casos de tuberculose humana, como sendo de primo resistência à isoniazida (INH; hidrazida do ácido isonicotínico) em pacientes tuberculosos jamais medicados com qualquer droga antituberculosa (Cohn, et al., 1997). A INH, associada ou não a outros medicamentos, tem

sido a droga de primeira escolha para o tratamento da tuberculose desde 1952. A INH é ativada pela catalase-peroxidase da própria micobactéria, interferindo na biossíntese de ácidos graxos do microrganismo, identificados como um dos fatores de virulência.

A partir de 1954, identificaram-se as primeiras cepas resistentes, associadas à perda de patogenicidade para cobaias e com atividade da catalase negativa (Middlebrook, 1954). Em 1964, Winder demonstrou que a INH agia inibindo a síntese de ácidos graxos de cadeia longa nas micobactérias. Confirmando isto, Banerjee et al. (1994) analisou cepas resistentes e não resistentes, detalhando o mecanismo de ação da INH sobre a via de biossíntese dos ácidos micólicos. Neste mesmo estudo, verificou-se uma mutação por deleção, denominada *inhA*, nos genes de amostras de *M. bovis* e *M. tuberculosis* resistentes comparando com cepas sensíveis à INH de *M. smegmatis*. Posteriormente, a região correspondente ao locus gênico *inhA*, quando não mutante, foi identificado como codificador de uma enoil-ACP redutase, que catalisa uma fase da elongação dos ácidos graxos (Bergler et al., 1994; Dessen et al., 1995), sendo que mutações deste gene determinam alterações na ligação entre a enzima e o cofator NADH. Assim sendo, esta alteração no gene *inhA*, resulta em resistência devido à alteração do locus de ação da INH.

Uma outra característica das micobactérias INH resistentes é associada à perda da atividade da catalase e diminuição da patogenicidade para cobaias, expressada pela deleção total ou parcial do gene denominado *katG*. Isto foi confirmado inicialmente para o *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* (Zhang et al., 1992;1993) em experimentos onde, por transformação, foi inserido este gene em amostras resistentes, tornando-as catalase positivas e patogênicas para cobaia. Posteriormente o mesmo processo é aplicado ao *M. bovis* (Wilson et al., 1995), sendo também esclarecido que a INH necessita da catalase-peroxidase da micobactéria para transformar-se em metabólito ativo contra a própria micobactéria. Concluíram então estes experimentos que, sem o gene que expressa o sistema catalase-peroxidase, não ocorre ativação de INH.

Desta forma, acredita-se que uma alteração no *katG* sempre levará resistência à INH por perda da atividade catalase-peroxidase, e por conseguinte a INH não será ativada para agir na elongação de ácidos graxos da micobactéria. Já uma alteração no gene *inhA* levará também à INH-resistência mas não obrigatoriamente à perda da atividade catalase-peroxidase, demonstrando ser a atividade catalase um indicador parcial da resistência à INH (Wilson et al., 1995).

Posteriormente, Wilson & Collins, (1996), verificaram em uma biblioteca de MBIR (*Mycobacterium bovis* isoniazida resistente) inserida no genoma de *M. smegmatis*, a hiperexpressão de um promotor do gene *ahpC*, envolvido na síntese de antioxidantes tiol-específicos. Esta hiperexpressão envolve uma subunidade da hidropéroxido redutase que desencadeia resistência à INH. Apesar destes avanços, existem 25% de situações de resistência do Complexo *M. tuberculosis* à INH que não estão ainda esclarecidos (Heym et al., 1995).

No Brasil, o Ministério da Saúde, em seu "Manual de Bacteriologia da Tuberculose" (1994) instituiu um protocolo padrão de procedimentos para o diagnóstico da tuberculose e ressalta que a resistência às drogas antituberculosas tem oscilado entre 10-15% das amostras testadas. O trabalho conjunto de diversas instituições envolvidas na epidemiologia da tuberculose no Brasil (Ferrazolli et al., 1995), resultou pesquisa do gene de expressão da catalase (*katG*) em amostras clínicas de *M. tuberculosis* resistentes, assim como estabeleceu sua relação com a MIC (concentração inibitória mínima) para INH. Paralelamente, a Fundação Oswaldo Cruz e instituições internacionais (Morris et al., 1995) verificaram a existência de amostras clínicas de *M. tuberculosis* - MDR (resistente a múltiplas drogas) no Brasil, observando resistência à estreptomicina (genes *rpsL* e *rrs*), rifampicina (gene *rpoB*) e isoniazida (genes *katG* e *inhA*).

A resistência à pirazinamida é característica de *M. bovis* por mutações no gene *pncA* e *OxIR* (Hannan et al., 2001), enquanto a resistência à estreptomicina geralmente está associada à redução da associação do rRNA 16S e a proteína S12 ribossomal (Cooksey et al., 1996).

O método de rotina para avaliar resistência de amostras de micobactérias mais utilizados tem sido o Método da Concentração Absoluta (ou Concentração Inibitória Mínima; MIC) e o Método das Proporções (Collins et al., 1997). No Método das Proporções, diluições da cultura recente do Complexo *M. tuberculosis* são semeadas em meio de cultura com concentração geralmente fixa da droga (0,2 µg/mL de meio de cultura) e avaliadas quanto à proporção de desenvolvimento de colônias de resistentes frente a diluições da mesma cultura em meio de cultura sem droga (Kantor, 1986), já o Método do MIC utiliza concentração fixa da micobactéria e concentrações variadas de droga.

*Resistência do Mycobacterium bovis à isoniazida (INH - hidrazida do ácido nicotínico)*  
Considera-se que o animal tuberculoso constitui a principal fonte e agente mantenedor da infecção no rebanho. A principal forma de transmissão é por via respiratória e, entre as fontes não-respiratórias, a mais comum ocorre em bezerros que se infectam ao mamarem leite infectado. Outras vias, como a cutânea ou a genital, são de ocorrência bastante rara. Em alguns rebanhos leiteiros a doença é endêmica e a transmissão normalmente respiratória, o confinamento predispõe à doença, que, portanto, atinge mais o gado de leite, estabulado, do que o gado de corte, criado em sistema extensivo. A forma mais freqüente da doença é a pulmonar, que se caracteriza por evolução lenta, febre intermitente, tosse, baixa do peso e astenia (Neil et al., 1994). Pode ainda ocorrer a forma intestinal, com diarreia crônica e caquexia em cerca de 10-20% dos casos, e uma forma ganglionar difusa, forma preferencial de apresentação na glândula mamária.

Quanto ao controle no Brasil, onde a doença é endêmica, o Ministério da Agricultura recomenda o método do teste-e-abate (PNCEBT), em que todo animal considerado reativo nas provas de tuberculização deve ser encaminhado ao abatedouro. Desta forma procura-se evitar que os animais infectados desenvolvam a doença e venham a disseminá-la no rebanho bovino e para a população humana rural que maneja diretamente com os animais ou mesmo ingere leite e derivados lácteos não-pasteurizados.

No que se refere às perdas econômicas determinadas por esta enfermidade, além da mortalidade, encontra redução de 10 a 20 % de sua eficiência produtiva, infertilidade e condenação de carcaças. Na Argentina, apenas com a redução na produção de leite, calcula-se um decréscimo de 18% na produção das vacas tuberculosas quando comparadas aos animais sadios (Kantor & Ritacco, 1994). Além disto, produtos derivados de carnes e de leite originários de países onde ocorre a tuberculose não podem ser exportados para países onde esta é controlada, o que determina prejuízos à economia nacional e perda de mercado para as exportações, além de uma menor cotação do produto no mercado internacional.

Os dados da situação atual da tuberculose bovina no Brasil, período de 1989 a 1998, estão registrados no PNCEBT (2001) indicando oficialmente uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, o que demonstra um rebanho bovino em geral saudável quanto a esta enfermidade. Nesta mesma publicação, a epidemiologia da tuberculose bovina desperta maior atenção quando verificamos que, no Estado de Minas Gerais, maior produtor de leite do País, propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e tecnificação da produção registram prevalência de 15% das propriedades com pelo menos um animal positivo para o teste de tuberculinização. Esses dados sugerem um risco de infecção direto de uma população humana numericamente significativa, quer sejam trabalhadores rurais, da indústria de carnes ou veterinários. Na Província de Santa Fé, Argentina, foram constatadas entre 1984 e 1989, percentagens de infecção por *M. bovis* de 2.4 a 6.2, entre os casos de tuberculose humana do período (Kantor & Ritacco, 1994), destacando a infecção de trabalhadores ligados às atividades que envolvem trabalho com bovinos e seus derivados. O controle da tuberculose bovina em regiões endêmicas ou mesmo em regiões controladas necessita o rastreamento epidemiológico de fontes de infecção e caracterização de amostras de maior patogenicidade, sendo a epidemiologia molecular uma ferramenta indispensável para esta avaliação (van Sooling, et al., 1994)

Quanto a cepas de *M. bovis* resistentes à antibioticoterapia, observa-se uma crescente preocupação da literatura com o aumento de

casos desta forma de tuberculose tanto em humanos como em animais. Recentemente, Sechi et al., (2001) observaram multirresistência de cepas de *M. bovis* isoladas de rebanho na Sardenha, Itália, frente às drogas rifampicina e isoniazida, envolvendo os genes *rpoB* para rifampicina e *inhA katG* e *oxyR-ahpC* para isoniazida. A presença de cepas de *M. bovis* primariamente resistentes a drogas antituberculosas na América Latina e seus riscos para saúde pública vêm sendo pesquisadas desde 1974 (Kantor et Lesslie, 1974). No Brasil, estudo isolado com 200 amostras de micobactérias de tuberculose humana, observaram-se sete amostras de *Mycobacterium bovis* (3,5%), sendo três amostras, multirresistentes a drogas antimicobacterianas (Corrêa & Corrêa, 1974). Levantamento de resistência à INH através de amostragem aleatória entre 1985 e 1990 foi realizado pela OMS na América Latina (Lazlo e Kantor, 1994). Verificaram 63 amostras (6,64%) de *M. tuberculosis* resistentes à INH, isoladas entre 948 pacientes tuberculosos. Em estudos experimentais, a eficiência do tratamento com INH em bovinos reagentes a tuberculinização pode atingir até 100% (Leite e Lage, 1999), mas são citados resultados clássicos onde a eficiência varia entre 50% e 96,4% (Langenegger et al., 1991). Mecanismos diversos de resistência do *Mycobacterium bovis* a INH têm sido detectados (Pfyffer, 1999; Slayden e Barry, 2000) em função de casos de *M. bovis* multirresistente à antibioticoterapia em pacientes humanos imunodeprimidos e imunocompetentes (Blázquez et al., 1997; Guerrero et al., 1997; Rivero et al. 2001; Long et al., 1999). Diversos protocolos são envolvidos para rastreamento epidemiológico de amostras resistentes ou amostras de maior virulência, desde técnicas convencionais de isolamento e identificação até protocolos de biologia molecular.

### 2.3 Métodos moleculares para identificação de *Mycobacterium bovis*

#### *Seqüenciamento de ácidos nucléicos*

Recentemente, Gordon et al. (1999) determinou a seqüência do DNA genômico do *M. bovis*. O seqüenciamento constitui-se no melhor método para identificar e determinar alterações genômicas. Entretanto, ainda a maioria dos laboratórios está impossibilitada de executar essa técnica devido a custo elevado, treinamento de

pessoal técnico especializado e sofisticação de equipamentos.

#### *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) e Cromatografia de Camada Delgada.*

É possível a identificação de micobactérias resistentes a antibióticoterapia através da análise de ácidos micólicos. Esse protocolo baseia-se no perfil diferenciado de ácidos micólicos das diferentes cepas e espécies de micobactérias (Garza-González et al., 1997). No Brasil, a cromatografia de camada delgada é utilizada para diferenciação de espécies no Instituto de Química-UNESP, Araraquara, SP (Leite C.Q et al., 1998).

Não se mostram sensíveis o bastante para detectar bacilos álcool-ácidos resistentes diretamente da amostra clínica, uma vez que  $10^5$  microorganismos são necessários para que ocorra a hibridização em condições de rotina (Butcher et al., 1996), o que lhe confere uma sensibilidade próxima à baciloscopia corada pelo método de Ziehl-Neelsen, mas em contrapartida possui alta especificidade quanto à identificação de espécies. Atualmente, as sondas moleculares são componentes da maioria dos processos de biologia molecular que permitem a identificação de particularidades de uma infinidade de microorganismos.

#### *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

A PCR é um método de síntese enzimática *in vitro* que permite a geração exponencial de seqüências gênicas específicas a partir de misturas simples ou complexas de RNA ou DNA. A reação básica tem, como componentes, um DNA que contém uma seqüência específica de nucleotídeos a ser amplificado (DNA molde ou DNA alvo), os 4 desoxirribonucleotídeos trifosfato presentes em excesso, uma DNA polimerase e um par de oligonucleotídeos sintéticos complementares a regiões adjacentes à região a ser amplificada, equilibrados por um tampão adequado. A reação consiste basicamente em uma alteração sucessiva de temperaturas nas quais o DNA será desnaturado, os iniciadores se anelarão a essas fitas desnaturadas e a fita molde de DNA será copiada. Possui sensibilidade variando entre 50% a 100% em função de falhas laboratoriais, mas tem especificidade de 95 a 100% (Noordhoek et al., 1994). O uso da PCR para detecção do Complexo *M. tuberculosis* em

amostras clínicas de pacientes humanos, principalmente em escarro, vêm sendo relatada há alguns anos, e hoje se tornou um dos métodos mais estudados para o diagnóstico das tuberculoses humanas inclusive com apresentação comercial de conjunto de reagentes prontos para uso (kit) denominada Amplicor PCR test (Laboratório Hoffman-La Roche, Inc., USA).

Para identificação do *M. bovis*, a PCR vem mostrando resultados promissores conforme trabalhos em "Anexo" (Zanini et al. 1998a, Genelhu et al., 1998; Zanini et al., 2001) A identificação da micobactéria direto do material clínico utilizando a extração de DNA pelo ticionato de guanidina (Kodavanti et al., 1996; Boom, 1999; Zanini et al., 2001) apresenta-se também como alternativa para um diagnóstico mais rápido.

Para a técnica básica do PCR, Rodriguez et al. (1999) sugeriram iniciadores (primers) da PCR que amplificariam fragmento de 500 pares de base (bp) exclusivo do DNA de *M. bovis*. Mais recentemente, Sechi et al. (2000) verificou que estes primers não amplificavam todas as amostras de *M. bovis*.

#### *Polimorfismo dos Tamanhos de Fragmentos de Restrição (Restriction Fragments Length Polymorphism - RFLP)*

Em estudos epidemiológicos de transmissão da tuberculose, a análise por RFLP tem sido a técnica mais utilizada para o Complexo *M. tuberculosis* (van Soolingen et al., 1994; Romano et al., 1996). Este método utiliza endonucleases de restrição – enzimas que reconhecem seqüências específicas de DNA, cortando-o em fragmentos de diferentes tamanhos. A técnica de RFLP envolve a detecção de fragmentos de restrição específicos pela hibridação com sondas de DNA marcadas. Elementos móveis do DNA, seqüências de inserção (insertion segment, IS) e transposons são utilizados em avaliação epidemiológica molecular e estudos filogenéticos e taxonômicos, pois influenciam no perfil de fragmentos gerados pelas enzimas de restrição (Yeng et al., 1995; Cousins et al 1998). Dependendo do grau de mobilidade e número de cópias destas seqüências, são obtidas "impressões digitais" ou perfis de DNA ("DNA fingerprints") que podem ser utilizadas para inferir relação entre cepas e traçar relação



epidemiológica (Kamerbeek et al., 1997; Kremer et al., 1999). O RFLP, utilizando enzimas de restrição e sondas moleculares tem demonstrado a transmissão horizontal de micobactérias entre animais do mesmo rebanho, assim como, a transmissão de determinada cepa de micobactéria entre diferentes espécies animais que convivem em uma mesma área geográfica (Gutierrez et al., 1997; Costello et al. 1999). A sonda tradicionalmente utilizada para diferenciar cepas de *M. tuberculosis* tem sido a IS6110 que se apresenta com até 20 cópias no genoma desta micobactéria, mas o mesmo não ocorre para o *M. bovis* que geralmente possui uma ou duas cópias de IS6110 (Fomukong, NG et al. 1992; Niemann et al., 1999). Para *M. bovis*, o RFLP seguido da hibridização com sonda rica em Guanina-Citosina-, denominada PGRS (*polymorphic G-C rich repetitive sequence*) têm demonstrado ser o protocolo com maior poder de diferenciação entre amostras. Entretanto, este protocolo demanda 4 ou 5 dias e é extremamente exigente em quantidade de DNA para processamento (Roring et al., 1998). Recomenda-se, para situações de estudos populacionais ou quando se dispõe de pouco DNA extraído, a utilização da técnica de Análise de Oligonucleotídeos entre Sequências Repetitivas Diretas ou "*spacer oligotyping - spoligotyping*" (Roring et al., 1998; Zumarraga et al. 1999).

#### *Análise de Oligonucleotídeos entre Sequências Repetitivas Diretas - "spoligotyping"*

Este método explora o polimorfismo interno das "Sequências Repetitivas" (DRs; Direct Repeat Sequences), que contém uma região bem conservada de 36 pares de bases (bp) intercaladas por seqüências de nucleotídeos não repetitivos e espaçadores (*spacer*) de 36 a 41 bp. As amostras variam no número de DRs e na presença ou ausência de *spacers*. O processo inclui três etapas distintas; primeiramente, produção de uma membrana contendo 43 seqüências de nucleotídeos não repetitivos padrões (*spacer*); secundariamente, é realizada a amplificação inteira do locus DRs da amostra pesquisada usando iniciadores específicos (DRA, DRb) que amplificam as DRs seguidas da amplificação dos respectivos *spacers*. O terceiro passo constitui em colocar as diferentes DRs com seus respectivos *spacer* amplificados em contato com a membrana contendo os diferentes *spacers*, resultando na hibridação do *spacers* amplificados com sua seqüência homóloga.

Desenho representativo em "Anexos" auxilia no entendimento deste protocolo (Kamerbeek et al., 1997). A ausência ou presença de DR com seus respectivos *spacers* gera um perfil próprio de hibridação de cada amostra, em consequência da hibridização de um produto amplificado por PCR (*spacer*) com o locus da membrana que contém a seqüência homóloga (Kamerbeek et al., 1997; Njanpop-Lafourcade et al., 2001). O *spoligotyping* associado ao RFLP e outras técnicas têm sido utilizados para o estudo de *M. bovis* que fazem transmissão horizontal dentro da mesma espécie ou interespecies, tais como entre bovinos, humanos e animais selvagens (Aranaz et al., 1996) A associação destas técnicas vem sendo utilizada recentemente para o estudo de amostras de *M. bovis* resistente à antibioticoterapia (Niemman et al 1999, JCM37-2) e transmissão nosocomial de *M. bovis* multirresistente (Samper et al. 1997; Blazquez et al. 1997 Guerrero et al., 1997)

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Identificação de *M. bovis* em tecido com lesão tipo tuberculosa (LTTs)

##### *Local de execução e biossegurança*

A microbiologia de lesões tipo tuberculosas (LTTs) iniciou-se em junho/1998 e até outubro/1999 foi realizada no Laboratório de Referência Animal-Mín. Agricultura e Abastecimento, Pedro Leopoldo, MG. Posteriormente, as atividades de manipulação de lesões tipo tuberculosas (LTTs) foram realizadas no Instituto Biológico de São Paulo-SP e Fundação Ezquiel Dias-MG. Os protocolos envolvendo biologia molecular foram desenvolvidos no Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, laboratórios do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina - UNESP, Laboratório de Tuberculose do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP e no Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária-INTA, Buenos Aires, Argentina. Isto permitiu que o processamento de LTTs, suspeitas de contaminação pelo *M. bovis* fossem processados em fluxo laminar classe II B2 e laboratórios específicos para este fim. Todo o material de descarte utilizado na coleta no frigorífico e manipulação no laboratório foi autoclavado a

121°C por 20 minutos ou ficou em banho de formaldeído 10% por 1 hora.

#### *Caracterização da amostragem e testes estatísticos*

Epidemiologicamente, a análise das amostras de *M. bovis* obtidas foi descritiva, prospectiva, transversal, não controlada, de prevalência de casos. Foram coletadas 252 lesões tipo tuberculosas (LTTs) a fim de verificar resistência à INH e perfil de fragmentos de DNA obtido por ação de enzimas de restrição (RFLP) e *spoligotyping*.

Para determinar estatisticamente o tamanho da amostragem e suas correlações, foram utilizados o Teste de Estudo Descritivo Randomizado Não Agrupado (Kish & Leslie, Survey Sampling, John Wiley & sons, NY, 1965) recomendado pelo programa EPI-INF096 {fórmula: Sample Size =  $n/(1-(n/population))$  ;  $n= Z*Z(P(1-P)/(D*D))$  } e o Teste de  $\chi^2$  com 1 grau de liberdade.

#### *Coleta de material*

Em acordo com o Serviço de Inspeção Federal-SIF, Ministério da Agricultura e Abastecimento, os funcionários da linha de matança de 3 frigoríficos sob inspeção do SIF, identificados na Tabela 1, coletaram lesões tipo tuberculosas de bovinos abatidos entre o período de junho 1998 a novembro de 2000. Além destes, foram investigados materiais enviados pelos dois matadouros municipais do município de Divinópolis – MG. As lesões assim coletadas, preferencialmente lesões ganglionares, foram acondicionadas em sacos plásticos de PVC e congeladas -20°C até o envio em caixa de isopor com gelo reciclável para o laboratório (Kantor L N., 1979).

#### *Descontaminação*

Todo o material coletado sofreu primeiramente processo de descontaminação com 4%NaOH, Método Clássico de Petroff, (Kantor, LN. 1979). Para as lesões tipo tuberculosas (LTTs) que após tratamento com 4% NaOH ainda apresentaram-se contaminadas, foi utilizada a técnica preconizada por Langenegger (1976) que trata o material com 6 % ácido sulfúrico.

#### *Isolamentos de M. bovis em tecido com lesão tipo tuberculosa*

Entre agosto/1998 e novembro/2000 foram processadas 252 lesões tipo tuberculosas(LTTs) de linfonodos mediastínicos, bronquiais, retrofaríngeos e submaxilares ( Neill et al., 1994) de bovinos abatidos em localidades diversas conforme Tabela 1. Essas LTTs determinaram a condenação total ou parcial de carcaças bovinas nos frigoríficos estudados nos Estados de MG e ES. As LTTs permaneceram em média 25 dias congeladas e foram transportadas em banho de gelo entre o frigorífico e o laboratório. Sofreram descontaminação conforme acima descrito, seguida de sementeira em meios de cultura Lowenstein-Jensen sem glicerol e 0,8% de piruvato e/ou Stonebrink.

A sementeira inicial foi feita a partir da secção de camadas delgadas da parte interna do material coletado com lesão tipo tuberculosa. Este material coletado foi homogeneizado em gral com areia e solução salina estéril, adicionada de solução 4% hidróxido de sódio durante 15 min, deixado em repouso por 3 min, coletado o sobrenadante, submetido à centrifugação 4.000 x g por 15 min. O sedimento foi ressuspensão em solução salina estéril, corrigido o pH para 7 com 1% HCl e semeados 0, 5 mL nos meios de cultura Stonebrink e LJ sem glicerol e com 0,8% de piruvato de sódio. O material restante foi estocado a -20°C para sofrer tratamento de descontaminação para os casos em que a primeira sementeira foi inviabilizada devido a contaminantes. Todas as culturas foram incubadas a 37°C até 90 dias. No intuito de obter isolamentos de *M. bovis*, foram realizadas 2-4 sementeiras sucessivas de cada LTT descontaminada em meios de cultura LJ e/ou Stonebrink. Após incubação, amostras positivas das culturas foram examinadas pela coloração de Ziehl-Neelsen e caracterizadas por métodos bioquímicos e moleculares.

#### *Testes bioquímicos*

O meio de cultura Löwenstein-Jensen (LJ) adicionado de drogas seletivas foi utilizado para caracterizar as amostras como *M. bovis* assim como verificar a resistência à INH. Foi testado inicialmente como referencial para todas as amostras com características morfológicas de

*M. bovis*, a inibição de crescimento em LJ contendo 2 µg/mL hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (T<sub>2</sub>H) como a prova referencial para amostras de *M. bovis* sensíveis à INH e positiva para amostras resistentes (Grange, 1996; Kantor, 1988; Wayne, 1982).

Para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, foram realizados também os testes da fita de niacina, Difco-USA (até 30% das cepas BCG de *M. bovis* podem acumular pequenas quantidades de niacina), a reação de redução de nitratos (algumas cepas exibem provas fracamente positivas), cultivo em LJ contendo 100 µg/mL de pirazinamida. Também foi testada a atividade de catalase de forma semiquantitativa adicionando 1 mL de solução Tween-peróxido (70% Tween 80 a 10%+ 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) recém preparada às culturas em 7H11, permanecendo em posição vertical durante 5 min para leitura e verificando presença de bolhas.

Para testar a resistência à INH "in vitro" das 29 amostras de *M. bovis* pertencentes à bacterioteca do Instituto Biológico de São Paulo, foi inicialmente utilizado o Método das Proporções em sua íntegra (amostras de 1-IB a 29-IB, Tabela 1), ou seja, diluições 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup> da amostra de *M. bovis* a partir da comparação com o padrão n<sup>o</sup>1 da Escala McFarland, correspondente a aproximadamente 10<sup>6</sup> bacilos (Kantor, 1996; 1988). A seguir, foi realizada a semeadura de 0,1 ml das diluições 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-5</sup> em 4 tubos de meio Stonebrink com glutamato de sódio (substituto do piruvato) e sem isoniazida e em 4 tubos de meio Stonebrink com 0,2 µg/mL de isoniazida. Para as amostras isoladas de LTTs de bovinos abatidos em matadouros (amostras 01 a 252) foram utilizados somente 3 tubos de meio de cultura para cada amostra. Para tanto, foi mantida uma concentração fixa de 0,1 µg/mL de isoniazida no meio de cultura 7H11 e semeada uma concentração fixa do cultivo da micobactéria proveniente de LJ com 0,8% de piruvato de sódio (uma alça descartável calibrada para 0,2 µl). O cálculo desta concentração fixa de semeadura foi baseado na diluição do conteúdo de uma alça calibrada de 0,2 µl repleta de cultivo de *M. bovis* em 9,9 ml 1% de ácido sulfúrico que deve corresponder a um padrão de turbidez ≥ o tubo n<sup>o</sup>1 da Escala McFarland,

indicando uma concentração aproximada de ≥ 10<sup>6</sup> bacilos/ml (Kantor, 1986). Todos os tubos foram incubados a 37°C e observados por 40 dias.

### 3.2 Identificação molecular de micobactérias sensíveis e resistentes à INH

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi utilizada para confirmar a identificação do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* em todas as culturas positivas e negativas. Além disso, as culturas sensíveis e resistentes à INH foram analisadas por outras técnicas de biologia molecular para verificar alterações genômicas ocorridas. Os protocolos destas técnicas foram realizados conforme a descrição abaixo e também relatado em trabalho publicado (Zanini et al., 2001).

#### 3.2.1 Extração de DNA

##### *Extração de DNA para PCR direto de lesão tipo tuberculosa (LTTs)*

As primeiras 54 LTTs processadas, foram processadas conforme Zanini et al. (2001) utilizando a digestão com tiocianato de guanidina (Fluka Chemie, Suíça, código 50990) associado à α caseína (Boom, et al., 1999). O protocolo observado foi o seguinte: 100 mg da LTTs é misturado em 1,2 mL de tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,0, contendo 1,2 mg de α caseína, 12 mg proteinase K, 0,5% Tween 20 e incubado 12 h / 60 °C, finalizando com 15 min / 100 °C. A esta mistura é acrescentado 1/10 v/v de tampão de lise contendo 5,25 M de tiocianato de guanidina (GuSCN), 50 mM Tris-HCl pH 6,4, 20 mM EDTA, 1,3% Triton X-100, 0,1% de α caseína e 1,2 % de diatomácea. Esta suspensão, contendo DNA adsorvido à diatomácea, é centrifugada 3X (12,000 g x 15 s), sendo o sedimento lavado e ressuspenso em 5 ml de 5,25 M GuSCN, 50 mM Tris-HCl, pH 6,4. Após, segue-se com 3X lavagem em 5 ml de 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE). Finalmente, é realizada a eluição do DNA adsorvido à diatomácea, o sedimento é suspenso em 0,3 mL TE, e aquecido 56 °C/10 min. O DNA obtido após quantificação em concentração mínima de 50 µg, é então submetido a PCR utilizando os iniciadores INS-1 e INS-2. O produto amplificado é aplicado em 6% gel de poliacrilamida e submetido à eletroforese. Em

seguida, o gel é corado com prata, detectando-se um fragmento de 245 pares de bases (Zanini et al., 2001).

#### *Extração de DNA de cultivos para PCR, RFLP e spoligotyping*

Conforme van Soolingen et al. (1994), as colônias de micobactérias em LJ foram transferidas para eppendorf com 400µl TE. Foram inativadas aquecendo por 20 min em banho-maria a 80°C (ou em Heat Block), centrifugadas 2 min/12.000 rpm (25,000 g), desprezado sobrenadante e ressuscitado em 350 µl TE. O sedimento foi, em seguida, adicionado de 50-70µl de lisozima (10mg/mL). Foi agitado até desfazer todos os grumos maiores. Os tubos foram incubados a 37°C durante 10-12 horas. No dia seguinte, foram adicionados de 10 µl proteinase K (10 mg/mL) e 70 µl de 10% SDS. Agitar 5s, incubados em banho-maria 65°C/10min. Novamente agitados vigorosamente e adicionados de 100µl de NaCl 5M e 80µl de CTAB/NaCl (pré-aquecido 65°C). Agitar até ficar leitoso. Novamente os tubos foram incubados em banho-maria 65°C/10 min. Refrigerados por 10 min a 4°C. Adicionados de 400µl de clorofórmio/isoamil álcool, agitar 20s. Deixados em repouso (10 min) para separar em 2 fases. Pipetados então o sobrenadante (clorofórmio + fase aquosa) para novo tubo e completado para 1400 µl com clorofórmio isoamil. Agitado até ficar leitoso (30s). Centrifugado a 4°C por 8 min/12000 g. Em seguida, foram transferidos 600µl da fase aquosa para novo tubo. Adicionados então de 450µl de isopropanol (0.6 vol), misturado por inversão. Colocados a -20°C por 20 min ou durante 10-12 horas, 4°C. Centrifugados a 4°C por 15 min em 12,000 g. Desprezado o sobrenadante por inversão e lavado o sedimento 1x com 1000µl/ etanol 70% frio, sem agitar. Os tubos foram então centrifugados por 5 min a 4°C/12 000 g. Desprezado o sobrenadante por inversão, centrifugados por mais 1 min a 4°C em 12 000 g, retirado o sobrenadante restante. Por fim, os tubos contendo o DNA como sedimento foram deixados a secar ao ar ou estufa por no máximo 2 h. Após isso, adicionados de 20-30µl de H<sub>2</sub>O milliQ ou tampão TE pH 8.0. Incubados a temperatura ambiente pelo menos 24 horas para dissolução do DNA. Estocados a 4°C após liofilização.

A seguir, foi ajustada a concentração do DNA extraído para 2 a 4,0 µg comparando visualmente com padrão de concentração conhecido (Figura 1). A solução estoque de DNA das diversas amostras foi aferida para possuir no mínimo 200 ng/µl que foram utilizados na digestão com enzimas de restrição (*PvuII* ou *AluI*). Para verificar esta concentração, foi feita a mistura prévia de 2 µl DNA extraído com 98 µl tampão 1x TE (diluição 1:50 – 200ng/50=4 ng/µl). Inoculado em gel 0,8% agarose e realizada a eletroforese em paralelo como padrão de concentração de DNA (DNA *Hind III* referência, 3ª banda de cima para baixo contém 9 ng).

#### 3.2.2 PCR

O PCR para ambas as modalidades de extração de DNA foi realizado segundo protocolo descrito abaixo. Os reagentes e condições iniciais da PCR foram: 50mM Tris-HCl (pH 8.3) 50mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada desoxinucleotideo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 50 pmol de cada iniciador, INS-1 e INS-2, 2 unidades de *Taq* polimerase, DNA extraído a partir das culturas, aproximadamente 50 µg, q.s.p água estéril deionizada 25 µl, e finalmente 15 µl de óleo mineral para evitar a evaporação da mistura. O programa estabelecido para o termociclador de temperatura foi de 94°C-5 min para desnaturação inicial sem *Taq* polimerase, seguida da adição de *Taq* polimerase e repetição de 30 ciclos de 94°C-2 min, 56°C-2 min, 72°C-1 min, finalizando com um ciclo de extensão a 72 C, 10 min. A otimização da PCR foi realizada variando particularmente os parâmetros de MgCl<sub>2</sub> e temperatura de alinhamento. Foram aplicados, então, 2 µl do produto amplificado acrescido de tampão de corrida para gel de poliacrilamida 6%. As condições de eletroforese foram de 100 V, 20 mA, 2 W, 40 min. O preparo do gel foi realizado com 8,0 mL de água miliQ, 1,2 mL de buffer TBE 10x, 2,4 mL de acrilamida 30%, filtrada, 80 µl de APS, 10 µl de TEMED. Após a eletroforese, os fragmentos amplificados foram revelados pelo método da coloração de revelação por prata com o seguinte procedimento: lavar em água destilada e soltar o gel da placa de vidro, solução fixadora (etanol 10%+ac. acético 0,5%), 5 min em agitação, lavar em água destilada, banhar em solução de prata

(0,1 g AgNO<sub>3</sub> + 16,66 mL sol. fixadora + 33,33 mL de água destilada) sob agitação durante 10 min, lavar em água destilada, emergir em água destilada sob agitação por 5 min, emergir em solução reveladora (3 g NaOH + 0,3 mL formaldeído qsp água dest. 100 mL) sob agitação até surgirem as bandas de amplificação do DNA.

### 3.2.3 Protocolo de RFLP utilizado

Esta técnica foi aplicada utilizando protocolos já descritos ( van Soolingen et al., 1994; Yeng et al., 1995; Romano et al., 1996; Cousins et al 1998).

#### Digestão enzimática DNA extraído

- Digestão com *AluI*: 4 µg do DNA purificado foram digeridos com 20 unidades de enzima, cuja concentração de estoque é 10 u/µl. em presença de 1/10 vol do 10X tampão da enzima em q.s.p 20 µl de água milliQ. A ação de clivagem da enzima faz-se na ligação fosfática

- 5'-AG↓CT-3'.....3'-TC↑GA-5'

Os fragmentos obtidos estão demonstrados na Figura 1.

- Digestão com *PvuII*: 4 µg do DNA purificado foram digeridos com 10 unidades de enzima, cuja concentração de estoque é 10 u/µl. em presença de 1/10 vol do 10X tampão da enzima em q.s.p 20 µl de água milliQ. A ação de clivagem da enzima faz-se na ligação fosfática 5'-CAG↓CTG-3' .....3'-GTC↑GAC-5' Os fragmentos obtidos estão demonstrados na Figura 1.

Novamente estima-se a concentração de DNA digerido, tomando 1 µl DNA digerido diluído em 5 µl H<sub>2</sub>O, acrescido de 1 µl de tampão corrida 6x sem marcador de peso molecular. Aplicar em agarose 0,8%(6x10) com pente de 15 canaletas, correr 5 min/100V. Corar com brometo e verificar a concentração de DNAs digeridos comparando com fotos referência de DNAs digerido e concentração de 0,2 µg/µl (Figura 1, padrão de peso molecular).

#### Condições de eletroforese de DNA digerido

Os géis de agarose de 14x21cm foram preparados na concentração de 0,8% de agarose em tampão TBE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA). Na primeira

canaleta foram aplicados 5 ul de marcador interno, composto de *PhiX174-HaeIII* e DNA Superdigerido Enovelado (Underdigested Supercoiled - Gibco/BRL) que ilustra fragmentos entre 0,6 a 16 kb a fim de observar a migração do DNA durante e eletroforese. O marcador foi preparado da seguinte maneira: 10ul Underdigested Supercoiled (concentração 40 ng/ul) 20 ul *PhiX 174-HaeII* (concentração 50 ng/ul) 130 ul TE (10mM Tris-CI pH 8,0, 1 mM EDTA) e 40 ul de tampão de amostra de DNA 5X. Nas demais canaletas foram aplicadas as amostras contendo, aproximadamente, 4 ug DNA digerido em tampão de amostra de DNA contendo marcador molecular interno que assinala fragmentos entre 0,6 e 16 kb. Na segunda e última canaleta foi aplicado DNA digerido com *AluI* de cepa referência de *M. bovis* AN5 e BCG cedidas pelo LARA-MA, Pedro Leopoldo, MG. A eletroforese foi desenvolvida sob voltagem de 40 volts e o tempo de corrida foi de 22 horas.

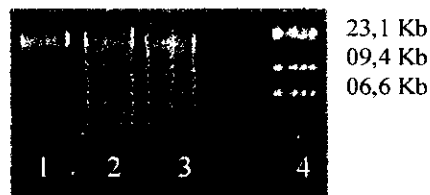


Figura 1 - Comparação de DNA extraído (1) e pós-digestão com *PvuII* (2), *AluI* (3) frente ao marcador de peso molecular (4), Lambda DNA - *Hind III*

*Transferência por capilaridade do Dna digerido sob condições alcalinas para membrana de fibra sintética* (Hyfbond +, Amersham Pharmacia, USA)

Foi utilizado o protocolo estabelecido no manual do conjunto de reagentes (kit) denominado Alkphos Direct (Amersham-Pharmacia, USA), que permite a marcação de sondas pela quimiluminescência e posterior sensibilização de filme radiográfico. Nesse protocolo, o gel acima descrito foi submetido aos seguintes tratamentos: submerso completamente 10 min em 500 mL 0,25 M HCl, lavado por 5 s em água destilada, incubado em

500 mL 0,4 M NaOH/20 min., lavado por 5 s em água destilada, incubado novamente em 0,4 M NaOH/20 min, lavado novamente por 5 s em água destilada. Foi montado, então, o "sanduíche" de transferência, onde foi colocado na parte inferior, papel filtro sobre um suporte em contato com 800 mL de 10X SSC (3M cloreto de sódio + 0,3M citrato de sódio), seguiu-se com o gel de agarose e a membrana de nylon (Hybond+, Amersham) em contato direto com o gel. Esta membrana foi seguida de camadas sucessivas de papel absorvente para uma altura de 15 cm. Esta transferência por capilaridade foi aplicada por no mínimo 12 h. Após esse período, o gel foi corado com brometo de etídio para visualização da transferência completa. Em seguida, a membrana foi lavada 2 min em 2x SSC e colocada por 2 min em contato com papel filtro saturado de 0,4 M NaOH. Então, a membrana foi lavada novamente em 5x SSC. Deixado escorrer o excesso de SSC, permanecendo úmida. Por fim, foi feita a fixação do DNA à membrana com luz ultravioleta nas condições de 254 nm/5 min. Seguido de armazenagem em geladeira (4°C) levemente úmida envolta em parafilme.

#### *Marcação de sonda gênica e detecção de fragmentos de DNA por quimiluminescência*

As sondas utilizadas foram duas; primeiramente uma sonda resultado da amplificação por PCR do fragmento de 245 pares de base (INS-1) da IS6110 de *M. tuberculosis* e uma outra sonda sintética rica em nucleotídeos C-G, denominada PGRS (van Soolingen et al., 1994; Yeng et al., 1995; Romano et al., 1996; Cousins et al 1998). Para os marcadores internos, foi utilizada a fita simples de DNA do próprio marcador interno já descrito, pós-desnaturação pelo calor. A marcação destas sondas (marcador interno, IS6110, PGRS) foi iniciada diluindo em água o DNA (sonda) a ser marcado para uma concentração de 10ng/µl. Desnaturado 50 µl (100 ng) do DNA-sonda, fervendo por 5 min. Imediatamente após a fervura, o tubo foi colocado em gelo por pelo menos 5 min. Acrescentado então de 10 µl *reaction buffer* (Alkphos Direct-NIF1551) ao DNA-sonda gelado. Seguido de adição de 2 µl do *labelling reagent* (Alkphos Direct). Após isso, foram adicionados 10 µl *cross-linker working solution* (Alkphos Direct). Homogeinizado, seguido de rápida centrifugação para precipitação dos

constituintes. Incubado 30 min/37°C A sonda assim produzida, pode ser usada imediatamente ou estocada em gelo até 2 h. Para hibridização com a membrana de nylon contendo os fragmentos de DNA de *M. bovis* digeridos, foi pré-aquecida a 55 °C com 20 mL *hybridisation buffer* (Alkphos Direct: 6,3 mL para 10 cm<sup>2</sup> de membrana) e colocada a membrana em tubo de hibridização para pré-hibridização por pelo menos 15 min a 55 °C em forno de hibridização. O DNA-sonda desnaturado e marcado, na concentração de 5-10 ng de sonda/mL de *hybridisation buffer* (Alkphos Direct) foi então acrescentado e realizada a incubação por 10-12 h/55°C. O tratamento pós-hibridização, consistiu em pré aquecer a 55 °C, 100 mL de *primary wash buffer* (Alkphos Direct), desprezar a sonda e *hybridisation buffer* do tubo, colocar 50 mL *primary wash buffer* (Alkphos Direct), 55 °C/10min. Desprezado o primeiro *primary wash buffer* e adicionados mais 50 mL de novo *primary wash buffer*. Incubado novamente 55°C/10min. Depois, a membrana foi colocada com o lado da transferência para cima em uma cuba. Banhada com 50 mL de *secondary wash buffer* (Alkphos Direct) durante 5 min, sob agitação e temperatura ambiente. Repetida a lavagem com novo *secondary wash buffer* por mais 5 min. A detecção por quimiluminescência ocorreu em sala escura com luz vermelha; quando a membrana foi banhada com 5 mL do *detect reagent* (Alkphos Direct) durante 2-5 min. A membrana foi então exposta com a parte hibridizada para cima em contato com o filme radiográfico, passando-se parafilme em volta do conjunto membrana e filme radiográfico e colocado o conjunto em cassete apropriado para exposição radiográfica durante 4 h. Foi feita revelação do filme sob as seguintes condições: 1 min para solução reveladora, lavada em água por dois min, colocada em solução fixadora mais um min. A reutilização da membrana para novas hibridizações foi realizada (com sonda de marcadores internos) após uma lavagem estridente (*stripping*), incubando a membrana em 0,5% (w/v) SDS /60 °C / 60 min. Em seguida, a membrana foi lavada em 100 mM Tris- pH8,0 (5 mL 1 M + 45 mL água) / 5 min.

#### *Análise de Oligonucleotídeos entre Sequências Repetitivas Diretas – “spoligotyping”*

Este método explora o polimorfismo interno das “Sequência Repetitivas” (DRs; Direct Repeat Sequences), que contém uma região bem conservada de 36 pares de bases (bp) intercaladas por seqüências de nucleotídeos não repetitivos e espaçadores (*spacers*) de 36 a 41 bp. As amostras variam no número de DRs e na presença ou ausência de *spacers*. O processo inclui três etapas distintas: primeiramente, produção de uma membrana contendo 43 seqüências de nucleotídeos não repetitivos padrões (*spacers*) adquirida comercialmente (Isogen, Bélgica); secundariamente, é realizada a amplificação inteira do locus DRs da amostra pesquisada usando iniciadores específicos (DRa, DRb) que amplificam as DRs seguida da amplificação dos respectivos *spacers* (ver esquema em “Anexos”, Kamerbeek et al., 1997). O terceiro passo constitui em colocar as diferentes DRs com seus respectivos *spacers* amplificados em contato com a membrana contendo os diferentes *spacers*, resultando na hibridação dos *spacers* amplificados com sua seqüência homóloga. A ausência ou presença de diferentes DR com seus respectivos *spacers* gera um perfil próprio de hibridação de cada amostra (Kamerbeek et al., 1997; Njanpop-Lafourcade et al., 2001). Esta técnica foi executada, para 35 DNAs extraídos de diferentes amostras por parceria técnica com Instituto Nacional de Tecnologia Argentina - INTA, Buenos Aires, Argentina, utilizando protocolo descrito por Zumarraga et al. (1999).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificação de *M. bovis* em tecido com lesão tipo tuberculosa (LTTs)

Para as 252 LTTs (lesões tipo tuberculosas) semeadas em meios de cultura LJ sem glicerol e com 0,8% de piruvato (LJ+P) foram obtidos 135 (53,5%) isolamentos de *M. bovis*. Os resultados detalhados deste procedimento estão expressos na Tabela 1 e Anexos. Estas culturas foram incubadas até 90 dias, 37°C, observando-se morfologia e coloração, semanalmente. Os tubos com aspecto macro e microscópicos condizentes com *M. bovis* (crescimento disgônico, poucas e pequenas colônias, chatas e lisas, crescimento lento, sem pigmento) foram caracterizados como bacilo álcool ácido resistente (BAAR), seguido

da confirmação por PCR pela presença de IS6110 para o Complexo *M. tuberculosis*. Repiques subseqüentes foram realizados das culturas positivas a fim de permitir outras provas de identificação. Foram então escolhidas 60 amostras isoladas entre LTTs de gado misto (n=28) e gado de corte (n=32) e utilizadas para RFLPs (identificadas na Tabela de Anexos com as siglas “PGRS”, “spol” e “mba”). Estas amostras mantiveram-se sem contaminação após vários repiques e também obedeceram às metodologias de identificação bioquímicas (Gramsci et al., 1996; Kantor, 1988). Estas amostras foram identificadas bioquimicamente resultando em ausência de atividade de redução de nitrato (Difco, USA) e negativas para o teste da fita de niacina (Difco, USA), crescimento negativo em presença de ácido *p*-nitrobenzóico (PNB) e hidrazida do ácido tiofeno-carboxílico (TCH, 2 µg/mL), crescimento positivo em presença de pirazinamida (100µg/mL) e condições de microaerofilia por crescimento em 7H9. Nas quatro amostras classificadas como resistentes à INH, observou-se prova negativa para catalase e crescimento na presença de TCH, 2 µg/mL. Foram realizados também esfregaços diretos das LTTs e corados por Ziehl-Neelsen (Z-N), observando-se BAAR somente em três esfregaços de 252 LTTs.

Observaram-se, ainda, 24 amostras com crescimento de micobactérias atípicas (crescimento rápido, escotocromogênicas, mucosas) e caracterizadas bioquimicamente por crescimento em presença de PNB. Verificaram-se também com freqüência bactérias produtoras de enzimas proteolíticas que digeriam os meios a base de ovo. Não foi realizada a identificação de micobactérias atípicas ou contaminantes diversos por não ser o objetivo deste trabalho.

### 4.2 Crescimento em meio de cultura contendo isoniazida

Todas as 135 amostras identificadas como *M. bovis* a partir das LTTs foram testadas frente à INH. Para as 135 amostras de *M. bovis* isoladas e testadas em meio de cultura 7H11 contendo 0,1µg/mL de INH foram verificados crescimentos de quatro amostras caracterizadas como resistentes à INH. A resistência à INH dessas quatro amostras foi confirmada como  $\geq 2,0$  µg/mL pelo Instituto Adolfo Lutz-São Paulo,

utilizando o Método da Concentração Inibitória Mínima (MIC).

Para as 29 amostras de *M. bovis* pertencentes à bacterioteca do Instituto Biológico-SP (Anexos) e testadas quanto a resistência à INH pelo Método das Proporções clássico com todas as diluições, não foi verificada nenhuma amostra resistente.

Desta forma, foi testado um total de 164 amostras para resistência à INH, 29 amostras da bacterioteca do Instituto Biológico-SP e 135 amostras isoladas de 252 LTTs. Estes resultados indicaram um percentual geral de resistência de 2,4%.

As amostras com resistência à isoniazida, além de apresentarem atividade catalase negativa e crescimento em presença de TCH, foram testadas frente a outras drogas, conforme Tabela 2.

#### 4.3 Extração de DNA do Complexo *M. tuberculosis* com tiocianato de guanidina e PCR diretamente de LTTs

As primeiras 54 LTTs processadas com a forma convencional de descontaminação pelo Método de Petroff registraram cultivo positivo para *M. bovis* em 23 LTTs (42,5%), contaminações e ausência de crescimento em outras 31 LTTs. Entretanto, resultados mais significativos para esse grupo de 54 amostras foram obtidos com PCR (Complexo *M. tuberculosis*) positivo em 38 LTTs (70,3%) quando da extração do DNA com tiocianato de guanidina (Fluka Chemie, Suíça, código 50990). Desta forma, a PCR revelou mais 15 LTTs (27,7%) como positivas para o Complexo *M. tuberculosis*, 11 LTTs negativas e quatro LTTs contaminadas para cultivo (Zanini et al., 2001). Outras LTTs não foram tratadas com este tiocianato por dificuldades de aquisição da droga produzida por este fabricante. Os resultados deste experimento estão demonstrados no Figura 6. Estes resultados indicaram uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo positivo para cultura e grupo positivo para PCR se utilizarmos o Teste de  $\chi^2$  (8,41) com 1 GL e  $p < 0,01$ .

#### 4.4 Polimorfismos genômicos observados

##### *Polimorfismos no spoligotyping*

O método *spoligotyping* (*spacer oligotyping*) aplicado a 35 amostras processadas de diferentes frigoríficos demonstrou 10 diferentes grupamentos (G) que estão apresentados na Figura 2 e também identificados em Anexos com a letra "G" (grupamento) e a sigla "spol". A frequência dos grupamentos observados com seus respectivos perfis está descrita na Tabela 3. Foram observadas as maiores frequências para o grupamento G1 (14 amostras), seguido de G2 (7 amostras) e a menor frequência para os grupamentos G6, G8 e G9 (1 amostra)

##### *Polimorfismos no RFLP - IS6110*

Na identificação de fragmentos IS6110 de 60 amostras isoladas e tratadas com enzima de restrição *PvuII*, o perfil predominante de RFLP foi A01 (41 amostras, 68,3 %), utilizando como sonda um fragmento de 245 bp de IS6110 que indicou uma única banda de 1,9 kb (Figura 3). Foram também observados outros dezenove perfis com fragmentos entre 1,9 e 6,0 kb. A frequência de perfis com dois fragmentos foram de n=10, três fragmentos n=3, e 4 fragmentos n=6, sendo que, para estas amostras foi realizado dendograma (Zanini et. al. 2001, Anexos).

##### *Polimorfismos no RFLP - PGRS*

Para análise dos polimorfismos PGRS, as amostras de cultura foram digeridas com *AluI* e hibridizadas com sonda rica em C-G, estando identificadas as amostras trabalhadas em Anexos com a denominação "PGRS". Na avaliação destas 60 amostras somente os fragmentos acima de 1,9 kb ( Cousins et al., 1998) foram considerados. A variação de intensidade na hibridização de amostras foi devido a variações na concentração de DNA digerido (2 a 4  $\mu$ g) e hibridizado com a sonda PGRS.

No rastreamento de grupos populacionais dos 60 RFLP-PGRS realizados, apresentaram-se vinte e um perfis distintos (Figura 4A e 4B) que foram aglutinados em 6 grupamentos em função do número de fragmentos (Figura 7). Estão incluídos nestes, 3 perfis distintos para amostras INH resistentes (Figura 5). No entanto, utilizando os dados apresentados não foi possível observar a predominância específica de determinado perfil em função de região geográfica.



Tabela 1 – Lesões tipo tuberculose (LTTs) coletadas e analisadas entre agosto/1998 e novembro 2000

Origem da amostra	Culturas positivas(%)	polimorfismos genômicos			Contaminação		Culturas negativas	Total
		Spol	PGRS	IS6110	Bacteriana	Mycobactéria atípica		
SIF 0504 Ituiutaba*	41(51,8)	10	24	24	13	07	18	79
SIF 0506 Colatina – ES*	22(50)	06	08	08	10	15	17	44
SIF 3030 Sabará - MG	22(46,8)	03	04	04	08	06	11	47
Frigorífico Municipal	32(59,2)	09	13	13	04	05	13	54
Divinópolis – MG								
Itapemirim – ES	02(40)	02	02	02	01		02	05
S.G.Sapucai – MG	04(100)	01	01	01				04
P. Caldas – MG	05(71,4)		02	02	02			07
P. Alegre – MG	04(80)	01	03	03		01		05
p. Nova – MG	01(50)	01	01	01			01	02
Três Corações – MG	01(25)	01	01	01	02		01	04
Oliveira – MG	01(100)	01	01	01				01
Totais	135(53,5)	35	60	60	40	24	53	252

\* Frigoríficos que abatem preferencialmente gado de corte, sendo outras origens geralmente gado misto.

utilizando o Método da Concentração Inibitória Mínima (MIC).

Para as 29 amostras de *M. bovis* pertencentes à bacterioteca do Instituto Biológico-SP (Anexos) e testadas quanto a resistência à INH pelo Método das Proporções clássico com todas as diluições, não foi verificada nenhuma amostra resistente.

Desta forma, foi testado um total de 164 amostras para resistência à INH, 29 amostras da bacterioteca do Instituto Biológico-SP e 135 amostras isoladas de 252 LTTs. Estes resultados indicaram um percentual geral de resistência de 2,4%.

As amostras com resistência à isoniazida, além de apresentarem atividade catalase negativa e crescimento em presença de TCH, foram testadas frente a outras drogas, conforme Tabela 2.

#### 4.3 Extração de DNA do Complexo *M. tuberculosis* com tiocianato de guanidina e PCR diretamente de LTTs

As primeiras 54 LTTs processadas com a forma convencional de descontaminação pelo Método de Petroff registraram cultivo positivo para *M. bovis* em 23 LTTs (42,5%), contaminações e ausência de crescimento em outras 31 LTTs. Entretanto, resultados mais significativos para esse grupo de 54 amostras foram obtidos com PCR (Complexo *M. tuberculosis*) positivo em 38 LTTs (70,3%) quando da extração do DNA com tiocianato de guanidina (Fluka Chemie, Suíça, código 50990). Desta forma, a PCR revelou mais 15 LTTs (27,7%) como positivas para o Complexo *M. tuberculosis*, 11 LTTs negativas e quatro LTTs contaminadas para cultivo (Zanini et al., 2001). Outras LTTs não foram tratadas com este tiocianato por dificuldades de aquisição da droga produzida por este fabricante. Os resultados deste experimento estão demonstrados no Figura 6. Estes resultados indicaram uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo positivo para cultura e grupo positivo para PCR se utilizarmos o Teste de  $\chi^2$  (8,41) com 1 GL e  $p < 0,01$ .

#### 4.4 Polimorfismos genômicos observados

##### *Polimorfismos no spoligotyping*

O método *spoligotyping* (*spacer oligotyping*) aplicado a 35 amostras processadas de diferentes frigoríficos demonstrou 10 diferentes grupamentos (G) que estão apresentados na Figura 2 e também identificados em Anexos com a letra "G" (grupamento) e a sigla "spol". A frequência dos grupamentos observados com seus respectivos perfis está descrita na Tabela 3. Foram observadas as maiores frequências para o grupamento G1 (14 amostras), seguido de G2 (7 amostras) e a menor frequência para os grupamentos G6, G8 e G9 (1 amostra).

##### *Polimorfismos no RFLP - IS6110*

Na identificação de fragmentos IS6110 de 60 amostras isoladas e tratadas com enzima de restrição *PvuII*, o perfil predominante de RFLP foi A01 (41 amostras, 68,3 %), utilizando como sonda um fragmento de 245 bp de IS6110 que indicou uma única banda de 1,9 kb (Figura 3). Foram também observados outros dezoito perfis com fragmentos entre 1,9 e 6,0 kb. A frequência de perfis com dois fragmentos foram de n=10, três fragmentos n=3, e 4 fragmentos n=6, sendo que, para estas amostras foi realizado dendograma (Zanini et al. 2001, Anexos).

##### *Polimorfismos no RFLP - PGRS*

Para análise dos polimorfismos PGRS, as amostras de cultura foram digeridas com *AluI* e hibridizadas com sonda rica em C-G, estando identificadas as amostras trabalhadas em Anexos com a denominação "PGRS". Na avaliação destas 60 amostras somente os fragmentos acima de 1,9 kb (Cousins et al., 1998) foram considerados. A variação de intensidade na hibridização de amostras foi devido a variações na concentração de DNA digerido (2 a 4  $\mu$ g) e hibridizado com a sonda PGRS.

No rastreamento de grupos populacionais dos 60 RFLP-PGRS realizados, apresentaram-se vinte e um perfis distintos (Figura 4A e 4B) que foram aglutinados em 6 grupamentos em função do número de fragmentos (Figura 7). Estão incluídos nestes, 3 perfis distintos para amostras INH resistentes (Figura 5). No entanto, utilizando os dados apresentados não foi possível observar a predominância específica de determinado perfil em função de região geográfica.

Tabela 1 – Lesões tipo tuberculose (LTTs) coletadas e analisadas entre agosto/1998 e novembro 2000

Origem da amostra	Culturas positivas(%)	polimorfismos genômicos culturas positivas				Contaminação		Culturas negativas	Total
		Spol	PGRS	IS6110	Bacteriana	Micobactéria atípica			
SIF 0504 Ituiutaba	41(51,8)	10	24	24	13	07	18	79	
SIF 0506 Colatina – ES *	22(50)	06	08	08	10	15	17	44	
SIF 3030 Sabará - MG	22(46,8)	03	04	04	08	06	11	47	
Frigorífico Municipal Divinópolis – MG	32(59,2)	09	13	13	04	05	13	54	
Iapenirim – ES	02(40)	02	02	02	01		02	05	
S.G.Sapucai – MG	04(100)	01	01	01				04	
P. Caldas – MG	05(71,4)		02	02	02			07	
P. Alegre – MG	04(80)	01	03	03		01		05	
p. Nova – MG	01(50)	01	01	01			01	02	
Três Corações – MG	01(25)	01	01	01	02		01	04	
Oliveira – MG	01(100)	01	01	01				01	
Totais	135(53,5)	35	60	60	40	24	53	252	

\* Frigoríficos que abatem preferencialmente gado de corte, sendo outras origens geralmente gado misto.

Tabela 2 – Resistência de amostras INH resistentes frente a outros antibióticos.

Amostras	Drogas ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Estreptomicina 4,0	Rifampicina 40	Etionamida 20	Pirazinamida 200
060004(G2)	+	-	+	+
060009(G1)	-	-	+	+
090002(G2)	+	-	+	+
100004(G1)	+	-	+	+

Tabela 3. Frequência de polimorfismos de DNA pelo *spoligotyping* em 35 amostras de *M. bovis*

Origem	Grupamentos										Totais
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	
SIF0504-MG	1	-	2	2	2	1	-	1	1	-	10
SIF0506-ES	4	1	-	-	-	-	1	-	-	-	5
SIF3030-MG	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3
Divinópolis	5	4	-	-	-	-	-	-	-	1	10
Três Corações-MG	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Pouso Alegre-MG	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Oliveira -MG	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Itapemirim-ES	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	3
Total	14	7	2	2	2	1	2	1	1	3	35

\*A representação dos polimorfismos de cada grupamento (G) está demonstrada na Figura 2 e Anexos

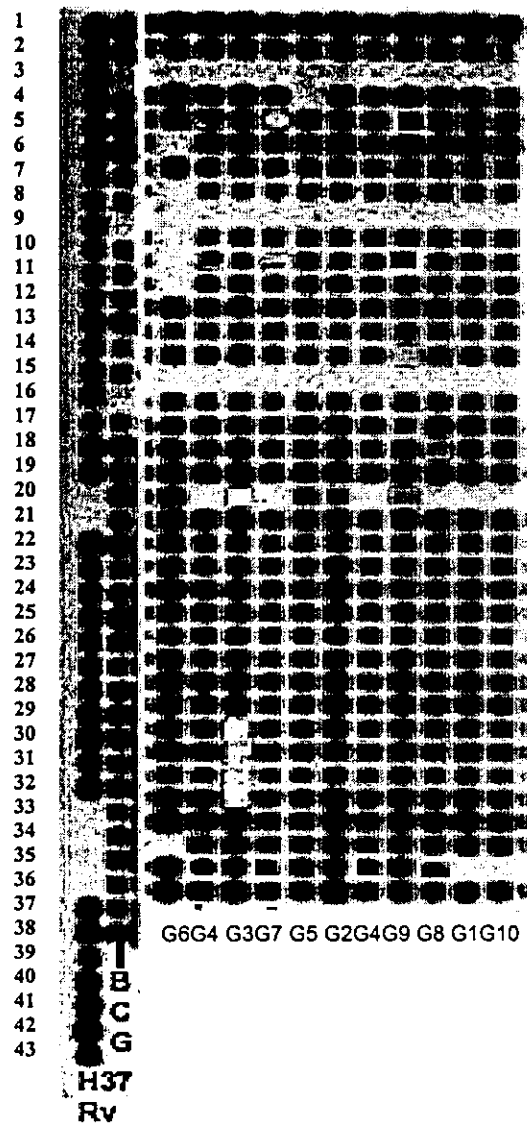


Figura 2- Seleção de polimorfismos de DNA em *M. bovis* observados com *spoligotyping* (35 amostras em Anexos)

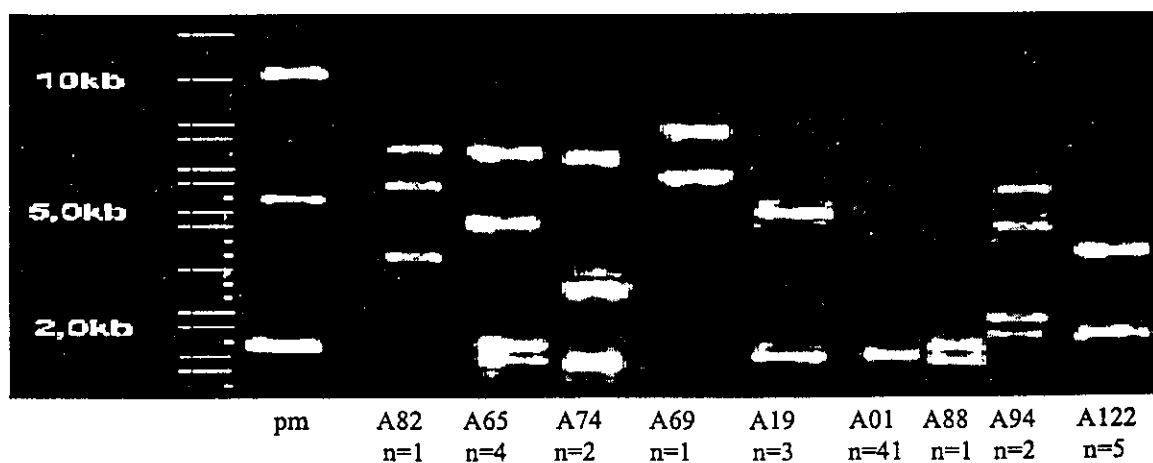
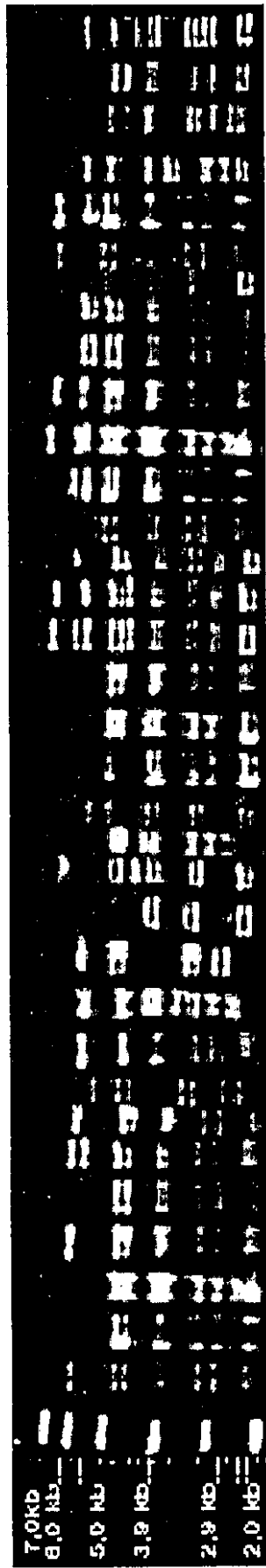
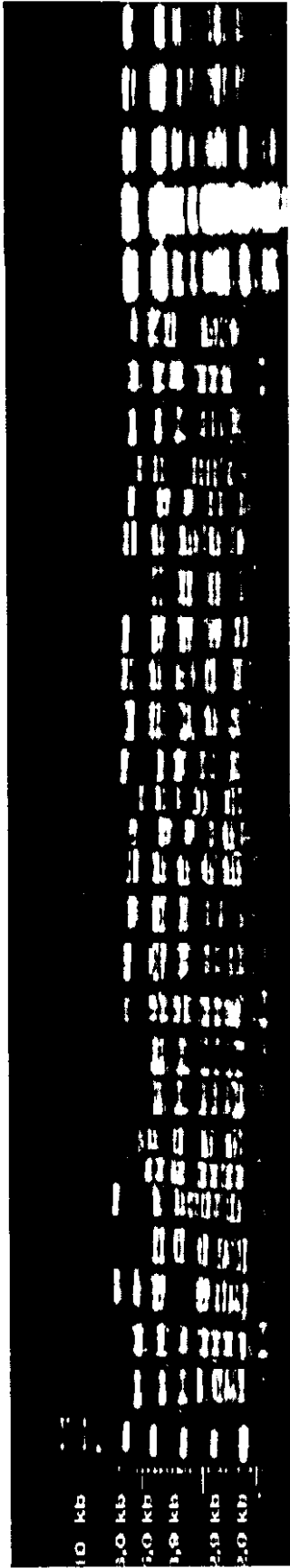


Figura 3 – Seleção e frequência de polimorfismos em 60 DNAs de *M. bovis* digerido com *PvuII* e hibridizados com sonda *IS6110* (Polimorfismos individualizados das 60 amostras em Anexos)



A: pm- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34  
 Perfil 1 2 2 1 2 3 1 4 5 6 7R 8 9R 10 11 12 2 2 AN5AN5 11 2 3 AN5 AN5 13R 13R 4 1 1 11 14 2 BCG



B: pm 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65  
 Perfil; 5 15 16 2 17 2 2 2 2 1 1 1 3 18 11 5 4 3 1 8 3 1 19 5 5 11 3 2 15 15 15

Figura 4A-4B - Polimorfismos em 60 DNAs de *M. bovis* digerido com *Acl* e hibridizados com sonda PGRS. A primeira coluna (pm) ilustra os pesos moleculares de Lambda DNA - *Hind* III. Na primeira linha (A e B) estão relacionadas as identificações numéricas de cada amostra, na segunda linha (perfil) está relacionado o grupo de perfil ao qual cada amostra pertence

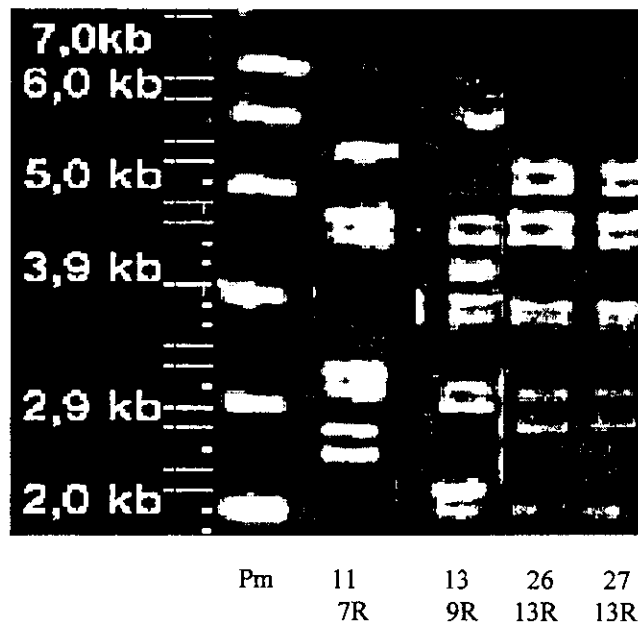


Figura 5 — Polimorfismos de DNA resultantes de digestão com *AluI* e hibridização com sonda PGRS de amostras *M. bovis* INH- resistentes. . A primeira coluna (pm) ilustra os pesos moleculares de Lambda DNA – *Hind* III. Na primeira linha estão relacionadas as identificações numéricas de cada amostra, na segunda linha (perfil) está relacionado o grupo de perfil ao qual cada amostra pertence.

### PCR x Cultivo na identificação de TBC

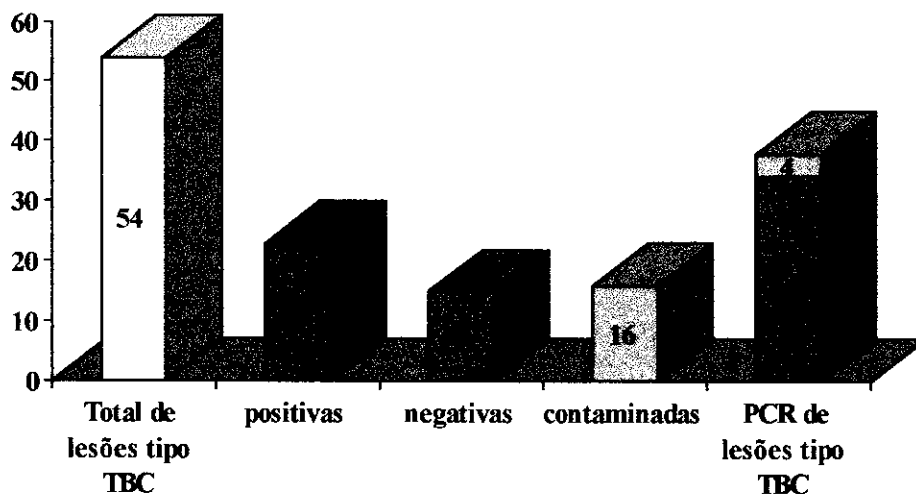


Figura 6 – Identificação de *M. bovis* por PCR a partir de DNA extraído com tiocianato de guanidina x cultivo em meio LJ

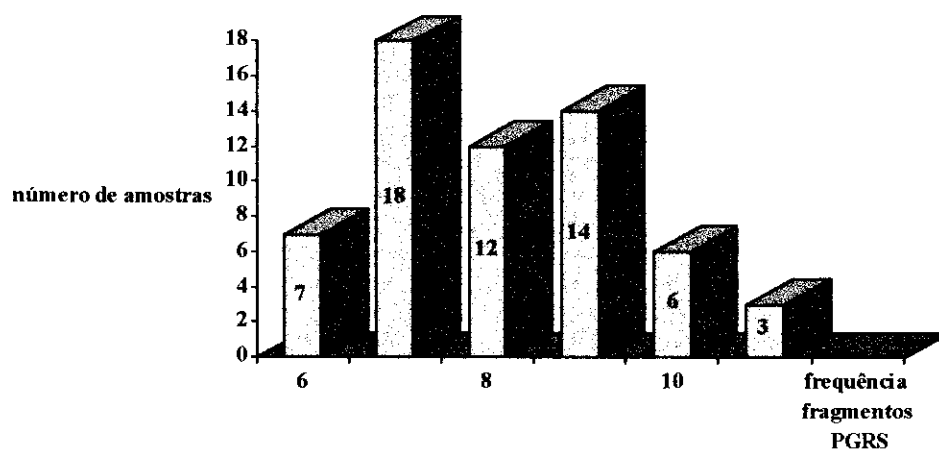


Figura 7 – Número de fragmentos observados no RFLP-PGRS x número de amostras hibridizadas.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação de *M. bovis* em tecido com lesão tipo tuberculosa

Os linfonodos mediastínicos bronquiais, retrofaringeos e submaxilares foram os tecidos escolhidos na amostragem, pois 80% dos animais tuberculosos apresentam LTTs nestes tecidos (Neill et. al., 1994). A escolha dos meios de cultura, Stonebrink e/ou LJ sem glicerol e com piruvato de sódio, para o primo isolamento, baseou-se nas recomendações de Corner & Nicolacopoulos (1988), Sepkowitz et al., (1995) e Grange et. al. (1996). O isolamento de 135 amostras de *M. bovis* coletadas indicaram de 53,5% de cultivos em 252 LTTs. Este dado é próximo aos resultados obtidos anteriormente por Zanini et al. (2001), quando foram encontrados 42,6% de culturas positivas (23 positivos/54 LTTs). A diferença entre os resultados deve considerar que o número de amostras aumentou (4,7x) e as condições de coleta, transporte e processamento tornaram-se mais eficientes ao longo de 28 meses do experimento, pois passou a ocorrer uma maior coordenação entre os funcionários do Serviço de Inspeção Federal-MA para o imediato congelamento das LTTs, assim como a frequência de viagens do transportador do material, a habilidade individual no processo de descontaminação e na eficiência da sementeira do material. Comparando-se com outros dados da literatura, Roxo et al. (1999) em 112 LTTs, observaram variações entre 5 a 66,66% de sucesso no isolamento de *M. bovis* para diferentes lotes de LTTs. A variabilidade desses resultados foi atribuída à má conservação no transporte do material. Liebana et al (1995) obtiveram 71,4% de resultados positivos e Corner (1994), utilizando como descontaminante 0,075% de HPC (hexadecylpyridinium chloride), isolou *M. bovis* em 73% do material processado. No entanto, contaminante menos tóxicos para a micobactéria, também possui baixo poder descontaminante.

As micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* requerem um tempo prolongado para replicação da ordem de 15 a 22 horas, enquanto o tempo para crescimento de outras bactérias contaminantes, pode ser de apenas 20 a 30 minutos. Esta desproporção entre velocidade de

crescimento, pode resultar no rápido acúmulo de ácidos metabólicos que liquefazem o meio de cultura, tornando-o insatisfatório para o isolamento das micobactérias. Desta forma, nas 117 LTTs sem isolamento de *M. bovis*, 64 apresentaram-se contaminadas por microrganismos diversos (25,4%), inclusive micobactérias atípicas (24 amostras) de crescimento rápido, escotocromogênicas e fotocromogênicas, positivas para crescimento em meio de cultura LJ contendo 500 µg de PNB (ácido para nitrobenzóico) que é indicativo de micobactérias atípicas (Grange et al. 1996). Não foram realizadas as identificações dessas amostras por não ser o objetivo deste trabalho. Outras 53 LTTs tiveram ausência de qualquer cultivo (21%), sendo impossível descartar a presença ou não de *M. bovis*, uma vez que os processos de descontaminação empregados prévios à inoculação (4% NaOH e 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) são extremamente lesivos para a parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas em menor grau, também inviabiliza o crescimento do *M. bovis*.

O Complexo *M. tuberculosis* e *M. avium-intracellulare* são fracos frente à prova de catalase, igual ou menor a 45 mm de formação de bolhas (Kantor, 1988). Mas esta característica é particularmente valiosa para identificação de cepas resistentes à INH, que geralmente são totalmente negativas à prova de catalase. Além disso, muitas micobactérias atípicas são catalase semiquantitativa positivas ( $\geq 45$  mm). A atividade de catalase pode ser avaliada semiquantitativamente medindo-se a coluna de bolhas produzidas pela adição de peróxido ao tubo com cultura, pois a micobactéria sensível à INH tem a capacidade de decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio livre. Foi verificada a produção de bolhas abaixo de 45 mm sobre a superfície do 7H11, que indicaram a atividade fraca catalase presente para as amostras de *M. bovis* sensíveis à INH e ausência de qualquer atividade de catalase para as amostras resistentes à INH.

Foram realizados também esfregaços diretos das LTTs e corados por Z-N, observando-se claramente BAAR somente em 3 esfregaços de 252 LTTs (1,2%), diferenciando-se dos resultados de BAAR para esfregaços de escarro humano que têm resultados positivos entre 50%

e 80% das amostras examinadas. Estes resultados estão de acordo com a literatura consultada, pois as mesmas indicam a necessidade de realização de cultura prévia para identificação de BAAR em material que não seja o escarro (Kantor, 1988, Sepkowitz et al., 1995). Na tuberculose animal, a baciloscopia não é decisiva, pois órgãos com lesões macroscópicas típicas de tuberculose podem não conter BAAR ao exame direto; devido a isso se deve sempre efetuar o cultivo (Kantor, 1988).

## 5.2 Crescimento em meio de cultura 7H11 contendo 0,1µg/mL de INH

Variados métodos têm sido propostos para o estudo de resistência de micobactérias à antibioticoterapia, tais como o perfil de ácidos micólicos pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia em Camada Delgada (Garza-González et al., 1997) e o MGIT\*, mas requerem reagentes e equipamentos de custo elevado e/ou pessoal altamente treinado. O cultivo da micobactéria em meios de cultura contendo antibióticos é um método clássico de aceitação mundial e de baixo custo se comparado a outros processos, apesar de necessitar um tempo mais prolongado para identificar a resistência antibacteriana e deve-se considerar, também, perda de eficiência em função de contaminações (amostras que se contaminam no teste de resistência). No contexto do *M. bovis*, deve-se ainda considerar a resistência natural à pirazinamida por mutações no gene *pncA* e *OxiR* (Hannan et al., 2001), tornando o *M. bovis* naturalmente resistente a esta droga.

Para verificar a resistência das 164 culturas positivas de *M. bovis* isoladas, o Método das Proporções (Kantor, 1986) com diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foi aplicado em uma parcela das amostras (29 da bacterioteca do Instituto Biológico-SP), mas mostrou-se trabalhoso e não indicativo de baixa resistência. O Método das Proporções convencionalmente envolve diluições da micobactéria e cultivo em 8 tubos de LJ por cada diluição testada, ou seja, quatro com INH e quatro sem INH. Esses procedimentos não indicaram nenhum

crescimento de 29 amostras de *M. bovis* no LJ com 0,2µg de INH, mesmo na diluição mais concentrada ( $10^{-1}$ ). A adaptação do Método das Proporções para as 135 amostras seguintes, com reduzida concentração de INH (0,1 µg de INH/mL de Meio de cultura 7H11) e aumento do inoculo de amostras de *M. bovis* isoladas (uma alça de 0,2µl  $\geq 1 \times 10^6$  bacilos) visou uma seleção prévia de amostras que mostrassem qualquer resistência à INH (Kantor & Leslie, 1974).

Desta forma, a utilização de inoculo e concentração fixa de droga (0,1 µg de INH/mL) em tubos de meio de cultura 7H11 foi utilizada para verificar a resistência das 135 amostras isoladas, que apresentaram crescimento somente nos tubos correspondentes a 4 amostras inoculadas. A utilização do meio de cultura 7H11 para incorporação da INH é recomendação da literatura, que cita o 7H11 inclusive para primo isolamento de *M. bovis* (Corner & Nicolacopoulos, 1988; Corner, 1994).

Para as amostras *M. bovis* resistentes à INH isoladas, a prova negativa para catalase e crescimento na presença de TCH foram indicativos complementares da resistência. Estas observações já estão descritas na literatura (Kantor, 1986, Guerrero et al., 1997). Para confirmar a resistência à INH nas quatro amostras INH resistentes encontradas, pois a concentração inicialmente utilizada de 0,1µg/mL de INH não é considerada a concentração crítica, as amostras INH resistentes foram enviadas ao Laboratório de Tuberculose do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP. Neste Instituto foi realizado o Método do MIC (Método da Concentração Inibitória Mínima) e verificada, para as quatro amostras, uma resistência de 0,2 µg/mL à INH. Confirmando a correlação entre estes métodos de avaliação da resistência (Método das Proporções e MIC) conforme a European Society for Mycobacteriology (Collins et al., 1997).

Para determinação estatística do tamanho da amostragem a ser testada quanto a resistência à INH, foram utilizados como referência os dados da OMS (Lazlo e Kantor, 1994) em pesquisa de amostras isoniazida (INH)

\* Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, USA

resistentes de *M. tuberculosis* na América Latina. Nesta pesquisa, Lazlo e Kantor (1994) observaram que, em 948 amostras de *M. tuberculosis*, havia resistência à isoniazida em 1 de cada 15 amostras selecionadas. A partir desses dados, foram comparados os resultados obtidos utilizando o Teste de Estudo Descritivo Randomizado Não Agrupado (Kish & Leslie, Survey Sampling, John Wiley & sons, NY, 1965) recomendado pelo programa EPI-INF096 {formula: Sample Size =  $n/(1-(n/population))$ ;  $n = Z^2 * P(1-P)/(D^2 * D)$  }. Este indicou que em 151 amostras deveria ser encontrada pelo menos uma cepa resistente à INH com nível de confiança de 99,9% e erro aceitável de 1%. A relação também foi testada utilizando o Teste de  $\chi^2$  com 1 grau de liberdade.

Quanto a resistência à INH citada na literatura, os dados mundiais indicam para *M. tuberculosis* média de 4, 1% (Cohn, et al., 1997), enquanto para A. Latina é estimado 6,64% (Lazlo e Kantor, 1994). As taxas de resistência obtidas para amostragem realizada (164 amostras) foram de 1 amostra resistente para cada 40 LTTs (2,4%). Embora a média obtida (1:40) de resistência à INH para *M. bovis* não se aproxime numericamente da média sul-americana encontrada para *M. tuberculosis* (1:15) por Lazlo e Kantor (1994), quando comparados estatisticamente os dois experimentos não são significativamente diferentes. Isto foi evidenciado pelos testes estatísticos EPINFO96 e Teste de  $\chi^2$  (1 grau de liberdade), onde era esperado que em 151 amostras seria encontrada pelo menos uma cepa resistente à INH com nível de confiança de 99,9% e erro aceitável de 1%.

Os dados obtidos destacam a importância sanitária do achado, pois há o risco da transmissão destas amostras INH resistentes para outros animais e para homem, conforme resultados encontrados por van Soolingen et al. (1994), utilizando o RFLP-PGRS para rastreamento epidemiológico de amostras de *M. bovis* entre espécies animais e o homem.

Na América Latina, a resistência de *M. bovis* à antibioticoterapia e seus riscos para saúde pública foram pesquisados em 27 diferentes cepas de *M. bovis* por Kantor e Lesslie (1974). Estes autores verificaram resistência natural à

INH em concentrações de *M. bovis* acima de  $10^6$  micobactérias/ml para certas cepas utilizando o Método das Proporções com concentração fixa de  $0,2 \mu\text{g}$  de INH /mL de LJ. Isto também foi verificado para as condições de teste das 135 amostras isoladas neste trabalho, pois o inoculo proposto de semeadura (alça de  $0,2 \mu\text{l}$  = Padrão nº1 Escala McFarland) correspondeu a uma concentração aproximada de igual ou mais  $10^6$  bacilos/ml (Kantor, 1986) e foi encontrada resistência para 4 amostras isoladas.

A resistência do Complexo *M. tuberculosis* à antibioticoterapia no Brasil da última década tem oscilado entre 10 e 15% dos pacientes humanos tratados (Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 1994, MS), verificando-se amostras multidroga resistentes para o *Mycobacterium tuberculosis* (Ferrazolli et al., 1995; Morris et al., 1995) frente à estreptomicina (genes *rpsL* e *rrs*), rifampicina (gene *rpoB*) e isoniazida (genes *katG* e *inhA*). Quanto ao *M. bovis* no Brasil, Corrêa & Corrêa (1974) mesmo apresentando um dado isolado, sem identificar a fonte de infecção, observaram três amostras (1,5%) de *M. bovis* multirresistentes em estudo com 200 amostras de micobactérias isoladas de tuberculose humana.

A literatura cita o tratamento de bovinos tuberculosos com algumas observações. Langenegger et al. (1991), em trabalho referência para o tratamento da tuberculose bovina com INH, verificou falha na monoantibioticoterapia de 3,6% dos animais tratados. Mesmo em condições de eficiência de 100% do tratamento, Leite e Lage (1999) destacam a necessidade de "serem realizados maiores estudos, principalmente em relação ao aparecimento de amostras resistentes à droga". Casos clínicos de *M. bovis* multirresistente à antibioticoterapia foram registrados principalmente em pacientes humanos imunodeprimidos, HIV positivos (Blázquez et al., 1997; Guerrero 1997; Rivero et al. 2001) com transmissão nosocomial destas amostras para paciente imunocompetente também já verificada (Long et al., 1999).

Os mecanismos de resistência à INH vêm sendo observados desde 1954 (Middlebrook, 1954; Winder, 1964; Zhang et al., 1992;1993;

Banerjee et al., 1994; Bergler et al., 1994; Dessen et al., 1995; Wilson et al., 1995, 1996; Pfyffer, 2000; Slayden e Barry, 2000; Sachi et al., 2001) e ainda não estão totalmente esclarecidos (Heym et al., 1995). Mais recentemente, alguns autores situaram estes mecanismos de resistência à INH como multifatoriais e associados a mutações nos genes *katG*, *inhA*, *kasA* e *OxiR-ahpc* (Pfyffer, 2000; Slayden e Barry, 2000). Nas amostras analisadas, é provável a mutação no gene *inhA*, pois as mesmas verificaram-se resistentes frente à etionamida (Tabela 2) e negativas frente ao teste da catalase (Zhang et al., 1992; 1993). Esta observação também foi verificada por Banerjee et al. (1994) quando clonou e seqüenciou o gene *inhA* e determinou resistência à etionamida comumente associada a resistência à INH, pois ambas têm como sítio de ação a síntese de ácidos micólicos do Complexo *M. tuberculosis*. Já a resistência observada à estreptomicina nesta pesquisa, geralmente está associada a redução da associação do 16S rRNA e a proteína S12 ribossomal (Cooksey et al., 1996,) devido a mutações respectivamente nos genes denominados *rrs* (16S rRNA) *rpsL* (S12 ribossomal). Mais recentemente, Sechi et al., (2001) destaca a concomitância de resistência de 22 cepas de *M. bovis* resistentes à isoniazida e rifampicina em rebanhos bovinos da Sardenha, Itália, indicando novamente o aspecto multifatorial da resistência à INH.

### 5.3 Extração de DNA do Complexo *M. tuberculosis* com tiocianato de guanidina e PCR diretamente de LTTs

A principal barreira para o uso de sondas moleculares específicas na identificação de microrganismos direto de material clínico tem sido a deficiência na extração de ácidos nucléicos (Boom et al., 1999). Isto é válido também para a utilização de sondas moleculares na identificação de micobactérias, pois possuem alta especificidade mas pouca sensibilidade (Butcher et al., 1996). A utilização da PCR com iniciadores IS6110 para identificar o Complexo *M. tuberculosis* pode oferecer especificidade e sensibilidade de 95 a 100% (Noordhoek et al., 1994) pois a utilização de iniciadores específicos citados na literatura para *M. bovis* (Rodriguez et al., 1999) não

amplificam 100% das amostras de *M. bovis* (Sechi et al., 2000).

A eficiência de processos para extração de DNA já foi estudada (Zanini et al., 2001, 1998a, 1998b, Genelhu et al., 1998). Dentre os métodos analisados para este fim, os melhores resultados obtidos foram para a extração de DNA do Complexo *M. tuberculosis* com tiocianato de guanidina seguido de PCR. Dentre as primeiras 54 LTTs processadas e analisadas, registrou-se cultivo positivo para 23 LTTs (42,5%), contaminações e ausência de crescimento em 31 LTTs. Entretanto, a técnica de PCR aplicada aos DNAs obtidos das mesmas 54 LTTs indicou o Complexo *M. tuberculosis* em 38 LTTs, correspondendo a 70,3% de resultados positivos (Zanini et al., 2001). O aumento na identificação positiva por PCR (15 LTTs, 27,8%) dentre cultivos negativos ou contaminados (31 LTTs) deve-se particularmente à eficiência de digestão do tiocianato de guanidina (Fluka Chemie, Suíça, código 50990) associado ao provável efeito bloqueador de nucleases exercido pela presença de  $\alpha$  caseína (Boom et al., 1999). Geralmente, a extração de DNA pelo tiocianato de guanidina associado ao fenol-clorofórmio de tecidos inflamados com grande presença de eosinófilos não é bem sucedida pela insuficiente remoção de nucleases (Kodavanti et al., 1996) Em nosso trabalho, a extração de DNA e posterior PCR com tiocianato de guanidina de outras fabricantes não obteve sucesso. Resultados semelhantes também foram verificados por Boom et al. (1990; 1999) para diversos DNAs e Kox et al. (1994) especificamente para o Complexo *M. tuberculosis*. Entretanto, para *M. bovis* os únicos resultados apresentados na literatura foram de Zanini et al. (2001). Também não foi possível a realização de RFLP deste DNA extraído por tiocianato de guanidina, pois o mesmo apresentou-se bastante degradado. Há necessidade de futuras pesquisas afins para dominar com maior eficiência o diagnóstico direto de material clínico utilizando particularmente CTAB e tiocianato de guanidina no processo de extração de DNA.

#### 5.4 Polimorfismos genômicos

##### *Perfis de spoligotyping*

Na Figura 2, cada número à esquerda representa um *spacer* (DR) presente na amostra (*spacers* 1-43). O ponto em preto indica a hibridização entre o produto amplificado por PCR e seu *spacer* correspondente na membrana. Foram realizados 35 PCRs de diferentes amostras para amplificação de seus *spacers*. Os perfis de *spoligotyping* predominantes (Tabela 3) entre amostras de animais abatidos em frigoríficos de região leiteira-mista (SIF3030; Sabará-MG, Divinópolis-MG) foram diferentes dos perfis encontrados para animais abatidos em frigorífico de predominância de gado de corte (SIF0504; Ituiutaba - MG e SIF0506; Colatina - ES). Verificou-se nas amostras isoladas de populações de gado de leite maior frequência de três perfis (G1, G2 e G10) e, para gado de corte, perfis variados, indicando que a heterogeneidade no rebanho brasileiro leiteiro, grande maioria cruzamento entre as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus* pode ter características próprias quanto a suscetibilidade ao *M. bovis*.

O cruzamento dos *spoligotyping* obtidos neste trabalho, com os perfis observados por Zumarraga et al. (1999) registra a ausência de hibridização com os *spacers* nº 3, 9, 16, e 39 a 43 como típica de amostras de *M. bovis* da América do Sul. Zumarraga et al. (1999) também descreveram, para amostras brasileiras, os perfis observados atualmente neste trabalho e denominados G4 (14B, n=11) e G5 (11B, n=2). Entretanto, Zumarraga et al. (1999) também verificaram outros perfis para a América Latina (Argentina, Paraguai e Uruguai; perfis G6 e G7) que foram observados no Brasil somente agora, neste trabalho. Os perfis 28B e 44B também observados para amostras brasileiras por Zumarraga et al. (1999) não foram encontrados entre amostras deste trabalho. O perfil G9 observado neste trabalho sugere identidade com amostra bovina europeia identificada por Gutierrez et al. (1997). Para os perfis G3 e G8 não foram encontrados similares na literatura pesquisada, parecendo serem particulares das amostras brasileiras até o momento. Certamente, os perfis de amostragens brasileiras observadas representam uma parcela dos 1,3% de

tuberculose bovina estimada pelo PNCEBT (2001) para o rebanho nacional de cento e cinquenta milhões de cabeças.

O perfil de G1, com ausência de hibridização nos lócus nº 3, 9, 16, 37 e 39 a 43 corresponde a uma das amostras resistentes à INH e está representado 14 vezes (maior frequência) em amostras principalmente de regiões leiteira e mista (Tabela 3). Este perfil com particular ausência no lócus 37 já foi observado por Aranaz et al (1996) em 9 amostras espanholas e Njanpop-Lafourcade (2001) em 2 amostras de Camarões, mas não eram *M. bovis* INH resistentes. O mesmo ocorre com o outro perfil de amostra INH resistente (G2, n=6) e identidade de perfil com amostra BCG, observado por Zumarraga et al. (1999) em 7 amostras (12A) de bovinos e uma amostra humana e Haddad et al. (2001) em 350 amostras (França), mas sem registro de resistência à isoniazida. Entretanto, Samper et al. (1997) e Blazquez et al. (1997), em surto em pacientes HIV positivos na Espanha, verificaram 16 amostras de *M. bovis* multirresistentes com o mesmo perfil (ausência de hibridização nos lócus 3 à 6, 9, 16, e 39 a 43), que difere do perfil G1 encontrado neste trabalho (ausência diferenciado de *spacer* 37). Não foram encontrados na literatura outros registros de perfil de *spoligotyping* para amostras INH resistentes isoladas de bovinos. Niemman et al (1999) sugere que o *spoligotyping* seja menos sensível do que o RFLP para identificar alterações genômicas resultantes de resistência a antibióticos, pois rearranjos de lócus quando de deleções não são percebidos pelo *spoligotyping*, sendo que os resultados observados neste trabalho confirmam esta hipótese. Desta forma, o *spoligotyping* mostrou-se o teste ideal para monitorar amostras de *M. bovis* em populações (Kamerbeek et al., 1997), quando evidenciam perfis diferenciados dentre as amostras de rebanhos leiteiros ou de corte, mas pouco preciso para diferenças pontuais, pois não caracterizou amostras INH resistentes. Também há necessidade de pesquisar os perfis de *spoligotyping* de amostras de *M. bovis* presentes na população humana latino-americana, pois 1% da tuberculose humana na população da América Latina é causada por *M. bovis* (Kantor & Rittaco, 1994); assim, pode-se determinar o bovino ou o próprio homem como

fonte de infecção. Nestas condições o *spoligotyping* poderá ser ferramenta no rastreamento epidemiológico do *M. bovis* na população humana e animal.

#### *Perfis de RFLPs pesquisadas*

Foram observados alguns parâmetros críticos para a detecção dos perfis de RFLP, entre eles: a concentração de sal (NaCl, MgCl<sub>2</sub>) no ácido nucléico deve estar abaixo de 50mM; a concentração de DNA para marcação (sonda) deverá ser ajustada para 10ng/μl; o DNA a ser marcado como sonda deverá estar em fita simples; e a enzima para marcação de sonda não deve ser desnaturada antes da adição do *buffer* de hibridização.

#### Polimorfismos de IS6110

A partir desta análise foram obtidos perfis com 1 a 4 fragmentos de IS6110, utilizando como sonda um fragmento de 245 bp de IS6110 (Zanini et al. 2001). O perfil predominante de RFLP, A01 (41 amostras, 68,3 %), foi de uma única banda de 1,9 kb (Figura 3). A predominância deste perfil em percentuais que oscilam entre 60 e 90% frente a sondas diversas de IS6110 já vem sendo observada para *M. bovis* por diversos autores (Zanini et al. 2001, Romano et al 1996, Gutierrez 1995, van Soolingen 1994). Este perfil foi particularmente freqüente em amostras proveniente de regiões de criação de gado de corte. Conforme van Soolingen et al., (1994) perfis variantes com presença de 2 ou mais cópias de IS6110 (Figura 3) em amostras de *M. bovis* têm origem geralmente em animais selvagens e no homem, sendo observados neste estudo em regiões de gado leiteiro e criação mista. Particularmente, algumas amostras de BCG possuem duas cópias de IS6110 (Fomukong et al. 1992).

Desta forma, a IS6110 tem baixo valor discriminatório na diferenciação de cepas de *M. bovis* no rebanho bovino em geral. Entretanto, Cousins et al. (1998) recomenda iniciar o rastreamento epidemiológico molecular de amostras de *M. bovis* com esta sonda para posteriormente utilizar testes de maior poder de diferenciação. As quatro amostras INH resistentes apresentaram-se com uma única banda 1,9 kb, mostrando-se um teste não discriminatório para as amostras *M. bovis* INH resistentes.

Outros autores identificaram uma ou mais cópias de IS6110 (1,9 kb; 2,4 kb) em amostras *M. bovis* INH resistentes isoladas de humanos (Guerrero et al., 1997; Blazquez et al., 1997; Samper et al., 1997), mas a sonda IS6110 não foi diferencial entre amostras quando foi observado somente um fragmento de IS6110. Assim sendo, este trabalho não sugere correlacionar perfil de RFLP e resistência à INH para *M. bovis* quando da utilização de sonda IS6110, pois o IS6110 comporta-se como um transposon, principalmente no *M. tuberculosis* (Yuen, 1995).

#### Polimorfismos de PGRS

No rastreamento de grupos populacionais, o RFLP-PGRS das amostras de *M. bovis* encontradas apresentaram-se com dezoito perfis (Figuras 4A, 4B). Estes foram aglutinados em 6 grupamentos em função do número que variou de 6 a 11 fragmentos de PGRS hibridizados (Figura 7). Segundo Cousins et al. (1998), a quantidade de fragmentos hibridizados é um referencial de diferenciação, pois indica o tamanho em bp (quantidade de nucleotídeos) e número de fragmentos ricos em C-G que a amostra contém. Nas amostras estudadas (n=60) foram avaliados fragmentos acima de 1,9 kb para comparar com perfis já descritos na literatura (Cousins et al., 1998). Foi constatado um perfil mais uniforme para amostras provenientes de regiões de gado de corte (Triângulo Mineiro), onde 72 % apresentaram-se com 7 ou 10 fragmentos de PGRS. Para as regiões de gado leiteiro e misto, não foi possível associar um perfil com determinada área geográfica, indicando uma maior heterogeneidade de cepas para estas regiões tal qual foi observado quando do uso da sonda IS6110.

Comparando-se com os perfis gerados por amostras citadas na literatura (Roring et al., 1998; Costello et al., 1999; Romano et al., 1996; Kremer et al., 1999; van Soolingen et al. 1994), percebe-se entre as amostras isoladas neste trabalho (16,6 %) uma maior freqüência de hibridização com fragmentos de alto peso molecular (acima de 5,5 Kb). Em relação ao *spoligotyping*, percebe-se que o RFLP-PGRS gera muitos perfis genômicos (Cousins et al., 1998). O RFLP-PGRS mostrou-se como melhor indicador para diferenciação entre

amostras específicas. Desta forma, o estudo permitiu inferir a transmissão horizontal da *M. bovis* INH resistente entre animais, evidenciada nas amostras INH resistentes (Figura 5) quando o RFLP-PGRS indicou 3 perfis de amostras resistentes, apresentando o mesmo perfil nas amostras 26 e 27. Estes perfis apresentam diferenças distintas com os observados para amostras *M. bovis* INH resistentes por outros autores (Guerrero et al., 1997; Blazquez et al., 1997; Samper et al., 1997). Portanto, os resultados observados neste trabalho mostraram, em diferentes circunstâncias, o RFLP-PGRS como ferramenta útil no rastreamento epidemiológico de amostras de *M. bovis*, mas não como indicador absoluto para gerar e identificar perfis ou marcadores exclusivos de resistência à INH.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com as condições experimentais e os resultados obtidos, pode-se concluir em relação ao polimorfismo e à resistência à isoniazida do *Mycobacterium bovis* no Brasil que:

- existem amostras naturalmente resistentes à isoniazida infectando bovinos;
- não se observa um perfil típico de RFLP e *spoligotyping* como indicador de resistência à INH;
- o RFLP-PGRS permite diferenciação entre amostras isoladas, mas dificulta o agrupamento de amostras;
- o *spoligotyping* mostrou mais efetivo para o agrupamento dos perfis e menos sensível para diferenciação entre as amostras isoladas;
- o PCR com extração de DNA pelo tiocianato de guanidina mostrou-se mais eficiente do que a cultura na indicação do Complexo *M. tuberculosis* e
- o DNA extraído pelo tiocianato de guanidina não pode ser utilizado para o RFLP e *spoligotyping*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANAZ, A; LIEBANA, E; MATEOS, A et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.11, p.2734-2740, 1996.
- BANERJEE, A; DUBNAU, E; QUEMARD, A et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.263, n.1, p.227-230, 1994.
- BERGLER, H; WALLNER, P; EBELING, A et al. Protein EnvM is the NADH-dependent enoyl-ACP reductase (FabI) of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.5, p.5493-5496, 1994.
- BLÁZQUEZ, J; MONTEROS, LEE; SAMPER, S et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.6, p. 1390-1393, 1997.
- BOOM, R; SOL, CJA; SALIMANS, MMM et al. Rapid and simple method of purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, n.4, p.495-503, 1990.
- BOOM, R; CEES, S; BELD, M et al. Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha-casein to silica particles. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.3, p.615-619, 1999.
- BUTCHER, PD; HUTCHINSON, NA; DORAN, TJ et al. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. Soc Appl Bacteriol Symp Ser. **J. Appl. Bacteriol.**, v.81, n.2, p.250-262, 1996.(Suplement 2)
- COHN, DL; BUSTREO, F; RAVIGLIONE, MC et al. drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. **Clin Infect Dis.**, v.24, n.1, p.S121-S130, 1997. (Suplement 1)

- COLLINS, CH; GRANGE, JM; YATES, MD. **Tuberculosis bacteriology: organization and practice.** 2 ed. London, Butterworth-Heinemann, 1997. 215p.
- CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Vet Microbiol.**, v. 40, n.1, p. 53-63, 1994.
- CORNER, LA; NICOLACOPOULOS, C. Comparison of media used for primary isolation of *Mycobacterium bovis* by veterinary and medical diagnosis laboratories. **Austr. Vet. J.**, v.65, n.2, p.202-205, 1988.
- COOKSEY, RC; MORLOCK, GP; McQUEEN, A et al. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.40, n.5, p.1186-1188, 1996.
- CORREA, CN; CORREA, WM. Tuberculose humana por bacilo bovino em São Paulo. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v. 43, n.3, p.131-134, 1974.
- COSTELLO E; O'GRADY, D; FLYNN, O et al. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.10, p.3217-3222, 1999.
- COUSINS, D; WILLAMS, S; LIEBANA, E et al. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.7, p.168-178, 1998.
- DESSEN, A; QUEMARD, A; BLANCHARD, JS et al. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v.267, n.3, p.1638-1641, 1995.
- FERRAZOLI, L; PALACI, M; TELLES, MAS et al. Catalase expression, *katG*, and MIC of isoniazid for *Mycobacterium tuberculosis* isolates from São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v.171, n.1, p.237-240, 1995.
- FOMUKONG, NG; DALE, JW; OSBORN, TW et al. Use of gene probes based on the insertion sequence IS986 to differentiate between BCG vaccine strains. **J. Appl. Bacteriol.**, v.72, n.4, p.126-133, 1992.
- GARZA-GONZALEZ, E; GUERRERO-OLAZARAN, M; TIJERINA-MENCHACA, RV et al. Determination of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* through mycolic acid analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.5, p.1287-1289, 1997.
- GOH, KS; LEGRAND, E; SOLA, C et al. Rapid differentiation of "*Mycobacterium canettii*" from other *Mycobacterium tuberculosis* Complex organisms by PCR-restriction analysis of the *hsp65* gene. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.10, p.3705-3708, 2001.
- GENELHU, MS; ZANINI, MS; VELOSO, IF et al. Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n.9, p.1129-1132, 1998.
- GORDON, SV; BROSCHE, R; BILLAULT A et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Mol. Microbiol.**, v.32, n.3, p.643-655, 1999.
- GRANGE, JM., YATES, M. D., KANTOR, IN. **Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex.** 2. ed. New York, WHO/EMC/ZOO/96.4, 1996.
- GUERRERO A; COBO, J; FORTUN, J et al. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. **Lancet**, v. 350, n.12, p.1738-1742, 1997.
- GUTIÉRREZ, M; SAMPER, S; JIMÉNEZ, MS et al. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.5, p.3328-3330, 1997.
- HADDAD, N; OSTYN, A; KAROUI, C et al. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* isolated in France from 1979 to 2000. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.10, p.3623-3632, 2001.
- HANNAN, MM; DESMOND, ED; MORLOCK, GP et al. Pyrazinamide-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* the



United States. 2001, *J. Clin. Microbiol.*, v.39, n.7, p.647-650, 2001.

HEYM, B; ALZARI, PM; HONORÉ, N; COLE, ST. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* v. 15, n.2, p.235-245, 1995.

KAMERBEEK, J; SCHOOLS, L; KOLK, A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.4, p.907-914, 1997.

KANTOR, IN; LESLIE, IW. Isolation of mutants resistant to antituberculous drugs in wild strains of *M. bovis*. *Medicina* (B. Aires), v.34, n.3, p.244-248, 1974.

KANTOR, IN. *Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal* (Serie de Monografías Científicas y Técnicas-11/Rev1), Buenos Aires. Centro Panamericano de Zoonosis-CEPANZO. 1986. 63p.

KANTOR, IN; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.*, v.40, n.1, p.5-14, 1994.

KODAVANTI, UP; JASKOT, RH; BONNER, J et al. Eosinophilic lung inflammation in particulate-induced lung injury: technical consideration in isolating RNA for gene expression studies. *Exp. Lung Res.* v.22, n.4, p.541-54, 1996.

KOX, LFF; RHIENTHONG, D; MIRANDA AM et al. A more reliable PCR for detection of *M. tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, n.9, 672-678, 1994.

KREMER, K.; van SOOLINGEN, D; FROTHINGHAM, R et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.8, p.2607-2618, 1999.

LANGENEGGER, J; LEITE, GO; OLIVEIRA Jr, J Tratamento intermitente da tuberculose bovina com isoniazida. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.11, n.3, p.55-59, 1991.

LAZLO, A., KANTOR I. A random sample survey of initial drug resistance among tuberculosis cases in Latin America. *WHO*, v.72, n.4, 1994.

LEITE, CQ; SOUZA, CW; LEITE, SR. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.93, n.6, p.801-805, 1998.

LEITE, R.MH., LAGE, AP. Controle da tuberculose em bovinos da raça Sândi pelo tratamento com isoniazida: avaliação e análise de custos. *Ciênc. Vet. Tróp.*, v.2, n.1, p.21-28, 1999.

LIÉBANA, E; ARANAZ, A; MATEOS, A et al. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.6, p.33-36, 1995.

LONG, R; NOBERT, E; CHOMYC, S et al. Transcontinental spread of multi-drug-resistant *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, v.159, n.61, p.2014-2017, 1999.

MIDDLEBROOK, G; COHN, ML. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science*, v.118, n.9, p.297-299, 1954.

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

MORRIS, S; BAI, GH; SUFFYS P et al. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.*, v.171, n.4, p.954-960, 1995.

NEILL, SD; POLLOCK, JM; BRYSON, DB. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection on cattle. *Vet. Microbiol.*, v.40, n.1, p.41-52, 1994.

- NIEMANN S; RICHTER, RUSCH-GERDES S. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analysing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.11, p.409-412, 1999
- NJANPOP-LAFOURCADE, BM; INWALD, J; OSTYN, A et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Cameroon. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.1, p.222-227, 2001.
- NOORDHOEK, G; KOLK, A; BJUNE, G et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.2, p.277-284, 1994.
- PFYFFER, G. Antimicrobial susceptibility testing in the management of multidrug-resistant tuberculosis. In: INTERNATIONAL ASSOCIATION OF PHYSICIANS IN AIDS CARE, **IAPAC Symposium**, 1999, Vienna. Chicago: IAPAC Publications, 1999.
- REIS, R. Controle da tuberculose bovina em alguns países. 1965. **Arq. da Esc. de Vet.** Universidade Federal de Minas Gerais, v.18, 1965. (Separata)
- PROGRAMA Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal-PNCEBT. **Diário Oficial da União**, 16/01/2001. Instrução Normativa n.2, 10 janeiro 2001.
- RIVERO, A; MARQUEZ, M; SANTOS, J et al. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. **CID**, v.32, n.2, p.159-161, 2001.
- RODRÍGUEZ, JG; FISSANOTI, JC; PORTILLO, P et al. Amplification of a 500-base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.7, p.2330-2332, 1999.
- ROMANO, MI; ALITO, A; FISSANOTTI, JC et al. Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. **Vet. Microbiol.**, v.50, n.1, p.59-71, 1996.
- RORING, S; BRITAIN, D; BUNSCHOTEN, E et al. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. **Vet. Microbiol.**, v.61, n.1, p.111-120, 1998.
- ROXO, E; PINHEIRO, SR; SAKAMOTO, SM et al. Isolamento de *Mycobacterium bovis* apartir de lesões de bovinos e bubalinos em matadouro. **Arq. Inst. Biol.**, v.66, n.1, p.33, 1999. (Suplemento 1)
- SECHI, LA; DUPRE, I; LEORI, G et al. Distribution of a specific 500-base-pair fragment in *Mycobacterium bovis* isolates from Sardinian cattle. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.10, p.3837-3839, 2000.
- SECHI, LA; ZANETTI, S; SANGUINETTI, M et al. Molecular basis of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n.6, p.1645-1648, 2000
- SAMPER, S; MARTIN, C; PINEDO, A et al. Transmisión between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *M. bovis*. **AIDS**, v.11, n.10, p.1237-1242, 1997.
- SEPKOWITZ, K; RAFFALLI, J; RILEY, I et al. Tuberculosis in the AIDS era. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n.2, p.180-199, 1995:
- SLAYDEN, RA; BARRY, CE. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microb Infec.**, v.2, n.1, p.659-669, 2000.
- VAN SOOLINGEN, D; HAAS, PEW; HAAGSMA, J et al. Use of various genetic markers in differentiation of *M. bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.10, p.2425-2433, 1994.
- WILSON, TM; DE LISLIE, GW; COLLINS, DM. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. **Mol. Microbiol.** v.15, n.15, p.1009-1005, 1995.
- WILSON, T.M. & COLLINS D.M. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the

*Mycobacterium tuberculosis* complex. **Mol. Microbiol.**, v.19, n.5, p.1025-1034, 1996.

WINDER, F. The antibacterial action of streptomycin, isoniazid, and PAS. In: Barry, VC. **Chemotherapy of tuberculosis**. London: Butterworths, 1964. p. 111-149

YUEN, KY; CHAN, CM; CHAN, SK et al. IS6110 based amplifying assay and RFLP fingerprinting of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Pathol.**, v.48, n.7, p.924-928, 1995.

ZHANG, Y; GARBE, T; YOUNG, D. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. **Mol. Microbiol.**, v.8, n.11, p.521-524, 1993.

ZHANG, Y; HEYM, B; BRYAN, ADY et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v.358, n.8, p.591-593, 1992.

ZANINI, MS., MOREIRA, EC., LOPES, MTP., et al. *Mycobacterium bovis*: Polymerase chain reaction. Identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism.

**Mem. Inst. O. Cruz**, v.96, n.6, p.809-813, 2001.

ZANINI, MS., MOREIRA EC., LOPES MTP., et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polymerase chain reaction. **J. Vet. Med., Serie B**, v.45, n.8, p.473-480, 1998.

ZUMARRAGA, MJ; MARTI, C; SAMPER S et al. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* related infections in South America. **J. Clin. Microbiol.** v.37, n.2, p.296-303, 1999.

Anexos

Lesões tipo tuberculosas(LTTs) coletadas e analisadas entre agosto/1998 e novembro/2000

Nº da amostra: Frigorífico	mês- ano- n° amostra	PCR	1º repique	2º repique	3º repique	4º repique	INH 0,1 µg/mL 7H11	observações
01.SIF:0504	08-98-01	neg	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
Ituiutaba - MG								
02.	08-98-02	pos	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
03.	08-98-03	pos	contaminação	positivo	positivo	positivo	neg	
04.	08-98-04	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contam	neg	atípica
05.	08-98-05	pos	contaminação	negativo	negativo	negativo	neg	
06.	08-98-06	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contam	neg	atípica
07.IS6110-spol-PGRS	08-98-07	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg	mba19-88
08.	08-98-08	pos	negativo	positivo	positivo	positivo	neg	
09.	08-98-09	pos	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
10. SIF3030 Sabará-MG	08-98-10	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
11.	08-98-11	pos	contaminação	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
12.	08-98-12	neg	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
13. Divinópolis-MG (municipal)	08-98-13	neg	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
14.	08-98-14	pos	contaminação	positivo	positivo	positivo	neg	
15. SIF:0504	09-98-01	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg	
16.	09-98-02	pos	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
17. IS6110-PGRS	09-98-03	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg	
18.	09-98-04	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
19.SIF:3030-IS6110-spol-PGRS	09-98-05	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg	mba65-g10
Divinópolis								
20.Divinópolis	09-98-06	pos	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
21.	09-98-07	pos	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
22. SIF:3030	10-98-01	pos	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
23.	10-98-02	pos	contaminação	positivo	positivo	positivo	neg	
24.	10-98-03	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg	
25.	10-98-04	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg	
26. SIF:3030	10-98-05	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg	
27.	10-98-06	neg	contaminação	negativo	negativo	negativo	neg	atípica
28. SIF:0506	10-98-07	pos	negativo	negativo	negativo	negativo	neg	
Colatina - ES								

29.	10-98-08	pos	positivo	positivo	negativo	negativo	neg
30.	10-98-09	pos	positivo	positivo	positivo	contaminado	neg
31. Divinópolis	10-98-10	pos	negativo	contaminação	contaminação	contam	neg
32. IS6110-spol-PGRS	10-98-11	pos	positivo	positivo	contaminação	contam	neg
33. SIF:0504	11-98-01	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contam	neg
34. IS6110-PGRS	11-98-02	pos	positivo	positivo	positivo	neg	neg
35.	11-98-03	pos	negativo	negativo	positivo	neg	neg
36.	11-98-04	pos	positivo	positivo	positivo	contam	neg
37. SIF:3030	11-98-05	neg	contaminação	contaminação	contaminado	neg	neg
38.	11-98-06	pos	contaminação	contaminação	contaminação	neg	neg
39. Divinópolis	11-98-07	pos	contaminação	positivo	positivo	neg	neg
40. SIF:0506	11-98-08	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	neg
41.	11-98-09	pos	positivo	contaminação	positivo	neg	neg
42. SIF:0504 IS6110-PGRS.	12-98-01	pos	positivo	positivo	positivo	neg	neg
43.	12-98-02	pos	negativo	negativo	negativo	neg	neg
44.	12-98-03	pos	contaminação	contaminação	contaminação	neg	neg
45. SIF:3030	12-98-04	neg	negativo	negativo	negativo	neg	neg
46. IS6110-spol-PGRS	12-98-05	pos	positivo	positivo	positivo	mba68-g10	neg
47. Divinópolis-IS6110-spol-PGRS	12-98-06	pos	negativo	positivo	positivo	mba69-g1	neg
48. SIF:0506	12-98-07	neg	contaminação	contaminação	contaminação	atfpica	neg
49.	12-98-08	neg	negativo	negativo	negativo	neg	neg
50. SIF:0504-IS6110-spol-PGRS	01-99-01	pos	positivo	positivo	positivo	mba74-g4	neg
51.	01-99-02	neg	contaminação	contaminação	negativo	neg	neg
52.	01-98-03	neg	negativo	negativo	negativo	neg	neg
53. IS6110-spol-PGRS	01-99-04	pos	positivo	positivo	positivo	mba82-g9	neg
54.	01-99-05	pos	contaminação	negativo	negativo	neg	neg
55. SIF:3030	01-99-06	neg	negativo	negativo	positivo	neg	neg
56.	01-99-07	pos	positivo	contaminação	negativo	neg	neg
57. Divinópolis	01-99-08	neg	contaminação	contaminação	negativo	neg	neg
58. SIF:0506	01-99-09	neg	contaminação	contaminação	negativo	neg	neg
59. SIF:0504-IS6110-PGRS.	02-99-01	pos	positivo	positivo	positivo	neg	neg
60.	02-99-02	neg	negativo	negativo	negativo	neg	neg
61. IS6110-PGRS.	02-99-03	pos	positivo	positivo	negativo	neg	neg
62. SIF:3030	02-99-04	neg	contaminação	contaminação	contaminação	atfpica	neg
63.	02-99-05	pos	positivo	positivo	positivo	neg	neg

64. Divinópolis	02-99-06	pos	negativo	positivo	positivo	positivo	neg
65. SIF:0506	02-99-07	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
66.	02-99-08	pos	positivo	contaminação	contaminação	contaminação	neg
67. SIF:0504	03-99-01	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contaminação	neg
68.	03-99-02	pos	contaminação	positivo	positivo	positivo	neg
69.	03-99-03	neg	negativo	negativo	negativo	negativo	neg
70. IS6110-PGRS.	03-99-04	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
71. IS6110-PGRS.	03-99-05	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
72. SIF:3030	03-99-06	neg	negativo	negativo	negativo	negativo	neg
73. IS6110-PGRS	03-99-07	pos	positivo	positivo	contaminação	contaminação	neg
74. SIF:0504	04-99-01	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contaminação	neg
75. IS6110-PGRS.	04-99-02	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
76. Divinópolis	04-99-03	neg	negativo	negativo	negativo	negativo	neg
77.	04-99-04	pos	positivo	contaminação	contaminação	contaminação	neg
78.	04-99-05	neg	negativo	negativo	negativo	negativo	neg
79. SIF:0506	04-99-06	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contaminação	neg
80. SIF:0504	05-99-01	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contaminação	neg
81. IS6110-PGRS	05-99-02	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
82. SIF:3030	05-99-03	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
83. SIF:0506	05-99-04	neg	contaminação	negativo	positivo	positivo	neg
84. **S.G. Sapucaí-MG	05-99-05	pos	positivo	positivo	negativo	negativo	neg
85.	05-99-06	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
86. SIF:0504	06-99-01	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
87. IS6110-PGRS.	06-99-02	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
88.	06-99-03	neg	negativo	negativo	negativo	negativo	neg
89. SIF:3030	06-99-04	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
90.	06-99-05	neg	contaminação	contaminação	contaminação	contaminação	neg
91.	06-99-06	pos	positivo	contaminação	contaminação	contaminação	neg
92.	06-99-07	pos	positivo	contaminação	contaminação	contaminação	neg
93. Divinópolis	06-99-08	pos	negativo	positivo	positivo	positivo	neg
94.	06-99-09	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
95.	06-99-10	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
96. SIF:0506	06-99-11	neg	contaminação	negativo	negativo	negativo	neg
97.	06-99-12	pos	contaminação	positivo	positivo	positivo	neg
98. **P. Caldas-MG	07-99-01	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
IS6110-PGRS	07-99-02	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
99.	07-99-03	neg	negativo	contaminação	contaminação	contaminação	neg
100.	07-99-04	pos	positivo	negativo	negativo	negativo	neg
101. SIF:3030	07-99-05	pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg
102.		pos	positivo	positivo	positivo	positivo	neg

103.		07-99-06	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
104.	Divinópolis.	07-99-07	pos	positivo	positivo	positivo	neg	A65
IS6110-PGRS								
105.		07-99-08	neg	contaminação	negativo	negativo	neg	atípica
106.		07-99-09	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
107.		07-99-10	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
108.	SIF:0506	08-99-01	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
109.		08-99-02	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
110.		08-99-03	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
111.**	PocosCaldas-MG	08-99-04	pos	positivo	positivo	positivo	neg	A74
112.	IS6110-PGRS-spol	08-99-05	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
113.		08-99-06	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
114.		08-99-07	neg	contaminação	negativo	negativo	neg	
115.	Divinópolis.	08-99-08	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
116.		08-99-09	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
117.	SIF:0504 IS6110-PGRS.	09-99-01	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
118.		09-99-02	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
119.	Divinópolis.	09-99-03	pos	positivo	positivo	positivo	neg	atípica
120.		09-99-04	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
121.	SIF:0506	09-99-05	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
122.		09-99-06	pos	negativo	positivo	positivo	neg	
123.	SIF:3030	10-99-01	neg	negativo	negativo	positivo	neg	
124.		10-99-02	neg	negativo	negativo	positivo	neg	atípica
125.		10-99-03	neg	contaminação	contaminação	positivo	neg	
126.		10-99-04	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
127.**	Pouso alegre	10-99-05	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
128.	IS6110-PGRS	10-99-06	pos	positivo	positivo	negativo	neg	
129.	IS610-PGRS	10-99-07	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
130.		10-99-08	neg	negativo	negativo	positivo	neg	
131.	Divinópolis.	10-99-09	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
□								
132.	SIF:3030.	02-00-01	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
133.		02-00-02	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
134.		02-00-03	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
135.		02-00-04	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
136.		02-00-05	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	atípica
137.	Divinópolis	02-00-06	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
138.		02-00-07	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
139.	IS6110-PGRS-spol	02-00-08	pos	positivo	positivo	positivo	neg	

140	02-00-09	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	atípica
141	02-00-10	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
142	02-00-11	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
143- IS6110-PGRS - spol	02-00-12	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
144. SIF:0504	03-00-01	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
145.	03-00-02	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
146 **PousoAlegreMG	03-00-03	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
.IS6110-PGRS-spol							
147	03-00-04	neg	contaminação	negativo	negativo	neg	atípica
148 SIF:0504	03-00-05	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
149	03-00-06	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
150 IS6110-PGRS-spol	03-00-07	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
151	03-00-08	pos	positivo	contaminação	contaminação	neg	
152.SIF:3030	03-00-09	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	atípica
153.	03-00-10	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
154-IS6110-PGRS-spol	03-00-11	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
155	03-00-12	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
156	03-00-13	pos	positivo	positivo	contaminação	neg	
157. Divinópolis.	03-00-14	pos	positivo	positivo	contaminação	neg	
158	03-00-15	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
159.	03-00-16	pos	positivo	positivo	contaminação	neg	
160 IS6110-PGRS	03-00-17	pos	positivo	positivo	contaminação	neg	
161 - SIF:0506	03-00-18	neg	negativo	negativo	contaminação	neg	
162.	03-00-19	pos	positivo	positivo	contaminação	neg	atípica
163.	03-00-20	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
164.	03-00-21	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
165 - IS6110-PGRS-spol	04-00-01	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
166 SIF:0504-	04-00-02	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
167	04-00-03	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
168 IS6110-PGRS-spol	04-00-04	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
169 IS6110-PGRS.	04-00-05	pos	positivo	positivo	contaminação	neg	
170	04-00-06	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
171. Divinópolis.	04-00-07	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
172. SIF:0506	04-00-08	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
173. SIF:0504	05-00-01	pos	positivo	negativo	negativo	neg	
174.	05-00-02	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
175.SIF:0506	05-00-03	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
176.	05-00-04	pos	positivo	contaminação	contaminação	neg	
177.	05-00-05	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	atípica
178.**P. Nova -MG	05-00-06	pos	positivo	positivo	positivo	neg	



179.	IS610-PGRS	05-00-07	pos	positivo	positivo		neg	
180.**S.G. Sapucaí		05-00-08	pos	positivo	contaminação		neg	
181.**3Corações MG		06-00-01	neg	negativo	negativo		neg	
182.		06-00-02	neg	contaminação	contaminação		neg	
183.		06-00-03	neg	contaminação	contaminação		neg	
184.	Divin-PGRSspol-6110	06-00-04	pos	positivo	positivo	positivo	pos-g2	A luz
185.		06-00-05	neg	contaminação	contaminação		neg	atípica
186.		06-00-06	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
187.		06-00-07	neg	contaminação	contaminação	negativo	neg	atípica
188.		06-00-08	pos	positivo	contaminação	contaminação	neg	
189.	PGRS - spol-IS6110	06-00-09	pos	positivo	positivo		pos- g1	A luz
190.	SIF:0504	06-00-10	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
191.	IS6110-PGRS.	06-00-11	pos	positivo	positivo	contaminação	neg	
192.		06-00-12	neg	contaminação	contaminação		neg	
193.	SIF:0506	06-00-13	neg	negativo	negativo		neg	atípica
194.		06-00-14	pos	positivo	positivo		neg	
195.	SIF:0504	07-00-01	pos	positivo	positivo		neg	
196.		07-00-02	neg	negativo	negativo		neg	
197.		07-00-03	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
198.	Divinópolis.	07-00-04	pos	negativo	positivo	positivo	neg	
199.	IS6110-PGRS	07-00-05	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
200.	SIF: 0506	07-00-06	pos	positivo	contaminação	contaminação	neg	
201.	SIF:0504	08-00-01	neg	positivo	contaminação		neg	
202.		08-00-02	pos	contaminação	positivo	positivo	neg	
203.		08-00-03	pos	positivo	contaminação		neg	
204.	Divinópolis	08-00-04	pos	positivo	contaminação		neg	
205.	IS6110-PGRS-spol	08-00-05	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
206.	**Oliveira- MG	08-00-06	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
207.	IS6110- PGRS - spol	08-00-07	pos	positivo	positivo		neg	
208.	**Itapemirim -ES	08-00-08	pos	positivo	positivo		neg	
209.	IS6110-PGRS - spol	08-00-09	pos	positivo	positivo		neg	
210.	Divin IS6110-PGRS - spol	09-00-01	pos	positivo	positivo	positivo	neg	
211.	PGRS-spol :neg-6110	09-00-02	pos	positivo	positivo	contaminação	pos	pos-A luz
	Duplicata:02-8-01-spol	09-00-02	pos	positivo	positivo	positivo	pos	
212.	**S.G. Sapucaí	09-00-03	pos	positivo	positivo	contaminação	neg	A88
	IS6110-PGRS.							
213.	SIF:0504	09-00-04	neg	contaminação	contam	negativo	neg	Atípica
214.	IS6110-PGRS - spol	09-00-05	pos	positivo	positivo		neg	

215.	09-00-06	neg	contaminação	negativo	negativo	neg
216.	IS6110-PGRS- spol	09-00-07	positivo	positivo	neg	
217.	3. Corações- IS6110- PGRS- spol	09-00-08	positivo	positivo	neg	
218.	SIF-0504	09-00-09	contaminação	negativo	neg	
	duplicata 06-00-04	09-00-10	positivo	positivo	pos -g2	
	IS6110-PGRS- spol					
219.		09-00-10	negativo	negativo	neg	
220		09-00-11	negativo	negativo	neg	
221		09-00-12	pos	positivo	neg	
222.	SIF-0506	10-00-01	contaminação	contaminação	neg	
223.	IS6110-PGRS -- spol	10-00-02	positivo	positivo	neg	
224.		10-00-03	negativo	negativo	neg	
225.	Divim-PGRS spol-6110	10-00-04	positivo	positivo	pos -g1	
	*duplicata-PGRS spol-6110	10-00-04	positivo	positivo	pos	
226.		10-00-05	contaminação	contaminação	neg	
227	IS6110-PGRS.	10-00-06	positivo	positivo	neg	
228.	IS6110-PGRS -- spol	10-00-07	positivo	positivo	neg	
229.	**Upemirim-ES	10-00-08	positivo	positivo	neg	
	IS6110-PGRS -- spol					
230	IS610-PGRS	10-00-09	positivo	positivo	neg	
231		10-00-10	contaminação	contaminação	neg	
232		10-00-11	negativo	negativo	neg	
233		10-00-12	negativo	negativo	neg	
234	SIF-0506- IS6110- PGRS-- spol	10-00-13	positivo	positivo	positivo	
235.		11-00-01	negativo	negativo	neg	
236.	IS6110-PGRS -- spol	11-00-02	positivo	positivo	neg	
	*duplicata 06-00-09	11-00-03	positivo	positivo	pos	
	PGRS spol-6110					
237.		11-00-03	negativo	negativo	neg	
238.	IS6110- PGRS -- spol	11-00-04	positivo	positivo	neg	
239.	IS6110-PGRS.	11-00-05	positivo	positivo	neg	
240.		11-00-06	negativo	negativo	neg	
241.	SIF-0504- IS6110- PGRS- spol	11-00-07	positivo	positivo	neg	
242.	IS6110-PGRS.	11-00-08	positivo	positivo	neg	
243.	SIF0506; PGRS -- spol- IS6110-	11-00-09	positivo	positivo	neg	
244		11-00-10	contaminação	negativo	neg	

245	11-00-11	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
246	11-00-12	neg	contaminação	contaminação	contaminação	neg	
247	11-00-13	neg	negativo	negativo	negativo	neg	
248, SIF:0504	11-00-14	pos	positivo	positivo	negativo	neg	
249,	11-00-15	pos	positivo	negativo	negativo	neg	A94
250 IS6110-PGRS,	11-00-16	pos	positivo	positivo	negativo	neg	
251	11-00-17	neg	negativo	negativo	contaminação	neg	
252 IS6110-PGRS,	11-00-18	pos	positivo	positivo	contaminação	neg	A122

❖ A PCR deixa de ser realizado direto de material clínico e passa a ser feito de culturas positivas em Stonebrink e/ou LJ.

\* Material com lesão tipo tuberculosa resultante de necropsia feita em propriedade rural com acompanhamento médico veterinário

□ Interrupção de culturas e sementeiras devido à falta de local. LARA-MG. Reinício de atividades no Instituto Biológico-SP entre janeiro/junho e posteriormente FUNED-BH em julho/2000.

• Mba ; amostras de *Mycobacterium bovis* utilizadas para RFLP e hibridizadas com sonda IS6110

• PGRS; amostras de *Mycobacterium bovis* utilizadas para RFLP e hibridizadas com sonda PGRS

• Spoli; amostras de *Mycobacterium bovis* utilizadas para hibridização com membrana de *spoligotyping*.

• Os perfis de IS6110 não identificados corresponde a amostras com 1 banda de 1,9 kb (perfil A01)

Amostras de *M. bovis* da bacterioteca do Instituto Biológico-SP testadas quanto a resistência à INH.

Origem	Espécie	Material	INH 0,2 µg/ml L-L-glutamato
11B-Getulina-SP	Bovina	Linfonodo	neg
21B-Tapiritiba-SP	Bovina	Linfonodo	neg
31B-Tapiritiba-SP	Bovina	Linfonodo	neg
41B-Tapiritiba-SP	Bovina	Linfonodo	neg
51B-Paraguacu Paulista-SP	Bovina	Linfonodo	neg
61B-Guararã-SP	Bovina	Linfonodo	neg
71B-Gouvelândia-GO	Bovina	Linfonodo	neg
81B-Lins-SP	Bovina	Pulmão	neg
91B-Lins-SP	Bovina	Linfonodo	neg
101B-Lins-SP	Bovina	Linfonodo	neg
111B-Sabino-SP	Bovina	Linfonodo	neg
121B-São Carlos-SP	Bovina	Linfonodo	neg
131B-Promissão-SP	Bovina	Linfonodo	neg
141B-Jaboticabal-SP	Bovina	Pulmão	neg
151B-Frutal-MG	Bovina	Linfonodo	neg
161B-Mococa-SP	Bovina	Linfonodo	neg
171B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
181B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
191B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
201B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
211B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
221B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
231B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
241B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
251B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
261B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
271B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
281B-Santarém-PA	Bubalim	Fígado	neg
291B-Cach. Alta-GO	Bovina	Linfonodo	neg

1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37

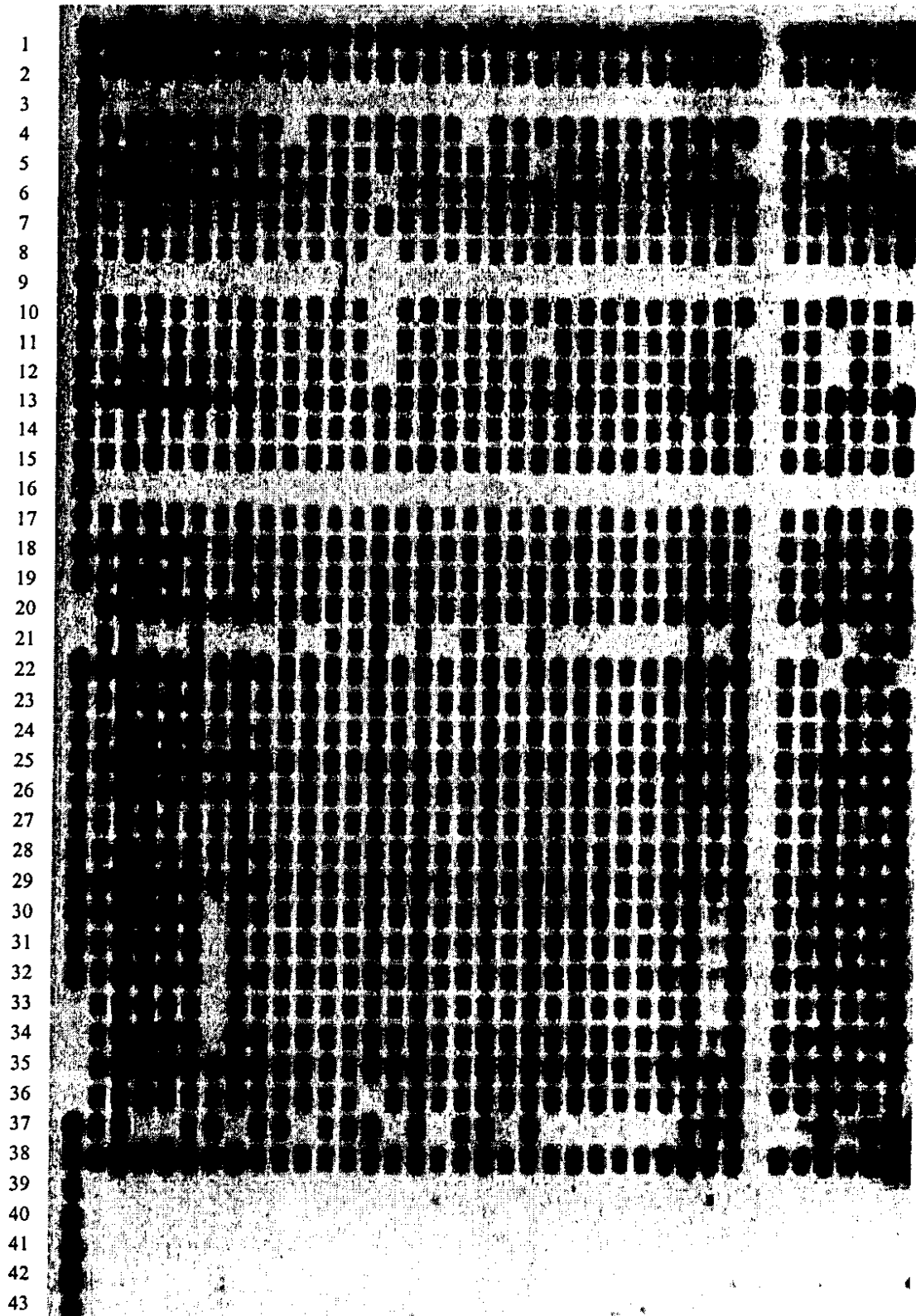


Figura 2 - Polimorfismos de DNA em 35 amostras de *M. bovis* submetidas à técnica de *spoligotyping*

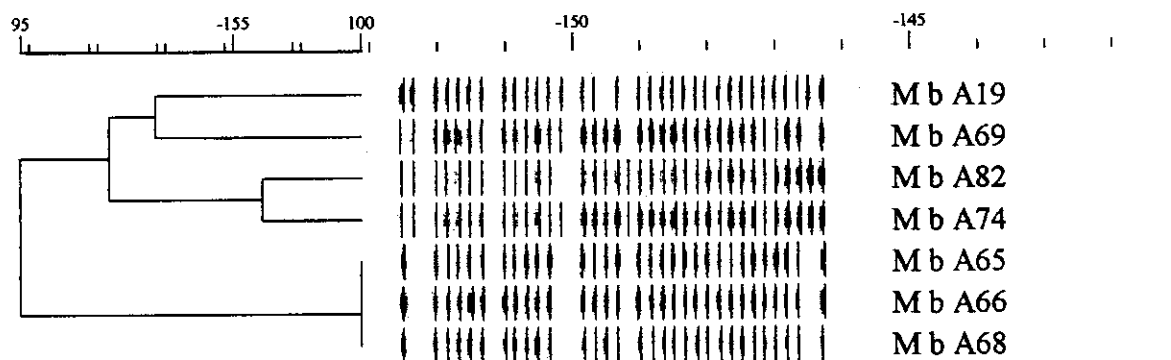


Figura 2 - Seleção de polimorfismos de DNA em *M. bovis* observados com *spoligotyping* e analisada correlação por dendrograma.

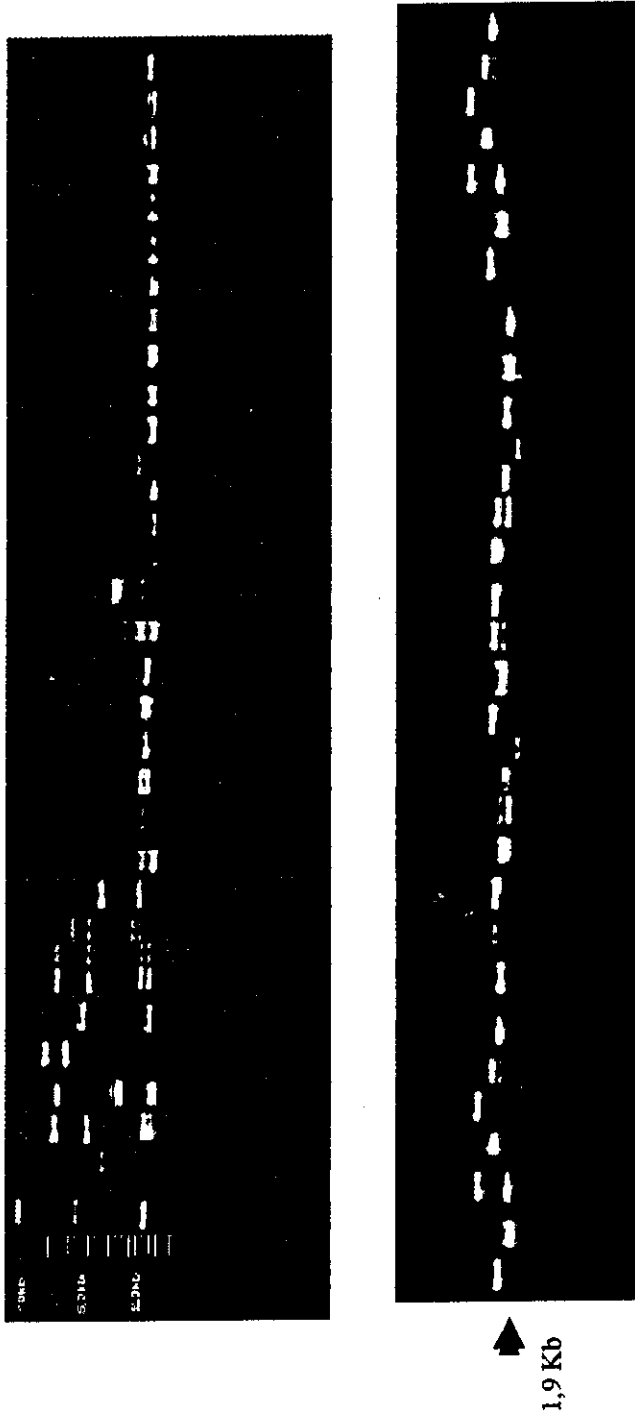
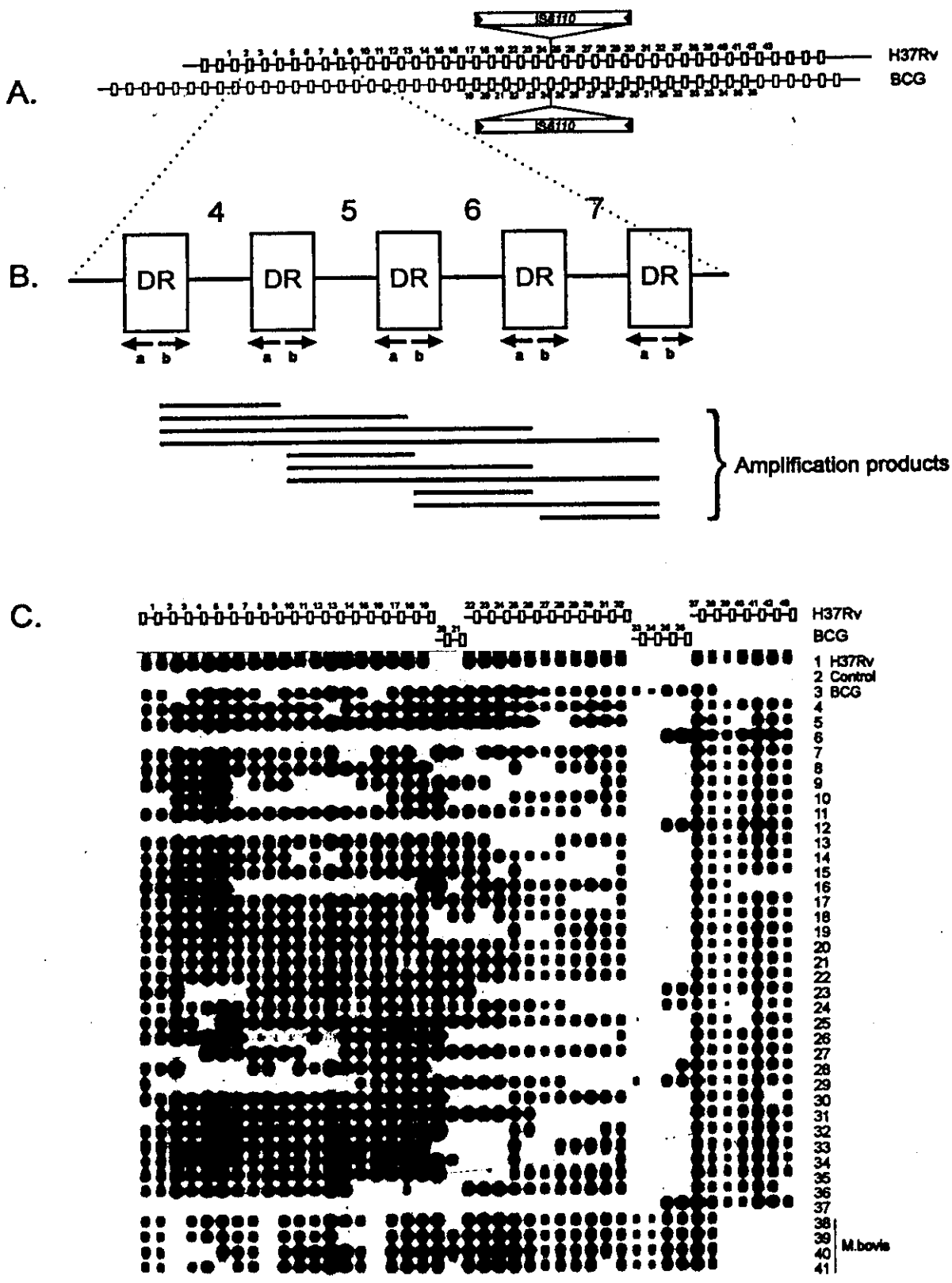


Figura 3 – Polimorfismos em 60 DNAs de *M. bovis* digeridos com *Pvu* II e hibridizados com sonda IS6110



Representação gráfica da técnica de *spoligotyping*  
 KAMERBEEK, J., SCHOOLS, L., KOLK, A., et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.4, p.907-914, 1997.



Amostras de *M. bovis* da bacterioteca do Instituto Biológico-SP testadas quanto a resistência à INH.

Origem	Espécie	Material	INH 0.2 µg/ml L-L-glutamato
11B-Getulina-SP	Bovina	Linfonodo	neg
21B-Tapiritiba-SP	Bovina	Linfonodo	neg
31B-Tapiritiba-SP	Bovina	Linfonodo	neg
41B-Tapiritiba-SP	Bovina	Linfonodo	neg
51B-Paraguaçu Paulista-SP	Bovina	Linfonodo	neg
61B-Guararã-SP	Bovina	Linfonodo	neg
71B-Gouvelândia-GO	Bovina	Linfonodo	neg
81B-Lins-SP	Bovina	Pulmão	neg
91B-Lins-SP	Bovina	Linfonodo	neg
101B-Lins-SP	Bovina	Linfonodo	neg
111B-Sabino-SP	Bovina	Linfonodo	neg
121B-São Carlos-SP	Bovina	Linfonodo	neg
131B-Promissão-SP	Bovina	Linfonodo	neg
141B-Jaboticabal-SP	Bovina	Linfonodo	neg
151B-Frutal-MG	Bovina	Pulmão	neg
161B-Mococa-SP	Bovina	Linfonodo	neg
171B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
181B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
191B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
201B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
211B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
221B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
231B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
241B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
251B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
261B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
271B-Santarém-PA	Bubalim	Linfonodo	neg
281B-Santarém-PA	Bubalim	Fígado	neg
291B-Cach. Alta-GO	Bovina	Linfonodo	neg