

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

PESQUISA DE MICOBACTÉRIAS NO LEITE DE BUBALINOS

Cleso Mendonça Jordão Junior

Orientadora: Prof^a Dr^a Clarice Queico Fujimura Leite

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas – UNESP –
Araraquara, para obtenção do
título de Mestre em Ciência
dos Alimentos.

ARARAQUARA - SP

2004

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

J82p Jordão Junior, Cleso Mendonça
Pesquisa de micobactérias no leite de bubalinos / Cleso Mendonça Jordão Junior . – Araraquara, 2004.
80 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientadora: Clarice Queico Fujimura Leite

1.Leite de búfala - Micobactérias. 2.Micobactérias. 3.Tuberculose em bubalinos.4.Reação em cadeia da polimerase. I. Leite, Clarice Queico Fujimura, orient. .II. Título.

CDD: 664.0762

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar minha vida.

À Prof.^a Dr.^a Deise Pasetto Falcão, pela grande amizade, orientação e inúmeras contribuições em todas as etapas desta dissertação.

Ao Dr. Marcos Rogério Alves Pinto, por coletar as amostras de leite e pelo fundamental apoio durante todo este trabalho.

À Dr.^a Eliana Roxo, pelas cepas de *M. bovis* AN5 e pelos valiosos ensinamentos na execução deste trabalho.

À Dr.^a Daisy Nakamura Sato, pelas valiosas contribuições e amizade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Leite, pela ajuda constante.

Ao Prof. Dr. Sandro Valentini e ao pós-graduando Cleslei Zanelli, pela colaboração e auxílio.

Aos professores João Tognolli e Íride Tognolli, pela longa amizade e pelo incentivo aos meus estudos de pós-graduação.

Às técnicas de laboratório, Sílvia, Marisa e Edinéia, pelos bons momentos de convivência e indispensável auxílio.

Às funcionárias da pós-graduação, Cláudia, Sônia e Laura, pela orientação e profissionalismo.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Moacir, Irani, Ana Cristina, Maximiliano, Laura, Ana Lúcia, Sônia, Keila, Natalina e Rita, pelo apoio e amizade recebidos.

Aos colegas de laboratório, Ana Carolina Malaspina, Karina Prince e José Rodrigo Pandolfi, não só pela amizade, mas também pela ajuda neste trabalho.

Aos meus avós, Celso, Cândida, Francisco (*in memoriam*) e Ângela, por sempre me incentivarem com muita sabedoria e carinho.

Ao meu irmão Francisco, à Tânia, à minha sobrinha Ana Luiza e a toda minha família, pelo incentivo e companheirismo.

Ao Francisco Lopes e Clotilde Mascia Lopes, pelo apoio, convivência e amizade.

A todos meus caros amigos de Araraquara e Jaboticabal.

Aos meus pais, Cleso e Maria
Aparecida,
Por tudo o que fizeram e fazem
por mim,
Por tudo que vocês me
possibilitaram conquistar,
Pelo exemplo de vida e amor
durante todos esses anos.

À minha namorada Flávia,
Pelo amor e carinho,

Pela dedicação e incentivo,
Pela companhia e ternura,
Obrigado por estar presente em
minha vida!

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

Leonardo Da Vinci (1452- 1519)

À minha orientadora, Prof^a Dr^a
Clarice Queico Fujimura Leite,
Por sempre me incentivar e
ajudar em todos os momentos
deste trabalho,
E principalmente pela importante
amizade conquistada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	03
LISTA DE FIGURAS	04
LISTA DE ABREVIATURAS	05
RESUMO	06
ABSTRACT	08
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	09
1.1. Tuberculose humana	10
1.2. Tuberculose animal	11
1.3. Micobactérias	14
1.4. Búfalos e leite	18
1.5. Métodos de identificação das Micobactérias	21
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Material	29
3.1.2. Micobactérias	29
3.1.3. Amostras de Leite	29
3.1.4. Animais	29
3.2. Meios de cultura	30
3.2.1. Meio de Stonebrink (St)	30
3.2.2. Meio de Löwestein-Jensen (LJ)	30
3.2.3. Preparo dos ovos para a confecção dos meios	31
3.3. Coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen	31
3.4. Padronização da metodologia para PCR	32
3.4.1. Preparação da suspensão micobacteriana e inoculação no leite	32
3.4.2. Padronização da técnica do PCR	33
3.4.2.1. Descontaminação	33
3.4.2.2. Extração do DNA	34

3.5. PCR	35
3.5.1. <i>Primers</i> utilizados	35
3.5.2. Ciclos	36
3.5.3. Análise do produto amplificado	36
3.6. Pesquisa de campo	37
3.6.1. Amostragem	37
3.7. Cultivo e PCR das amostras de leite de búfalas	38
3.8. Identificação das Micobactérias isoladas nos meios de cultura	39
3.9. Método químico da análise de ácidos micólicos	39
3.9.1. Saponificação e purificação dos ácidos graxos	39
3.9.2. Metilação com diazometano	40
3.9.3. Cromatografia em camada delgada	40
3.10. Método do PRA (Análise da PCR por enzimas de restrição) baseado no protocolo de Silva et al. (2001) com algumas modificações	41
3.10.1. Preparo das amostras para PCR (cultura)	41
3.10.2. Amplificação do PRA	41
3.10.3. Análise dos resultados do PRA	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Padronização da Metodologia da PCR para amostras de leite	44
4.2. Teste da PCR para <i>M. bovis</i> e PRA diretamente do leite cru	46
4.2.2. Baciloscopia das colônias suspeitas de serem Micobactérias	46
4.3. Identificação das micobactérias provenientes do leite de búfalas, e semeadas nos meios St e LJ	47
4.3.1. Método químico da análise de ácidos micólicos	47
4.3.2. Método PRA nas culturas positivas na baciloscopia	49
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resistência das Micobactérias a fatores ambientais.	15
Tabela 2	Sensibilidade das Micobactérias a agentes químicos e físicos.	16
Tabela 3	Composição química do leite em várias espécies.	18
Tabela 4	Amostras de leite de búfalas e resultado do teste da tuberculina.	29
Tabela 5	Resultados da padronização da metodologia para PCR.	46
Tabela 6	Resultado do teste da tuberculina das amostras puras isoladas pela cultura.	47
Tabela 7	Resultado da análise dos perfis dos ácidos micólicos, após comparação com os padrões.	48
Tabela 8	Resultados obtidos com o PRA utilizando a base de dados da internet PRASITE, 2000.	51
Tabela 9	Resultados obtidos com a cultura bacteriana, baciloscopia, ácidos micólicos, PCR- <i>M. bovis</i> e PRA.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Potencial de transmissão do <i>Mycobacterium bovis</i> entre seres humanos e o gado.	14
Figura 2	Fluxograma das metodologias empregadas na padronização da PCR.	33
Figura 3	Fluxograma dos processamentos das amostras de leite cru de búfalas.	38
Figura 4	Detecção do PCR utilizando os <i>primers</i> INS-1 e INS-2.	44
Figura 5	Detecção do PCR utilizando os <i>primers</i> JB-21 e JB-22.	45
Figura 6	Perfil dos ácidos micólicos das amostras testadas.	48
Figura 7	Resultados do PRA utilizando os <i>primers</i> Tb11 e Tb12.	49
Figura 8	Gel de eletroforese das amostras de DNA submetidas a digestão.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Micro litro
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	“2’ – Deoxyribonucleoside 5’ – triphosphate”
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
LJ	Lowesntein-Jensen
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
KOH	Hidróxido de potássio
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normalidade
MOTT	<i>Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli</i>
PRA	<i>PCR- restriction enzyme analysis</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPD	<i>Purified protein derivated</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
rpm	Rotações por minuto
TBE	Tris-borato EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
St	Stonebrink
U	Unidade
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
x	Veze

RESUMO

O leite é importante como fonte nutricional ao homem, bem como possível via de transmissão de micobactérias, principalmente de *Mycobacterium bovis*. Neste estudo avaliou-se a técnica clássica de cultivo e técnicas de biologia molecular, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e PRA (*PCR - Restriction Enzyme Analysis*) no isolamento e identificação de micobactérias a partir do leite de búfalas. Padronizou-se inicialmente uma técnica de PCR eficaz para detectar, diretamente no leite, o *M. bovis*. Para tal, leite tipo A foi inoculado artificialmente com número conhecido de *M. bovis* AN5, e diluições sucessivas foram submetidas a dois protocolos de PCR para avaliar o limite de detecção de *M. bovis*. Em um dos protocolos foi empregado o par de *primers* INS1 e INS2 para detecção do *Mycobacterium* spp e no outro, o JB21 e JB22 específico para *M. bovis*. As diluições foram também semeadas no meio de Stonebrink e estes incubados por até 90 dias a 37°C, para determinar o número de bacilos viáveis inoculados no leite. Após a padronização, amostras de leite provenientes de 23 búfalas (*Bubalus bubalis*), sendo 07 com PPD+ e 16 com PPD-, foram analisadas quanto à presença de *M. bovis* pela técnica de PCR padronizada. Paralelamente, a presença de *M. bovis* e de outras micobactérias foram pesquisadas nas mesmas amostras através de cultivo nos meios de Stonebrink e Lowenstein-Jensen e a identificação foi feita empregando as técnicas dos ácidos micólicos e PRA. Pelos resultados de PCR, o protocolo empregando o par de *primer* INS1 e INS2 foi menos sensível detectando bacilos até a diluição 10^{-3} (800 UFC/mL). O par JB-21 e JB-22 detectou *M. bovis* até a diluição 10^{-4} (80 UFC/mL), sendo portanto mais sensível. Na pesquisa de campo, não conseguiu-se isolar *M. bovis* no leite dos bubalinos tanto pela cultura quanto pela PCR, porém micobactérias ambientais cresceram em ambos os meios, sendo identificadas: *M. flavescens* (1 amostra), *M. simiae* (3 amostras) e *M.*

intracellulare (1 amostra). As duas últimas espécies são potencialmente patogênicas ao homem.

Palavras-chave: Leite, *Bubalus bubalis*, Tuberculose, *Mycobacterium bovis*, PCR, PRA, Ácidos Micólicos

ABSTRACT

Milk is an important nutritional source to man, but it can also carry pathogenic mycobacteria, especially *Mycobacterium bovis*. In this study, we tried to evaluate the classical technique (culture) and molecular technique PCR (*Polymerase Chain Reaction*) and PRA (*PCR - Restriction Enzyme Analysis*) in the isolation and identification of mycobacteria from water buffalo's milk samples. First of all, it was standardized an efficient PCR method for *M. bovis* identification from milk. In this sense, a known number of *M. bovis* AN5 were inoculated in the milk that was submitted to a serial dilution. Then, two different PCR protocols were done to evaluate the threshold of *M. bovis* detection. Two pair of primers were tested, one to detect *Mycobacterium* spp (INS1 e INS2) and other to detect *M. bovis* (JB21 e JB22). Dilutions were also submitted for culture using Stonebrink medium and incubated at 37°C/90 days, to determine the number of bacilli in the milk. After this, 23 samples of milk collected from water buffalos (*Bubalus bubalis*), 7 PPD + and 16 PPD-, were analyzed by PCR technique and culture (Stonebrink medium) to detect the presence of *M. bovis*. Isolation of other mycobacteria were done by culture (Lowenstein-Jensen medium) and identified by mycolic acids and PRA. The results of PCR showed that the protocol using primer par INS1/INS2 was positive until 10⁻³ dilution (800 CFU/mL). The protocol with primers JB21/JB22 was more sensitive and specific, detecting *M. bovis* until 10⁻⁴ dilution (80 CFU/mL). *M. bovis* could not be identified by PCR and isolated in culture from milk samples of water buffalo. Other species of mycobacteria were identified as: *M. flavescens* (1 sample), *M. simiae* (3 samples) and *M. intracellulare* (1 sample). The last two species are considered pathogenic mycobacteria to human.

Keywords: Milk, *Bubalus bubalis*, Tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, PCR, PRA, Mycolic acids.

Introdução

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Tuberculose Humana

A tuberculose é uma doença infecciosa e contagiosa causada pelos agentes *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*. A doença é de evolução normalmente crônica e progressiva, acometendo em especial os pulmões. Os agentes infecciosos são bacilos da família Mycobacteriaceae. A primeira espécie tem o homem como único reservatório, a segunda, o *M. bovis*, que causa a tuberculose bovina, quando transmitida à espécie humana torna-se muito virulenta, principalmente em pessoas com imunodeficiência (BIBLIOTECA DE MANGUINHOS, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004) houve aproximadamente 8.8 milhões de casos de tuberculose pelo mundo no ano de 2002, sendo que 82% deste total encontram-se em países da África e do Sudeste Asiático.

Com o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – Aids a situação agravou-se e o número de casos de tuberculose aumentaram muito nos grandes centros urbanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993). Segundo O’reilley e Daborn (1995), a AIDS aumentou consideravelmente o número de pessoas com tuberculose tanto por *M. tuberculosis* como por *M. bovis*.

Dentre os 15 países com maior incidência de tuberculoses do mundo, treze estão na África, onde a prevalência da infecção por HIV em pacientes com tuberculose é alta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

A tuberculose está presente em todos os países, atingindo tanto os seres humanos (*M. tuberculosis*), como também os animais (*M. bovis*), principalmente nos países com baixo desenvolvimento educacional sanitário (BIBLIOTECA DE MANGUINHOS, 2004).

O Brasil está entre os 15 países com maior incidência de tuberculose mundial, com um número estimado de 110 mil pessoas contaminadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

A tuberculose humana causada por *M. bovis* é clinicamente indistinguível da doença causada por *M. tuberculosis*. Muitos casos ocorrem em jovens como consequência da ingestão de leite contaminado. A incidência maior da tuberculose causada por *M. bovis* está entre os trabalhadores rurais e funcionários de matadouros, sugerindo que o contato com o gado é importante na transmissão desta doença (GRANGE e YATES, 1994; DE KANTOR e RITACCO, 1994). Na América Latina é estimado que 2% de tuberculose pulmonar humana e 8% de tuberculose extrapulmonar humana seja causada por *M. bovis* (GRANGE e YATES, 1994).

1.2. Tuberculose Animal

É muito difícil precisar o número de casos de tuberculose de origem bovina no Brasil, porém estima-se que 5% do total de casos de tuberculose no país sejam causadas por *M. bovis*, o que daria num total de 4000 casos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BUIATRIA, 2003).

Dados oficiais sobre tuberculose bovina no Brasil do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2004), indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998.

A tuberculose bovina é diagnosticada *in vivo* pelo exame clínico e o teste tuberculínico (PPD) (obrigatório para a produção de leite e para a comercialização de animais) e após a morte é diagnosticada pelos exames histopatológico e bacteriológico, inclusive sondas de DNA e técnicas de PCR (ROXO, 1997a). Uma vez que outros agentes etiológicos podem causar lesões macroscopicamente indistinguíveis com as de tuberculose, o diagnóstico baseado apenas no exame histopatológico pode ocasionar condenações desnecessárias e imprecisão nos dados de ocorrência da doença (HERNANDEZ DE ANDA et al., 1997). Portanto, seu isolamento e identificação, baseado no diagnóstico bacteriológico, constitui a prova confirmatória da tuberculose bovina (CORNER, 1994).

Tuberculose bovina é uma zoonose que pode ser transferida para humanos através do consumo de leite não pasteurizado, laticínios e carne. A doença tem também uma enorme importância econômica, pois quando os animais têm reações positivas ao teste da tuberculina são removidos dos rebanhos, e quando se detecta lesões típicas de tuberculose nas carcaças, essas são condenadas. Os animais geralmente adquirem a infecção por *M. bovis* pela via oral. Quando a tuberculose é generalizada no bovino, *M. bovis* pode ser encontrado nos mucos nasais, leite, urina e fezes (SCALON e QUINN, 2000).

A importância da tuberculose bovina como zoonose é reconhecida mundialmente, e o estudo dos fatores de difusão de tal enfermidade possui grande relevância. Caso não sejam adotadas medidas rápidas, uma epidemia de tuberculose poderá ocorrer nos próximos anos. A falta de diagnóstico efetivo, com a identificação do agente, tem contribuído para o aumento dos casos no Brasil (SOUZA et al., 1999).

Segundo Ferreira Neto e Bernardi (1997), do ponto de vista econômico estima-se que ocorra em bovinos tuberculosos uma diminuição de 10% na produção de leite e 20% na produção de carne. Há também outras perdas decorrentes da doença, como por exemplo a perda de reprodutores e animais valiosos, o custo do tratamento de seres humanos infectados e

as horas de trabalho que esses indivíduos deixam de realizar devido ao aparecimento da tuberculose.

Em bovinos, a infecção pelo *M. bovis* é acompanhada de hipersensibilidade tardia e de imunidade celular associadas. A pesquisa da hipersensibilidade tardia e/ou de imunidade celular pode ser feita pela injeção intradérmica de tuberculina. Esta resposta só é verificada em indivíduos previamente expostos ao bacilo bovino. No bovino, esta reação de hipersensibilidade tardia é caracterizada pelo aumento de espessura da pele, que é determinada pelo infiltrado de células mononucleares e edema, mais ou menos intenso. Esta substância é, na realidade, uma mistura de proteínas de baixo peso molecular produzidas pelo *M. bovis* ou *M. tuberculosis*. Quando, parcialmente purificada recebe o nome de PPD (*purified protein derivative*) (ROXO, 1996).

A Figura 1 mostra que transmissão do *M. bovis* do gado para o gado é muito alta, principalmente através de aerossóis, porém existe também a possibilidade de transmissão pelo leite, porém em uma menor proporção. A transmissão do gado para pessoas está focada em certas profissões de risco como fazendeiros, veterinários, funcionários de abatedouro e populações de áreas rurais. Porém a população em geral também corre riscos devido ao alto índice de leite não pasteurizado comercializado nas grandes cidades e pelo avanço da AIDS. A transmissão de pessoas para pessoas é mais raro, porém pode ocorrer por meio de aerossóis, principalmente em pessoas imunodeprimidas. A transmissão *M. bovis* de pessoas contaminadas para o gado pode ocorrer, porém muito raramente, assim como pessoas contaminadas podem transmitir *M. tuberculosis* para o gado. Esta micobactéria, porém, causa apenas pequenas lesões no animal acaba sendo autolimitada (COLLINS, 2000).

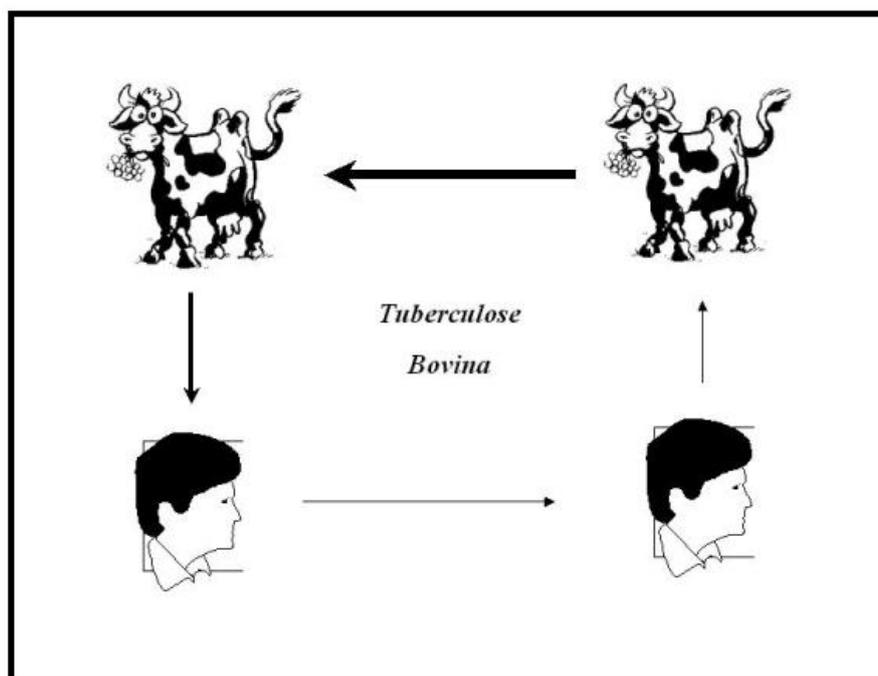


Figura 1. Potencial de transmissão do *M. bovis* entre seres humanos e o gado. A espessura das setas sugere a probabilidade de transmissão.

Fonte: COLLINS, 2000.

1.3. Micobactérias

O gênero *Mycobacterium* é composto por bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), que ao serem corados pela fucsina à quente, não se descoram pelo álcool clorídrico (coloração de Ziehl-Neelsen) (TRABULSI, 1999) e pertencem à ordem *Actinomycetales* (DE KANTOR, 1979). Somente 20 das 71 espécies de micobactérias reconhecidas pelos taxonomistas, foram consideradas patogênicas para o homem e os animais (KIM et al., 2001). As espécies causadoras da tuberculose clássica foram agrupadas no "Complexo *Mycobacterium tuberculosis*", constituído pelo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e mais recentemente foram incluídos o *M. canettii* e o *M. caprae* (ARANAZ et al., 2003).

Micobactérias ambientais, também denominadas Micobactérias outras que não o *Mycobacterium tuberculosis* (MOTT), são saprófitas em todos os ecossistemas naturais (solo, água, poeira, etc.) e colonizam o homem e outros animais (DE KANTOR, 1979; PRITCHARD, 1988, HAAGSMA, 1995).

As micobactérias são aeróbias obrigatórias justificando, portanto, a eleição dos pulmões, rins, pleura, medula óssea, todos órgãos com alta tensão de oxigênio, como os preferidos para a instalação da infecção (TRABULSI, 1999). Apresentam preferências nutricionais marcantes para lipídios e a gema de ovo tem sido um elemento constante na confecção de meios para diagnóstico de micobactérias. O crescimento do bacilo da tuberculose é lento, sendo verificado *in vitro* o tempo de geração de, aproximadamente, 12 horas.

As micobactérias são muito resistentes ao ambiente, podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo ao abrigo da luz solar direta e na presença de umidade. Podem sobreviver por até dois anos em instalações, no solo, no pasto ou no esterco e por um ano na água (RUSSEL, 1984), conforme a Tabela 1.

RESISTÊNCIA DA MICOBACTÉRIA	
Água	Até 12 meses
Solo	Até 2 anos
Pasto	Até 2 anos
Fezes	Até 2 anos
Instalações	Até 2 anos
Alimentos	10 meses
Tecidos congelados	Vários anos

Tabela 1. Resistência das Micobactérias a fatores ambientais.

Fonte: RUSSEL et al., 1984.

Estas bactérias não são destruídas pela ação de compostos de amônio quaternário, ácidos ou alcalis, sendo sensíveis somente a compostos fenólicos, formólicos, ao

álcool e hipoclorito de sódio. Outra forma eficiente de matar o bacilo da tuberculose é pela ação do calor úmido e pelo tratamento de pasteurização do leite por 62,8 a 65,6° C por 30 minutos ou 71,7° C por pelo menos 15 segundos (RUSSEL, 1984), conforme a Tabela 2.

SENSIBILIDADE DA MICOBACTÉRIA

Desinfetantes:

Fenólicos

Formólicos

Hipoclorito de Sódio

Álcool

Temperatura:

pasteurização lenta - 62,8 a 65,6° C por 30 min

pasterzação rápida - 71,7° C por 15 segundos

Tabela 2. Sensibilidade das Micobactérias a agentes químicos e físicos.

Fonte: RUSSEL et al., 1984.

Enquanto que a maioria das infecções tuberculosas em humanos é causada por *M. tuberculosis*, uma porcentagem que varia de 5-10% dos casos podem ser atribuídos ao *M. bovis* (WELDLOCK et al., 2002). Contudo, há poucas informações esclarecedoras sobre a prevalência de infecções em humanos por *M. bovis* tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Nos países em desenvolvimento, a maioria dos casos de tuberculose em humanos não é confirmada pelo isolamento da bactéria, portanto não há identificação do agente causador. Um recente estudo sobre a tuberculose em crianças que moram ao longo da fronteira dos EUA e México revelou que um terço de todas as culturas de micobactérias positivas eram de *M. bovis* (DANKNER e DAVIS, 2000).

Tuberculose em humanos causada por *M. tuberculosis* e *M. bovis* são indistinguíveis, clinicamente, radiologicamente e patologicamente (WELDLOCK et al., 2002).

Segundo Kleeberg (1984), o homem é tão sensível ao bacilo bovino quanto ao bacilo humano. A contaminação humana por *M. bovis* pode ser por aerossóis a partir de

bovinos com tuberculose ou via digestiva, pela ingestão de leite contaminado. Quando ocorre a ingestão de leite não-pasteurizado, proveniente de vacas tuberculosas, os bacilos ingeridos penetram pela mucosa da orofaringe e do trato digestivo, invadindo, respectivamente, os nódulos mesentéricos. A partir destes focos, a doença poderá se espalhar para outros tecidos ou órgãos (TRABULSI, 1999).

Seres humanos são infectados pelo *M. bovis* pelos animais, especialmente bovinos, mas também por outros animais utilizados para produção de leite, derivados e carne como: ovinos, caprinos, bubalinos, camelos, etc (MODA et al., 1996).

Calcula-se que o *M. bovis* traduza seu código genético numa velocidade 10 vezes menor que a *Escherichia coli* (TRABULSI, 1999). A lentidão do crescimento parece estar relacionada à absorção mais demorada dos nutrientes, provavelmente, devido à grande quantidade de lipídios na parede. Além do interesse em se ter um diagnóstico, o crescimento dessa bactéria está relacionado com o quadro clínico da tuberculose (TRABULSI, 1999).

A tuberculose humana causada pelo *M. bovis* é um problema de Saúde Pública de preocupação, tanto médica como veterinária e há a necessidade de uma rigorosa vigilância bacteriológica (GRANGE e YATES, 1994).

As espécies de micobactérias outras que não o *Mycobacterium tuberculosis* (MOTT) mais isoladas no Brasil são: Complexo *Mycobacterium avium*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii* e *M. scrofulaceum* (LEITE et al., 1989; LEITE et al., 1995; LEITE et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000; ROCHA et al., 2002) causando principalmente doença pulmonar e ganglionar, sendo que estas e outras MOTT são isoladas com maior frequência em pacientes soropositivos para o vírus da AIDS (LEITE et al., 1989; LEITE et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2000; ROCHA et al., 2002).

1.4. Búfalos e leite

O leite é um excepcional alimento natural, pois contém quantidades importantes de nutrientes (55), considerados essenciais ao homem sendo apenas deficiente em vitamina D e em ferro. Há várias diferenças entre a composição do leite humano e outros animais domésticos (Tabela 3), isto se deve à diferença da necessidade de nutrientes dos recém-nascidos de espécies diferentes (AMIOT, 1991).

Espécie/raça	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Sólidos Totais (%)
<i>Vaca Ayrshire</i>	4,1	3,6	4,7	13,1
<i>Vaca Pardo</i>				
<i>Suíço</i>	4,0	3,6	5,0	13,3
<i>Vaca Guernsey</i>	5,0	3,8	4,9	14,4
<i>Vaca Holstein</i>	3,5	3,1	4,9	12,2
<i>Vaca Jersey</i>	5,5	3,9	4,9	15,0
<i>Vaca Zebu</i>	4,9	3,9	5,1	14,7
<i>Cabra</i>	3,5	3,1	4,6	12,0
<i>Ovelha</i>	5,3	5,5	4,6	16,3
<i>Búfalo</i>	10,4	5,9	4,3	21,5
<i>Camelo</i>	4,9	3,7	5,1	14,4
<i>Humano</i>	4,5	1,1	6,8	12,6

Tabela 3. Composição química do leite em várias espécies.

Fonte: Jensen e Thompson (1995).

O leite de búfala difere do leite de vaca, pois contém maiores teores de proteína, gordura e minerais como o cálcio e fósforo, apresentando também altos teores de lactose e cinzas (PATEL e MISTRY, 1997; DUBEY et al., 1997; VALLE, 1990). O leite desses animais por não possuir β -caroteno, mas sim a própria vitamina A é totalmente branco, diferente do leite dos bovinos que é levemente amarelado (ABCB, 2003; MACEDO et al., 2001).

A exploração dos bubalinos para a produção de leite é uma atividade que tem crescido nos últimos anos no Brasil, que conta com um rebanho de aproximadamente três milhões de cabeças (ABCB, 2003). Esse crescimento tem sido acentuado particularmente nos estados da região Sudeste, onde o leite desses animais de dupla aptidão é destinado, quase que totalmente, à produção de queijo tipo "Muzzarella", que tem mercado assegurado e preços compensatórios. Assim, a criação de búfalos pode tornar-se boa fonte de renda para o produtor, destacando-se como opção para aquelas regiões onde os bovinos apresentam baixa eficiência produtiva (MACEDO et al., 2001).

Justamente pelo fato de os búfalos terem um grande potencial de adaptação, diferentemente dos bovinos, eles têm sido criados em regiões pouco favorecidas quanto ao solo e clima, como em florestas, matas naturais e locais alagadiços. Porém, uma falsa idéia de resistência à doenças foi atribuída à espécie, devido à sua rusticidade. Somente tem-se dado importância nos últimos anos para pesquisas sobre nutrição e reprodução de búfalos, faltando, todavia, estudos sobre as principais doenças que acometem essa espécie, as formas de diagnóstico e de controle, e também o impacto econômico que elas causam à criação animal (ROXO, 1997b).

O búfalo pode ter uma vida produtiva de até 20 anos, fazendo com que doenças crônicas, como a tuberculose, assumam caráter de extrema importância na criação desses animais, devido a maior probabilidade de desenvolverem e transmitirem essa doença (ROXO, 1997b).

Da mesma forma que os bovinos, os bubalinos são sensíveis ao *M. bovis* e a ocorrência de tuberculose nesses animais tem sido relatada em diversos países como Índia, Itália, Austrália e Brasil (PORTUGAL et al., 1971; VACCARO et al., 1982; RATLEDGE e STANFORD, 1983; VANNAMAYA et al., 1987; LÁU, 1994; ROXO e AMARAL, 1998).

A tuberculose por *M. bovis* é diagnosticada por testes tuberculínicos ou encontro de lesões *post mortem* (ROXO, 1997b), porém trabalhos mostram que os bubalinos apresentam maior reatividade cutânea, sendo mais sensíveis que os bovinos ao teste tuberculínico. Tem-se descrito ocorrências de muitos casos de reações inespecíficas, com ausência de lesões no abate (NAIN e KAUSHIK, 1985). Essas reações inespecíficas podem em parte, serem causadas pela infecção do animal por outros bacilos, como *M. avium* e outras micobactérias "atípicas" habitantes normais da água e do solo, que não causam lesões progressivas ou ainda por *M. paratuberculosis*, que é o agente da doença de Johne (O'REILLY e DABORN, 1995).

A tuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil foi descrita pela primeira vez por PORTUGAL et al., em 1971, em um rebanho bubalino onde os animais eram criados com bovinos infectados por *M. bovis* numa mesma propriedade rural. Mais recentemente, Roxo e Amaral (1998), relataram um surto de tuberculose em um rebanho bubalino no Estado de São Paulo, que apresentava 17,5% de reação positiva à tuberculina aplicada na prega da cauda e achados de necropsia em oito animais. Amostras das lesões encontradas foram processadas pelo método de Petroff e semeadas em meios Petragani e Stonebrink, incubados a 37° C, resultando no isolamento de bacilos álcool-ácido resistentes. A ocorrência de um novo surto de tuberculose em búfalos após 26 anos do primeiro relato no Estado de São Paulo mostra a necessidade do diagnóstico e do controle desta doença nas espécies de interesse econômico.

As doenças infecciosas em bubalinos, praticamente não diferem dos bovinos. Os búfalos podem se contaminar pelo *M. bovis* por via oral ou nasal. Os sintomas da tuberculose em búfalos são os seguintes: perda de peso, enfraquecimento, gânglios enfartados, falta de apetite, tosse seca, dificuldades de respiração, diminuição da produção leiteira e morte (LÁU, 1999). As lesões tuberculosas, encontradas em búfalos têm uma cor mais pálida e são

menos calcificadas do que aquelas normalmente encontradas em bovinos.(HEIN e TOMASOVIC, 1981).

Apesar de ter sido observada tuberculose em búfalos, no Brasil, tanto em criatórios (MORAES, 1990 e PORTUGAL et al., 1971) como em abates (FREITAS, 1984), há pouco conhecimento da doença nesta espécie, sendo pouco conhecidas às características do processo infeccioso desta e das outras micobacterioses em búfalos (FREITAS et al., 2001).

Vale (1994), cita a pouca divulgação dos problemas sanitários que afetam os búfalos na América Latina e a necessidade de se estabelecer parâmetros específicos para a espécie, tomando-se em conta as diferenças na resposta imune entre bovinos e bubalinos. Sendo assim, recomenda-se muito cuidado na interpretação da avaliação da resposta dos búfalos aos PPDs, por esses animais serem possivelmente hipersensíveis ao exame, podendo ocorrer resultados falso-positivos (NICOLETTI, 1994).

1.5. Métodos de identificação das Micobactérias

A identificação da micobactéria é baseada na baciloscopia empregando a técnica de Ziehl-Neelsen e no isolamento do agente etiológico pelo cultivo. O cultivo para o primo isolamento das micobactérias pode ser processado pelo método tradicional de Petroff ou pela descontaminação com cloreto de hexadecilpiridino e semeadura em meios a base de ovo, como Stonebrink (meio de cultura mais recomendado para o primo isolamento de *M. bovis*, contendo piruvato de sódio e não glicerina como fonte de carbono), meio Lowenstein-Jensen ou a base de ágar como Middlebrook 7H11 e B83 (BRASIL, 1994).

O crescimento deste se dá após três a cinco semanas de incubação. O isolamento de *M. bovis* pode demorar até mais de 12 semanas (BRASIL, 1994), e a

identificação das cepas isoladas é feita por métodos bioquímicos como por exemplo o teste de niacina, catalase, redução de nitrato e urease (VITALE et al., 1998).

A cultura bacteriológica é considerada “padrão ouro” e o teste definitivo para confirmação da tuberculose bovina. Contudo, o isolamento e o cultivo de micobactérias provenientes de amostras clínicas *in vivo* é extremamente lento e dependente de um equipado laboratório. Além disso, depende da presença de aproximadamente 10 a 100 bacilos viáveis nas amostras, o que ocorre geralmente em estágios avançados da doença. Deve-se ressaltar também, que a sensibilidade da cultura não é de 100%, e resultados falso-negativos podem ocorrer (ROMERO et al., 1999). MILIAN-SUAZO et al. (2000), estudaram a tuberculose bovina no gado leiteiro mexicano através de exames histológicos e cultura. Foram pesquisados 2500 animais, 400 (16%) tinham lesões granulomatosas típicas de tuberculose. Destes 400 animais previamente identificados, 87% foram confirmados como infectados pelo exame histológico, 77% pela cultura em laboratórios nos EUA e 59% em laboratórios mexicanos.

Pardo et al. (2001), coletaram 780 amostras de leite de 52 vacas (suspeitas ou positivas para tuberculose) provenientes de fazendas no Estado de São Paulo. Através de técnicas de isolamento em meios de Stonebrink e Löwenstein-Jensen, eles detectaram *Mycobacterium* spp em 78 (10%) amostras de 19 (34.54%) animais. Através de características coloniais e cromatografia de camada delgada foram confirmadas as seguintes micobactérias: *M. avium* (5.26%), *M. fortuitum* (10.52%), *M. bovis* (5.26%) e *Mycobacterium* spp (78.95%).

Vários autores (HOSTY e McDURMONT, 1975; JONES et al., 1966; KANAMEDA e EKGATAT, 1995; KAZWALA et al., 1998; LEITE et al., 2003; VITALE et al., 1998) pesquisaram *M. bovis* e outras micobactérias ambientais no leite através do cultivo em vários meios de cultura. Além do *M. bovis*, outras micobactérias potencialmente patogênicas, como *M. avium*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M.*

intracellulare, *M. marinum*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis* e *M. terrae* foram encontradas tanto em leite de bovinos como em leite proveniente de bubalinos.

O ressurgimento da tuberculose no cenário mundial nos últimos anos tem levado pesquisadores a desenvolver testes diagnósticos mais rápidos para as doenças de origem micobacteriana. Entretanto na identificação de espécies, métodos tradicionais como os testes bioquímicos que dependem do crescimento em cultura, são extremamente demorados (SOMOSKÖVI et al., 2000). Novos métodos agilizam a identificação, sendo citada a análise dos perfis dos ácidos micólicos pelas técnicas cromatográficas (TORTOLI et al., 2003), reações em cadeia da polimerase – PCR (PIERSIMONI e SCARPARO, 2003) e mais recentemente o PRA (TORTOLI et al., 2003). Leite et al. (1998), usaram uma técnica empregando cromatografia em camada delgada para análise de ácidos micólicos e obtiveram resultados coerentes com os testes bioquímicos, na identificação de micobactérias.

O teste de PCR, que pode ser feito em algumas horas e com alta especificidade, e por essa razão este teste se tornou uma excelente opção para o rápido diagnóstico clínico da tuberculose (BOLLELA et al., 1999). O uso dessa técnica aperfeiçoou o nível de detecção das espécies de micobactérias de interesse clínico (como por exemplo, *M. tuberculosis* e *M. bovis*), sendo recomendado por diferentes autores (ZANINI et al., 2001; VITALE et al., 1998, ZUMARRAGA, et al., 1999, RODRIGUEZ et al., 1995, ROMERO et al., 1999, PEREZ et al., 2002).

A técnica de PCR (*Polimerase chain reaction*), baseia-se na análise de DNA, permitindo detectar e amplificar pequenos fragmentos de DNA. Esta técnica tem sido aplicada na indústria de laticínios, principalmente para detectar contaminações microbiológicas, contudo, o leite é também um substrato adequado para as análises por PCR (VELOSO et al., 2002). Esta técnica permite detectar DNA de bactérias sem considerar a sua viabilidade. Esta propriedade é utilizada para avaliar a qualidade dos alimentos, mesmo que a pasteurização

assegure que um produto está apto para o consumo humano, como não há a eliminação das bactérias do meio, a detecção de micobactérias por PCR permite também detectar se o leite provém de rebanhos infectados. A importância desta metodologia baseia-se em se controlar os alimentos destinados ao consumo humano, contribuindo por sua vez, ao cumprimento das exigências dos mercados internacionais, onde produtos lácteos devam ser provenientes de rebanhos livres de tuberculose (ZUMARRAGA, et al., 1999).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi inicialmente introduzida em 1985 por SAIKI e colaboradores e MULLIS et al. (1986). É uma técnica que permite a amplificação *in vitro*, e de forma exponencial, de segmentos de DNA, levando à produção de grande quantidade deste fragmento. É, portanto, extremamente útil na amplificação e detecção de moléculas de DNA presentes em baixo número de cópias em uma amostra biológica. Basicamente, a PCR realiza *in vitro* um processo que as células fazem *in vivo*, ou seja, duplicação do DNA. Os requisitos básicos são: uma máquina termocicladora, uma DNA-polimerase termorresistente, *primers* apropriados, os quatro nucleotídeos e a amostra contendo o DNA a ser amplificado. O processo ocorre em três etapas. Inicialmente, a amostra é aquecida a cerca de 95°C por um tempo ao redor de 30 a 60 segundos, para que haja desnaturação do DNA, ou seja, separação das duas fitas complementares. A seguir, a reação é resfriada a cerca de 50-65°C por aproximadamente um minuto. Nesta etapa, ocorre o anelamento ou ligação dos *primers* às regiões complementares das fitas separadas de DNA. A reação é levada a 72°C por um minuto, quando a DNA-polimerase acrescenta nucleotídeos em seqüência aos *primers*, formando uma fita complementar. Assim, duas novas fitas são sintetizadas nos moldes das duas fitas originais. O ciclo é repetido, com a síntese de quatro novas fitas e, em poucas horas, têm-se milhões de cópias (ANDRADE, 1993).

VITALE et al. (1998), pesquisando o complexo *M. tuberculosis* na Itália, utilizou a técnica do PCR usando o leite, *swabs* nasais e os linfonodos de gado PPD+ e PPD -.

Foram utilizados 60 animais PPD+ e 40 animais PPD-. Os resultados de PCR mostraram 100% de eficácia confirmando a presença de *M. bovis* em todos os animais reatores positivos. E, sendo um método mais preciso e sensível mostrou que 52% dos animais considerados PPD- eram na realidade falso negativo, representando assim uma fonte em potencial de contaminação futura, pois esses animais não foram removidos das suas propriedades.

A técnica do PRA (Análise da PCR por enzimas de restrição) é um método muito eficiente para identificar uma grande variedade de espécies de micobactérias foi descrita em 1993, por Telenti et al. Esta técnica é baseada na amplificação do gene *hsp65* pelo PCR, seguido pela digestão do produto amplificado com as enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Os produtos da digestão são analisados em gel de agarose, onde pode-se analisar padrões de restrição obtidos com cada enzima. Uma Base de Dados na Internet (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) que possui um banco de dados com os padrões de restrição micobacterianos do gene *hsp65*, tornou possível obter a identificação das espécies de micobactérias obtidas pelo PRA (COOKSEY, 2003; SILVA et al., 2001). Segundo Rocha et al. (2002), o PRA comparado com os testes bioquímicos, é uma técnica precisa, rápida e mais econômica, podendo ser usada para identificar tanto micobactérias de crescimento lento quanto micobactérias de crescimento rápido.

Considerando o controle da tuberculose bovina no Brasil prioritário, este trabalho é de interesse epidemiológico e de saúde pública, contribuindo assim com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, 2001), instituído em 11 de janeiro de 2001.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste presente trabalho foram:

- Estudar amostras de leite cru provenientes de bubalinos PPD + e PPD -, quanto à presença de micobactérias, através dos métodos tradicionais de cultivo e técnicas modernas de biologia molecular (PCR).
- Identificar as espécies de micobactérias isoladas, empregando a análise cromatográfica dos ácidos micólicos, técnica de PCR e do PRA.
- Padronização de uma metodologia de PCR, visando à identificação eficiente do *Mycobacterium bovis* a partir do leite.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1. Material

3.1.2. Micobactérias

- *M. bovis* AN5 (cedida pela Dr^a Eliana Roxo do Instituto Biológico de São Paulo).
- *M. tuberculosis*: H₃₇Rv.

3.1.3. Amostras de Leite

- Leite pasteurizado, integral, tipo A, adquirido comercialmente.
- Leite “in natura”, coletado de 23 búfalas (07 com PPD+ e 16 com PPD -), provenientes de uma fazenda localizada na região de São Carlos, como mostrados na Tabela 4. As amostras de leite foram coletadas pelo médico veterinário: Dr. Marcos Rogério Alves Pinto, dias consecutivos do mesmo animal, conservou-se sobre refrigeração para serem processadas imediatamente, evitando assim o risco de contaminação do leite por outros microrganismos indesejáveis.

Número do animal	008	009	013	015	017	018	019	021	022	024	026	034	038	042	091	132	143	A020	A029	A036	Dançarina	Marreta	Morango
PPD +/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Tabela 4. Amostras de leite de búfalas e resultado do teste da tuberculina.

3.1.4. Animais

- Os búfalos (*Bubalus bubalis*) são da raça Murrah, destinados unicamente à produção de leite e derivados, principalmente muzzarella e doces. Esses animais são mantidos em uma propriedade na região de São Carlos.

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Meio de Stonebrink (St)

Este meio de cultura e o meio de Lowestein-Jensen (Item 3.2.2.) são específicos para o cultivo de micobactérias.

Fosfato potássico di-hidrogenado	0,6 g
Sulfato de Magnésio	0,06 g
Citrato de Magnésio	0,15 g
L-asparagina	0,9 g
Piruvato de Sódio	2,0 g
6 ovos inteiros	
Solução aquosa de verde malaquita a 1 %	10 mL
Água destilada	200 mL

Os sais foram dissolvidos em banho-maria, este foi autoclavado 15 minutos/121°C. O meio foi, então, homogeneizado junto com os ovos e distribuído em tubos para serem coagulados a 80°C por 60 minutos.

3.2.2. Meio de Löwestein-Jensen (LJ)

Fosfato Monopotássico H ₂ PO ₄	2,5 g
Sulfato de Magnésio MgSO ₄	0,24 g
CitratodeMagnésio	0,6g
Asparagina	3,6 g
Verdemalaquita	8mL
Glicerol	12 mL
H ₂ O destilada	600 mL
24 ovos inteiros	

Após a dissolução dos sais na água em banho-maria, foi acrescentado o glicerol e a mistura foi autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Foram adicionados os ovos, e o meio foi, então, homogeneizado e distribuído em tubos para serem coagulados a 80°C por 60 minutos.

3.2.3. Preparo dos ovos para a confecção dos meios

Os ovos frescos foram lavados com água e sabão e deixando os imersos em álcool 70%, por 6 horas. A seguir, estes foram quebrados assepticamente (sob fluxo laminar) e transferidos para um "erlenmeyer" contendo pérolas de vidro para perfeita homogeneização. A seguir, a mistura foi filtrada em camada dupla de gaze.

3.3. Coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen

Baseando-se na técnica descrita por Sato (1999), foram usados os seguintes reagentes: a fucsina fenicada de Ziehl foi preparada dissolvendo 0,3g de fucsina básica em 10,0mL de etanol a 95%. Na seqüência foi dissolvido 5,0g de fenol cristalizado em 100,0mL de água destilada. Por último foi misturada 10,0mL da solução de fucsina com 90,0mL da solução de fenol aquoso.

A solução descorante foi preparada adicionando-se cuidadosamente 3,0mL de ácido clorídrico concentrado a 97,0mL de etanol a 95% com agitação suave.

Para o preparo do contra-corante, 0,3g de azul de metileno foi dissolvido em 100,0mL de água destilada.

Procedimento: Os esfregaços foram preparados a partir da cultura obtida do leite previamente descontaminado. O material foi espalhado com espátula de madeira ou alça esterilizada, em 2/3 da lâmina com o auxílio de uma gota de KOH 20 ou 40% ou uma gota de água.

Após a secagem dos esfregaços e fixação pelo calor, os esfregaços foram submetidos à coloração. Inicialmente, os esfregaços foram cobertos pela fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen e aquecidos até a emissão de vapores. Cinco minutos foram esperados e o corante foi escorrido. Em seguida, os esfregaços foram lavados com a solução de álcool-ácido clorídrico. Por fim o esfregaço foi coberto com a solução de azul de metileno por um a dois minutos e os esfregaços foram lavados em água de torneira.

Após a secagem da lâmina, foi feita a leitura em microscópio óptico comum utilizando óleo de imersão e objetiva de 100x. Os bacilos corados em vermelho sobre um fundo azul foram considerados álcool-ácido resistentes.

3.4. Padronização da metodologia para PCR

3.4.1. Preparação da suspensão micobacteriana e inoculação no leite

A Figura 2 mostra que inicialmente o leite tipo A foi inoculado com suspensões de micobactérias em concentração decrescente. Para tal, foi transferido uma alçada plena de *M. bovis* AN5, crescida em meio de Petragani para um tubo contendo pérolas de vidro mais solução fisiológica (0,85%). O tubo foi agitado em agitador tipo *vortex* por 20 segundos, e ajustado segundo a escala visual de McFarland (BOLLELA et al., 1999) até chegar na escala nº 1 de suspensão bacilar (10^7 UFC/mL). A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais seriadas: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Na seqüência, 5mL de cada diluição bacteriana foram empregados para contaminar 45mL de leite Tipo A, foi obtido assim as seguintes diluições : 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Para determinar o número de bacilos viáveis, em seguida, foi semeado 0,2mL de cada amostra de leite contaminado, em tubos com meio de Stonebrink, incubando-os a 37°C por até 90 dias. Estas mesmas amostras de leite contendo

suspensão bacilar nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram empregadas para padronizar os ensaios de PCR.

A Figura 2 mostra também uma seqüência de procedimentos utilizados na padronização da metodologia de PCR visando a identificação do *M. bovis* através do leite.

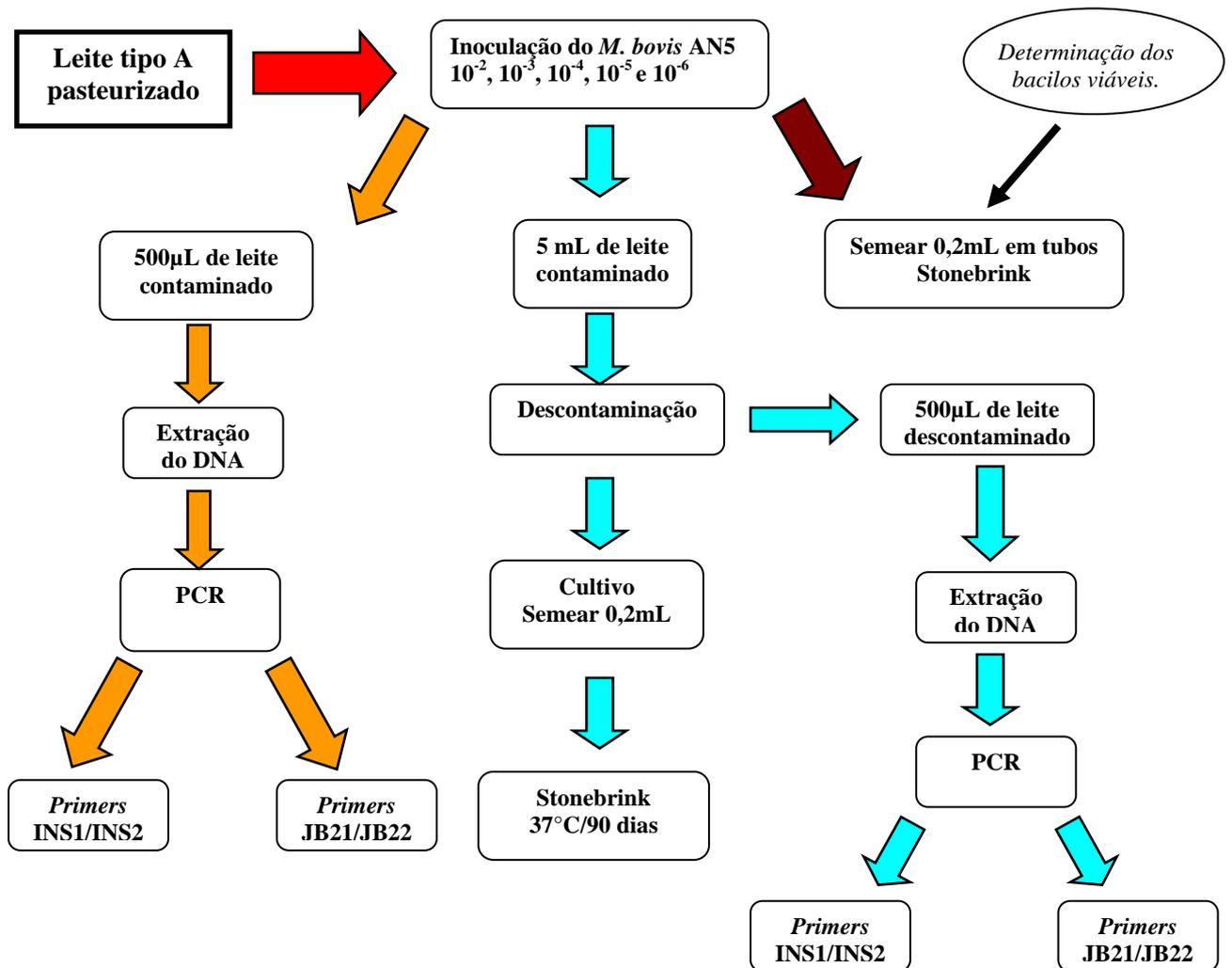


Figura 2. Fluxograma das metodologias empregadas na padronização da PCR.

3.4.2. Padronização da técnica do PCR

3.4.2.1. Descontaminação

Uma vez que havia o interesse em utilizar a mesma amostragem do leite para a técnica do PCR e para o cultivo, inicialmente as amostras foram submetidas ao processo de

concentração e de descontaminação. As amostras foram então processadas de acordo com a técnica de Terruggi (2000), com algumas modificações:

Em tubo estéril com tampa de rosca, foram adicionados 3,00mL de solução de NaOH (4%) e LSS e 5,00mL de cada amostra de leite contaminado com as respectivas suspensões bacilares (triplicata). A mistura foi agitada e incubada a 37°C por 20 minutos e, neutralizada com HCl (2N) + vermelho de fenol (indicador) até a viragem de violeta a amarelo violáceo. Após a neutralização, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos. Após o descarte da fase intermediária (soro), as outras 2 frações (gordura + sedimento) foram homogeneizadas com solução fisiológica (0,85%). As amostras assim preparadas foram utilizadas tanto para cultivo como para a técnica da PCR.

O cultivo foi realizado transferindo 0,2mL do homogeneizado para dois tubos com meio de Stonebrink e quatro tubos com meio Lowenstein Jensen, e estes incubados a 37°C com tensão de CO₂.

3.4.2.2. Extração do DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada segundo técnica preconizada por Roxo et al. (2002). Para tal, foi colocado 500µL de leite de cada uma das diluições 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ em 5 microtubos e submetidos a fervura por 5 minutos a 100°C, após o que resfriadas e congeladas “overnight”. Após a lise, a extração do DNA foi realizada adicionando 500µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), agitação por inversão por 10 minutos e centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante mais a gordura branca num volume aproximado de 500µL foi então transferido para um novo tubo, acrescido de igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os tubos agitados por inversão por 10 minutos, e submetidos a centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm. A fase aquosa

(sobrenadante) foi então transferida para um novo tubo, acrescido de igual volume de álcool absoluto, agitados e centrifugados como descrito anteriormente. O sobrenadante foi desprezado por simples inversão do tubo. Os tubos foram então novamente lavados com álcool absoluto, utilizando um volume de 100µL de álcool por tubo. Os tubos foram agitados por inversão por 10 minutos, e submetidos à centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado por inversão, deixando os tubos invertidos para secar. Após a secagem total do álcool, o DNA foi ressuspendido com 50µL de H₂O MilliQ em cada tubo. Após a adição da H₂O MilliQ, levou-se então os tubos para congelamento para posterior amplificação do DNA.

3.5. PCR

Foram realizados em microtubos de 500µL, em volume total 25µL em cada tubo contendo 22,0µL de PCR Supermix (Gibco) : 2,5µL de PCR Buffer 10x, 4,0 µL de dNTPs (1,25 mM cada), 1,125µL de *Taq* DNA- polimerase 250 U; 0,5µL de cada *primer* (100pmol por µL) e 2 µL da amostra de DNA. Foram testados 2 pares de *primers* sendo o par INS1 e INS2 para o complexo *M. tuberculosis* e o par JB21 e JB22 para a espécie *M. bovis*.

3.5.1. *Primers* utilizados

Primers específicos para o Complexo *M. tuberculosis* (VAN SOOLINGEN et al., 1994) desenhados para amplificar um segmento de 245 pares de base da seqüência de inserção IS6110:

INS-1: 5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3'

INS-2: 5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA 3'

Primers específicos para *M. bovis* (RODRIGUEZ et al., 1995; RODRIGUEZ ET AL, 1999), com produto final de PCR de 500 pares de base:

JB-21: 5' TGCTCCGCTGATGCAAGTGC 3'

JB-22: 5' CGTCCGCTGACCTCAAGAAG 3'

3.5.2. Ciclos

As ampliações dos *primers* INS-1 e INS-2 foram feitas utilizando o programa de Zumarraga et al., (1999): As ampliações neste programa foram feitas utilizando o seguinte esquema: *hot start* de 96°C por 4 minutos; depois foram feitos 8 ciclos de : 96°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e baixando 1°C por ciclo; 72°C por 1 minuto. Depois mais 30 ciclos de: 96°C por 1 minuto; 65°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos. Depois do último ciclo, as amostras foram mantidas a 72°C por 8 minutos e guardadas em refrigeração (4°C) por tempo indefinido, até o processamento.

As ampliações dos *primers* JB-21 e JB-22 foram feitas no programa baseado no protocolo de Sakamoto (1997), com algumas modificações: As ampliações neste programa foram feitas utilizando o seguinte esquema: *hot start* de 96°C por 4 minutos; depois foram feitos 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto; 64°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto. Depois do último ciclo, as amostras foram mantidas em 72°C por 10 minutos e guardadas em refrigeração (4°C) por tempo indefinido, até o processamento.

As reações foram realizadas em um termociclador modelo MJ Research, Inc.

3.5.3. Análise do produto amplificado

As eletroforeses foram realizadas em cuba horizontal, usando tampão de

corrida TBE (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA, pH 8,0) a 0,5 M e gel de agarose a 1,0% (p/v) com 2,25µL de brometo de etídio para a análise dos produtos amplificados. A visualização destes foi realizada em transiluminador ultravioleta. As documentações foram feitas em filme para fotografias instantâneas (Polaroid).

3.6. Pesquisa de campo

3.6.1. Amostragem

Foram coletadas três amostras em dias consecutivos de 23 animais diferentes, portanto 69 amostras no total. Essas três amostras foram homogeneizadas para que cada animal tivesse apenas uma amostra a ser testada e que fosse representativa do animal. Dentre esses 23 animais, foi comprovado através do teste da tuberculina, que sete animais eram PPD+ (Tabela 4).

Foram feitos os mesmos procedimentos para todas as amostras, na seguinte seqüência: descontaminação, semeadura em meios de cultura, PCR diretamente do leite descontaminado e não descontaminado, baciloscopia das colônias suspeitas, determinação do perfil de ácidos micólicos e realização das técnicas de PCR e PRA nas colônias confirmadas como BAAR (Figura 3).

A Figura 3 mostra uma seqüência de procedimentos utilizados no processamento das amostras de leite cru de búfalas PPD + e PPD -.

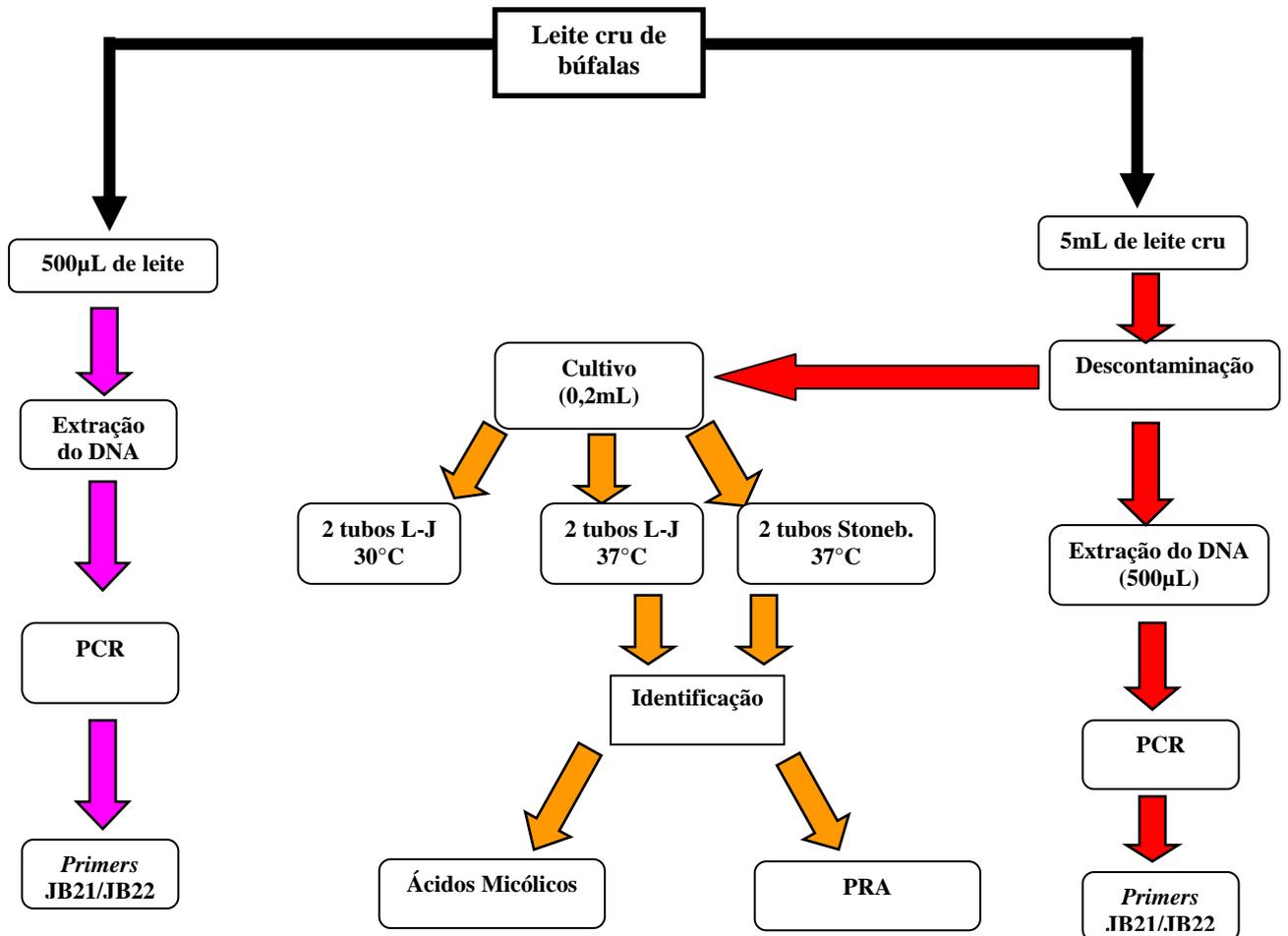


Figura 3. Fluxograma dos processamentos das amostras de leite cru de búfalas.

3.7. Cultivo e PCR das amostras de leite de búfalas

Para o cultivo, as amostras de leite foram processadas e descontaminadas de acordo com o Item 3.4.2.1. e semeadas em meio de LJ e Stonebrink, incubando-se em 30 e 37°C. As colônias com características de micobactérias foram submetidas à coloração de Ziehl Neelsen para confirmação da presença de BAAR.

Na PCR, todas as amostras de leite foram submetidas ao processo de extração de DNA (Item 3.4.2.2.). Foi realizada a tentativa de amplificação direta do *M. bovis* a partir de amostras de leite cru sem descontaminação e também de amostras previamente

descontaminadas (Item 3.5.) Nesta amplificação, foram utilizados apenas os *primers* JB21/JB22, pois foram os mais sensíveis e específicos.

3.8. Identificação das Micobactérias isoladas nos meios de cultura

As micobactérias foram analisadas quanto a sua álcool-ácido resistência, morfologia colonial e tempo de crescimento. Para completar a identificação, foi realizada a PCR específica para *M. bovis* (Item 3.5) e também foi realizado o PRA (SILVA et al. 2001) com algumas modificações para confirmação de gênero e identificação das espécies de micobactérias. Além disso, paralelamente realizou-se também a análise do perfil de ácidos micólicos para complementar a identificação das espécies micobacterianas.

3.9. Método químico da análise de ácidos micólicos

Os ácidos micólicos são os principais compostos da parede, e são ligados ao peptídeoglicano através da arabinogalactana. Neste estudo obteve-se os ácidos micólicos na forma livre inicialmente. Abaixo está descrito desde a técnica de extração de ácidos micólicos, até a interpretação dos seus perfis (LEITE et al. 1995).

3.9.1. Saponificação e purificação dos ácidos graxos

Uma alçada plena de microrganismos foi emulsionada em 2,0mL de metoxietanol contendo 5% de hidróxido de potássio, mantendo-os aquecidos a 110°C por 2 horas. Após o resfriamento do material, foi feita a acidificação com 1,0mL da solução de ácido sulfúrico a 20% acrescentando também 20,0mL de água destilada. Após agitação, foi acrescentado 10 mL de éter. Foi retirada a camada etérea contendo os ácidos micólicos

lavando-a com água até eliminar resíduos de ácido. Foi feita a evaporação do éter em banho-maria a 50°C obtendo-se os ácidos micólicos na forma seca.

3.9.2. Metilação com diazometano

Para remover a mobilidade dos ácidos micólicos em cromatografia de camada delgada (CCD), estes foram metilados inicialmente com diazometano. Para tal, foi acrescentado 1,0 mL da solução etérea de diazometano em cada tubo contendo os ácidos micólicos. Após 10 minutos de contato, foi feita a evaporação do éter.

3.9.3. Cromatografia em camada delgada

Uma alíquota de 10mg de cada amostra metilada foi separada com auxílio de pipeta capilar, em 2 placas de cromatografia em sílica gel G. As placas foram eluídas com o diclorometano(1x), e outra com uma mistura (10/90) de éter de petróleo (3x). As placas foram reveladas com vaporização de uma solução de rodamina B. Foram determinados os perfis de ácidos micólicos pela comparação com os padrões conhecidos. Como padrões ou testemunhas foram acrescentados nas placas de cromatografia os ácidos micólicos das seguintes espécies: *M. chelonae* (I, II), *M. fortuitum* (I, V), *M. tuberculosis* (I, III, IV) e *M. avium-intracellulare* (I, IV, VI).

3.10. Método do PRA (Análise da PCR por enzimas de restrição) baseado no protocolo de Silva et al. (2001) com algumas modificações

3.10.1. Preparo das amostras para PCR (cultura)

Uma alçada plena de bactérias foi misturada com 100µL de tetrítion 1% (tampão TE) em um *ependorf* e submetida a três ciclos de 10 minutos de fervura e congelamento. Apenas 3µL do sobrenadante foi usado na PCR.

3.10.2. Amplificação do PRA

Amplificação do fragmento 439pb do gene *hsp65* utilizando os *primers* Tb11-(5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT3') e Tb12-(5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT 3') foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Silva et al. 2001. Para cada amostra adicionou-se 23µL de mistura reativa (Supermix, Gibco), 0,25µL de cada *primer* (Tb11 e Tb 12) e 3µL de template. O DNA foi submetido à desnaturação a 94°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. O último passo consistiu na extensão do DNA a 72°C por 5 minutos.

Após essa amplificação, fez-se uma eletroforese em gel de agarose 1% para se verificar a amplificação do fragmento 439pb, o que certificaria a presença de bactérias do gênero *Mycobacterium*. No passo seguinte, 10µL do material amplificado foram digeridos respectivamente pelas enzimas *BstE* II e *Hae* III (Gibco) para a identificação a nível de espécie. A restrição com a enzima *BstE* II ocorreu a 60°C por uma hora e a restrição com a enzima *Hae* III ocorreu a 37°C por uma hora.

Os fragmentos gerados pelas enzimas de restrição foram então analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% com marcadores de peso molecular de 50 e 25pb (DNA ladder, Gibco).

3.10.3. Análise dos resultados do PRA

As imagens dos géis em filmes Polaroides foram posteriormente digitalizadas por scanner e posteriormente analisadas pelo programa ImageMaster VDS software (version 3.0 - PHARMACIA BIOTECH). Calculou-se através deste programa os pesos moleculares de cada banda utilizando como referência as cepas padrão (*Mycobacterium bovis* AN5) e os marcadores de peso molecular de 50 e 25pb. Analisaram-se os padrões de restrições obtidos e as cepas identificadas de acordo com a base de dados do site (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) PRASITE, 2000.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da Metodologia da PCR para amostras de leite

Na Figura 4, são apresentados os resultados do PCR empregando os pares de *primer* INS1 e INS2, utilizando o programa de amplificação de Zumarraga et al., (1999).

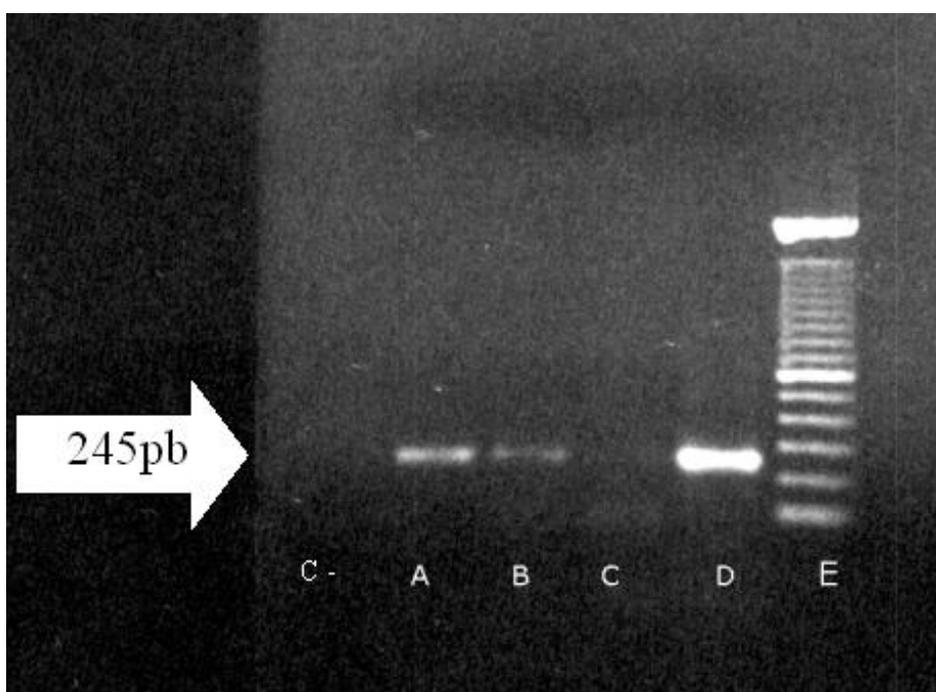


Figura 4. Detecção do PCR utilizando os *primers* INS-1 e INS-2.

A coluna C indica o controle negativo. As letras A, B, C correspondem as diluições de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , respectivamente. A letra D é o padrão *M. bovis* AN5 e a letra E é o marcador de peso molecular (100pb).

Os resultados do PCR empregando os pares de *primer* JB-21 e JB-22 foram realizados utilizando o programa de amplificação de Sakamoto (1997), com algumas modificações (Figura 5).

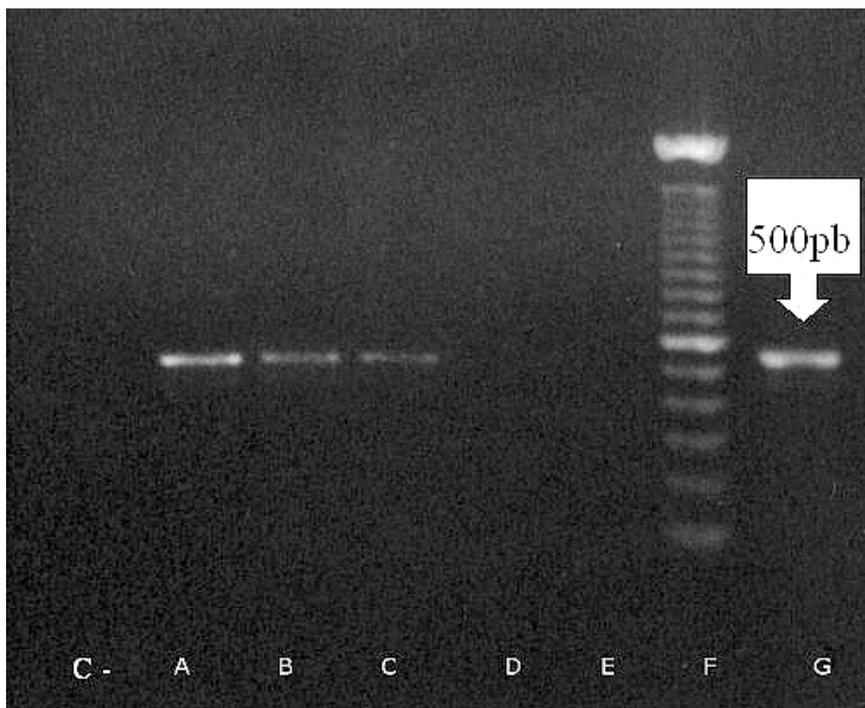


Figura 5. Detecção do PCR utilizando os *primers* JB-21 e JB-22.

A coluna C- indica o controle negativo. As letras A, B, C, D e E correspondem as diluições de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , respectivamente. A letra G é o padrão *M. bovis* AN5 e a letra F é o marcador de peso molecular (100pb).

A determinação dos bacilos viáveis nas diluições de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foi feita através da cultura do leite contaminado em meio Stonebrink e posterior contagem das colônias isoladas. A Tabela 5 mostra o nível de sensibilidade da PCR baseando-se no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) encontradas.

Diluição	N° UFC/mL	PCR	
		Primers INS1 INS2	Primers JB21 JB22
10 ⁻²	8000	+	+
10 ⁻³	800	+	+
10 ⁻⁴	80	-	+

Tabela 5. Resultados da padronização da metodologia para PCR.

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 4 e 5 e na Tabela 5, a metodologia empregando os pares de *primer* INS1 e INS2 e a técnica de Zumarraga et al., (1999), a amplificação indicativa da presença do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* foi verificada até a diluição de 10⁻³. Para a metodologia empregando os pares de *primer* JB-21 e JB-22 do programa de Sakamoto (1997) com algumas modificações, foi possível detectar presença de *Mycobacterium bovis* até a diluição de 10⁻⁴.

4.2. Teste da PCR para *M. bovis* e PRA diretamente do leite cru

Primeiramente, foram testadas todas as amostras de leite coletadas (23) utilizando o mesmo protocolo padronizado anteriormente (Item 3.4.2.) para descontaminação e extração de DNA. Posteriormente, foi feita a tentativa de amplificação do *M. bovis* diretamente do leite, sem a descontaminação prévia (Itens 3.4.2.2. e 3.5.).

4.2.2. Baciloscopia das colônias suspeitas de serem Micobactérias

Das 23 amostras analisadas, as colônias suspeitas de serem micobactérias foram verificadas em 10 amostras. As colônias foram submetidas a baciloscopia, e a presença

de BAAR (bacilos álcool-ácido resistentes) foi confirmada em nove colônias. Após a baciloscopia, foi feito o repique destas colônias para se tentar obter colônias puras. Porém foram obtidas apenas cinco culturas puras. Dessas culturas puras, todas tinham colônias amarelas ou alaranjadas, duas cresceram em meio de Lowenstein-Jensen e três em meio de Stonebrink. Os resultados do exame do PPD destas amostras estão apresentados na Tabela 6.

As outras culturas ou não cresceram ou foram rapidamente contaminadas. Destas cinco culturas puras, provenientes de cinco animais diferentes, foi feita a análise dos ácidos micólicos e o PCR para *M. bovis* e PRA para gênero e espécie através da análise das enzimas de restrição.

Cultura pura (Animal)	019	038	143	A029	Marreta
PPD (+/-)	-	+	-	-	+

Tabela 6. Resultado do teste da tuberculina das amostras puras isoladas pela cultura.

4.3. Identificação das micobactérias provenientes do leite de búfalas, e semeadas nos meios Stonebrink e Lowenstein-Jensen

4.3.1. Método químico da análise de ácidos micólicos

A Figura 6 mostra uma placa de sílica gel com os resultados do método químico da análise dos ácidos micólicos, baseado na técnica de Leite et al. (1995). Na mesma figura estão representados os ácidos micólicos do *M. tuberculosis* como padrão 1, *M. avium*, como padrão 2 e *M. fortuitum* e *M. chelonae*, como padrão 3. Essas micobactérias são utilizadas conjuntamente pois elas contém todos os ácidos micólicos existentes nas micobactérias. Por análise comparativa, foi possível saber quais os ácidos micólicos estão presentes nas amostras a serem identificadas (Tabela 7).

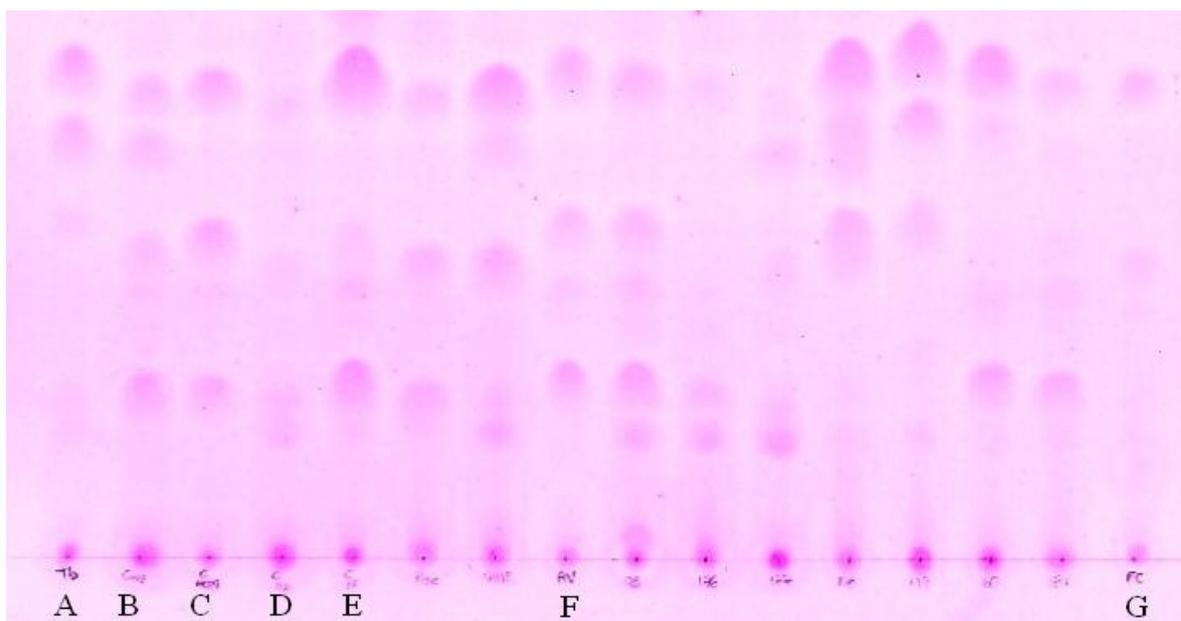


Figura 6. Perfil dos ácidos micólicos das amostras testadas.

As letras B, C, D e E correspondem, respectivamente, as amostras Marreta, A029, 143 e 038. As letras A, F e G correspondem, respectivamente, ao padrão de *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. fortuitum*/*M. chelonae*.

AMOSTRAS	NÚMERO DOS ÁCIDOS MICÓLICOS
019	NR
038	I, IV, VI
143	I, II, IV
A029	I, IV, VI
Marreta	I, II, IV
<i>M. tuberculosis</i>	I, III, IV
<i>M. avium</i>	I, IV, VI
<i>M. chelonae</i> e <i>M. fortuitum</i>	I, II, V

Tabela7. Resultado da análise dos perfis dos ácidos micólicos, após comparação com os padrões.

NR- Não Realizado.

4.3.2. Método PRA nas culturas positivas na baciloscopia

Primeiramente, foi feita a amplificação utilizando os *primers* Tb11 e Tb12 (Item 3.10.1.) para confirmação do gênero *Mycobacterium* e depois esse material amplificado foi digerido pelas enzimas de restrição (método PRA Item 3.10.2.). Posteriormente, foi realizada a eletroforese e logo após foi feita também a análise dos padrões de restrição utilizando o programa ImageMaster VDS software (version 3.0 - PHARMACIA BIOTECH).

A Figura 7 mostra a amplificação pelo método PRA, utilizando os *primers* Tb11 e Tb12 (SILVA et al. 2001). A eletroforese revela um produto de 439pb tanto para o padrão *M. bovis* (G) quanto para as outras amostras (A, B, C, D e E), mostrando que todas as amostras testadas são pertencentes ao gênero *Mycobacterium*.

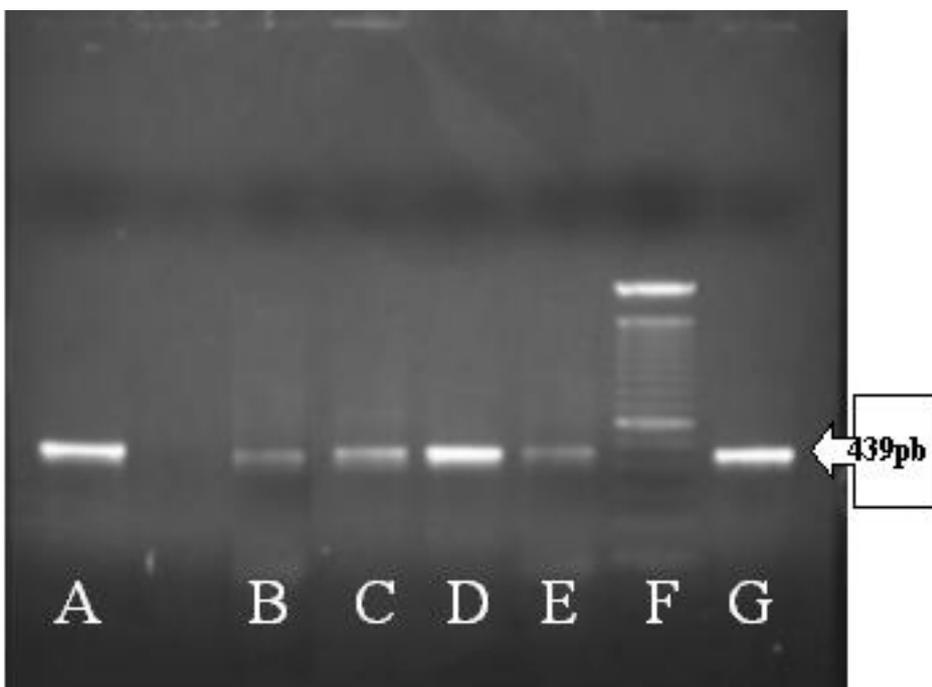


Figura 7. Resultados do PRA utilizando os *primers* Tb11 e Tb12.

As letras A, B, C, D e E correspondem, respectivamente, as amostras 019, 038, 143, A029 e Marreta. A letra F é o marcador de peso molecular (100pb) e a letra G corresponde ao padrão *M. bovis* AN5.

A Figura 8 mostra o gel de agarose 3% com os resultados da digestão das enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Ao lado esquerdo estão os resultados da digestão das amostras pela enzima *BstE II* e do lado direito estão os resultados da digestão das amostras pela enzima *Hae III*.

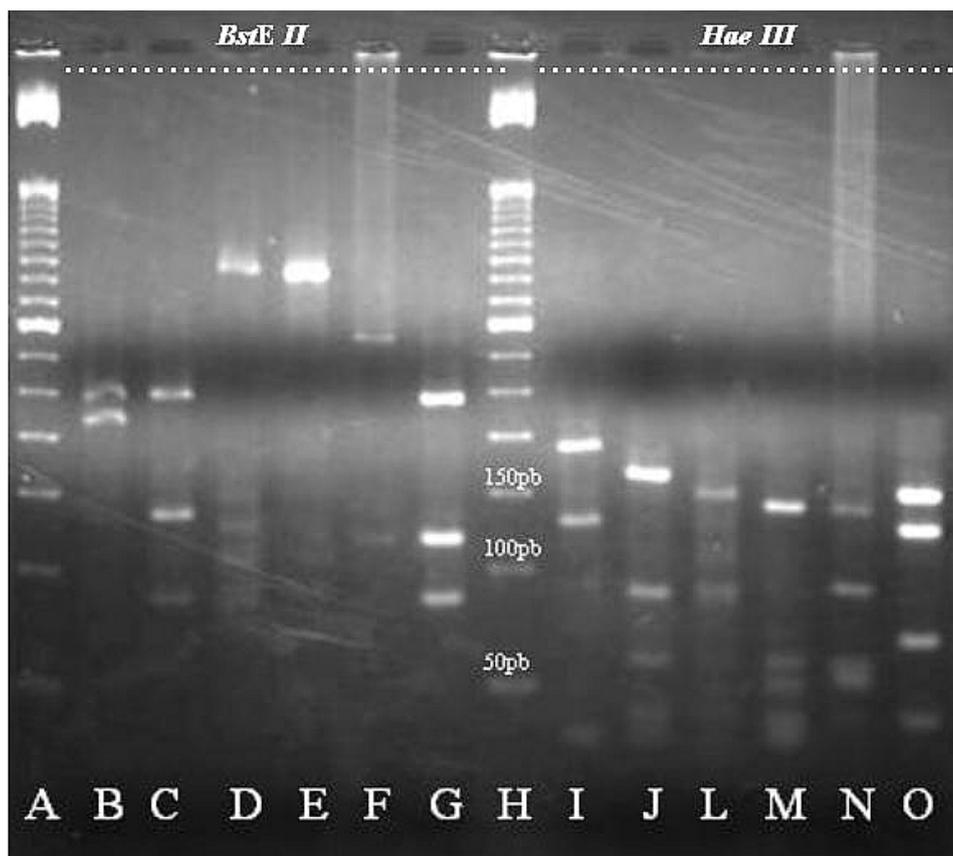


Figura 8. Gel de eletroforese das amostras de DNA submetidas a digestão.

As letras B e I, C e J, D e L, E e M, F e N correspondem, respectivamente, as amostras 019, 038, 143, A029 e Marreta. A e H indicam os marcadores de peso molecular de 50pb, e as letras G e O correspondem ao padrão *M. bovis* AN5.

A análise dos padrões de restrição, geraram fragmentos de DNA de diferentes pesos moleculares, e os perfis analisados usando o programa ImageMaster VDS software (version 3.0 - PHARMACIA BIOTECH) junto com a base de dados da internet PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) resultou nas seguintes micobactérias: *M. simiae*, *M. flavescens* e *M. intracellulare*, além do padrão AN5 (*M. bovis*) que a metodologia identificou apenas como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* (Tabela 8).

Amostras Isoladas	Valores dos pesos Moleculares		Padrão PRA
	<i>BstE II</i>	<i>Hae III</i>	
019	233/205/0	190/131/0	<i>M. simiae</i>
038	247/135/88	168/90/61	<i>M. intracellulare</i>
143	439/0/0	149/115/0	<i>M. simiae</i>
A029	436/0/0	143/53/43	<i>M. flavescens</i>
Marreta	330/119/0	139/91/53	<i>M. simiae</i>
AN5	233/116/84	150/126/66	Complexo <i>M. tb</i>

Tabela 8. Resultados obtidos com o PRA utilizando a base de dados da internet PRASITE, 2000.

A Tabela 9 mostra a síntese dos resultados de todas as metodologias empregadas na identificação de micobactérias. Pode-se verificar que apesar da PCR ser bastante sensível, essa técnica não detectou nenhum *M. bovis* nas amostras analisadas, por outro lado, através da cultura bacteriana, foi possível isolar micobactérias em 10 amostras. Dessas 10 amostras, apenas em nove foi confirmada a presença de BAAR. Sendo que apenas em cinco amostras foi possível fazer a identificação pela técnica dos ácidos micólicos e do PRA. Resultando na identificação das seguintes micobactérias: três *M. simiae*, uma *M. flavescens* e uma *M. intracellulare*.

Amostra - Animal	PPD (+/-)	PCR <i>M.bovis</i>	BAAR (+/-)	Meio Ston/LJ	Cor colônia	Temp. °C	Ácidos Micólicos	PCR-PRA Gênero	Padrão PRA
008		-	-					-	
009		-	-					-	
013	+	-	+	STON	amarela	37	-	-	-
015	+	-	-					-	
017	+	-	+	LJ	amarela	37	-	-	-
018		-	-					-	
019		-	+	LJ	amarela	37	NR	-	<i>M. simiae</i>
021		-	-					-	
022		-	-					-	
024		-	-					-	
026	+	-	+	LJ	amarela	37	-	-	-
034	+	-	+	STON	amarela	37	-	-	-
038	+	-	+	STON	alaranjada	37	I, IV, VI	-	<i>M.intracellulare</i>
042		-	-					-	
091		-	-					-	
132		-	-					-	
143		-	+	STON	Ama -claro	37	I, II, IV	-	<i>M. simiae</i>
A020		-	-					-	
A029		-	+	LJ	alaranjada	37	I, IV, VI	-	<i>M. flavescens</i>
A036		-	-					-	
Dançarina		-	-					-	
Marreta	+	-	+	STON	amarela	37	I, II, IV	-	<i>M. simiae</i>
Morango		-	-					-	

Tabela 9. Resultados obtidos com a cultura bacteriana, baciloscopia, ácidos micólicos, PCR- *M. bovis* e PRA.

NR- Não Realizado.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Com o aumento de casos da tuberculose, principalmente nas últimas décadas, também têm crescido o interesse de buscar novas metodologias que possibilitem uma identificação mais rápida do que o cultivo e mais precisa que a observação microscópica do material após ser submetido a coloração de Ziehl-Neelsen. Contudo, até o momento, este que seria o “método ideal”, ainda não foi alcançado.

Os maiores problemas laboratoriais encontrados no estudo das micobactérias estão ligados diretamente a seu crescimento lento, mesmo naquelas bactérias consideradas de crescimento rápido (aproximadamente sete dias). Entretanto, o aumento de casos de infecção por espécies antes consideradas ambientais, surgiu a necessidade da identificação precisa da espécie envolvida, uma vez que essas espécies ambientais são naturalmente resistentes ao esquema terapêutico normalmente usado no tratamento do *M. tuberculosis* (WOODS et al., 2000).

Dentre as micobactérias ambientais, apenas algumas espécies são potencialmente patogênicas ao homem e aos animais, produzindo doenças cutâneas e pulmonares, linfadenites e doenças disseminadas (LE DANTEC et al. 2002). Esses microrganismos representam um alto risco à saúde, principalmente entre a crescente população de imunodeprimidos. Antes do uso de inibidores de proteases na terapia antiretroviral, infecções disseminadas causadas por MOTT, principalmente o complexo *Mycobacterium avium* eram freqüentes em pacientes com AIDS. As micobacterioses causadas por MOTT são normalmente usadas como critério de diagnóstico da AIDS em pacientes portadores de HIV (LE DANTEC et al. 2002; FALKINHAN 3rd, 2003).

Em relação à doença tuberculose, termo tuberculose bovina deveria ser limitado ao gado bovino, mas freqüentemente é usado para descrever a doença causada pelo

bacilo da tuberculose bovina em humanos, independentemente do tipo de hospedeiro (COLLINS, 2000). No homem, a incidência deste tipo de tuberculose é muito menor do que a incidência da doença causada pelo bacilo da tuberculose humana. Entretanto, se a tuberculose bovina que acomete tanto animais como humanos, for negligenciada, esta doença poderá se tornar um problema tão sério quanto o que causa o *M. tuberculosis* (COLLINS, 2000). Atualmente, 3,1% de todos os casos de tuberculose humana no mundo são devidos ao *M. bovis* (COSIVI et al. 1998). Tendo em vista todos os problemas que a tuberculose de origem animal causam e poderão causar caso não haja um controle efetivo da doença em nosso país, o objetivo de padronizar uma metodologia reprodutível, rápida, confiável, e de execução fácil para detectar a presença de *M. bovis* diretamente do leite, vem atender uma das grandes necessidades de saúde pública no Brasil.

Em nossos resultados da padronização, os dados da Tabela 5 mostram que das duas metodologias de PCR testadas para detectar *M. bovis* inoculado artificialmente no leite, a metodologia empregando os pares de *primer* INS1 e INS2 (ZUMARRAGA et al. 1999) resultou na amplificação de um fragmento de 245pb, indicando a presença do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* até a diluição 10^{-3} . Com a metodologia empregando os pares de *primer* JB-21 e JB-22 (SAKAMOTO, 1997), foi possível detectar um fragmento de 500pb indicativo da presença de *M. bovis* até a diluição de 10^{-4} . O cultivo de *M. bovis* disperso no leite, realizado em paralelo, indicou que a positividade para o par de *primer* INS1/INS2 era de 800 UFC/mL e de JB21/JB22 de 80 UFC/mL. Neste sentido, nossos resultados indicam maior sensibilidade da metodologia que emprega os *primers* JB21 e JB22. Outra vantagem pode ser destacada para esta metodologia, uma vez que os *primers* INS1/INS2 são específicos para o complexo *M. tuberculosis* ao passo que os *primers* JB21/JB22 amplificam predominantemente *M. bovis* (RODRIGUEZ et al., 1995; RODRIGUEZ ET AL, 1999). Zumarraga et al. (1999), utilizando os mesmos pares de *primers* INS1 e INS2 conseguiram

detectar a presença de até 10 UFC/mL de *M. bovis* no leite artificialmente infectado. Para obter este nível de sensibilidade os autores empregaram métodos adicionais de concentração de DNA, além de terem diluído as amostras até 1/100, para evitar a ação de inibidores da reação. Por outro lado, o limite de detecção encontrado para o par de *primers* JB21/JB22 de 80 UFC/mL é altamente satisfatório, uma vez que um úbere infectado pode excretar um número de bacilos da tuberculose variando de 500 a 500.000 BAAR/mL de leite (ZANINI et al. 1998).

No leite cru inoculado artificialmente com *M. bovis* e outras micobactérias, Rodriguez et al. (1995), utilizando os *primers* JB21 e JB22, obtiveram amplificação do fragmento 500pb somente nas amostras de leite inoculadas com *M. bovis*, porém o mesmo não ocorreu com as amostras que continham outras micobactérias. Com isso os autores quiseram demonstrar que a metodologia tem grande valia para identificar *M. bovis*, fato constatado também por outros autores (RODRIGUEZ et al., 1999; KIDANE et al., 2002).

Em relação às amostras de leite provenientes de búfalas (Tabela 9) não foi possível a identificação de *M. bovis* tanto pela cultura como pela PCR. Mesmo as amostras provenientes de búfalas com PPD+ foram negativas para *M. bovis*. Considerando a sensibilidade da técnica de PCR por nós padronizada de 80 UFC/mL e da cultura de até 10 UFC/mL (BRASIL, 1994), o que se pode sugerir é de que as amostras por nós estudadas ou realmente não continham células de *M. bovis* ou que sua presença foi inferior a 10 UFC/mL. Nossas considerações são reforçadas por Zanini et al. (1998) e Collins et al. (2000) que sugerem pouca ou nenhuma excreção de bacilos pelo leite.

Em micobacteriologia, por razões óbvias, técnicas moleculares têm sido aplicadas primeiramente na tentativa de melhorar a detecção do *M. tuberculosis*. Mais recentemente, contudo, através de esforços e colaboração internacional, a atenção está sendo direcionada para o *M. bovis* como um importante patógeno animal e com potencial de se

tornar zoonose. A natureza intracelular e impermeável das paredes das micobactérias, junto com a presença de inibidores da reação em cadeia da polimerase (PCR) em espécimes clínicos, limitam a eficiência da reação da PCR. Isto pode se tornar problemático e acarretar em possíveis complicações para o uso da reação da PCR junto com espécimes clínicos e em particular com espécimes colhidos de animais tuberculosos, onde é comum encontrar apenas pequenas quantidades de bacilos (AYELE et al., 2004).

Houve uma dificuldade muito grande sempre quando se tentou fazer a PCR de uma amostra de leite cru diretamente. A presença de inibidores é um dos fatores reguladores da reação da PCR e têm se tornado um problema comum quando se tenta trabalhar diretamente com material clínico. Uma das estratégias para eliminar essa influência negativa consiste em diluir as amostras o suficiente para que os inibidores se diluam também. No caso do leite essa inibição pode ser devido a grande presença de DNA proveniente de células somáticas que formam parte da composição normal do leite (ZUMARRAGA et al., 1999). Outro possível fator inibidor seria a alta porcentagem de gordura presente no leite, aproximadamente 3% em vacas e 10% em búfalas (JENSEN e THOMPSON, 1995), e os lipídios da parede das micobactérias representando entre 20 e 40% do peso seco total desta bactéria. É de se esperar que as micobactérias tenham uma alta afinidade pela gordura presente no leite. A eliminação da mesma é necessária para se poder realizar a amplificação, mas também isto leva, em parte, a eliminação de micobactérias da amostra, diminuindo a sensibilidade da reação (ZUMARRAGA et al., 1999).

Na Tabela 9 podemos verificar ainda que colônias de micobactérias foram recuperadas de nove amostras, sendo que seis eram provenientes de búfalas com PPD+ e 3 com PPD-. Entretanto das nove amostras positivas para a baciloscopia, foi possível obter colônias isoladas de apenas cinco (21,7%) amostras, as outras quatro (17,4%) amostras ou foram contaminadas por outras bactérias de crescimento rápido ou não cresceram quando

repicadas em outros tubos. Mesmo fazendo a prévia descontaminação das amostras de leite (TERRUGGI, 2000) com algumas modificações, ocorreram muitas dificuldades na obtenção de colônias isoladas. Este fato pode ser devido ao leite cru, pois além de ser um excelente substrato para muitos microrganismos, já vinha contaminado com outras bactérias, o que dificultava o crescimento de micobactérias. Jones et al. (1966), tentaram algumas técnicas para isolar micobactérias diretamente do leite cru. Eles relatam a dificuldade do isolamento de bactérias de crescimento lento, como as micobactérias, pois há no leite uma microflora que contém vários gêneros de microrganismos de crescimento rápido.

As cinco culturas foram identificadas em nível de espécie pela análise dos ácidos micólicos (LEITE et al., 1995) e técnica da PCR por enzimas de restrição (PRA) (SILVA et al., 2001). As espécies de micobactérias identificadas pelo PRA foram confirmadas pelo perfil de ácidos micólicos, sendo verificado 100% de correlação entre as duas metodologias (Tabela 9).

M. simiae foi a espécie mais freqüente sendo responsável por 60% dos isolados, seguidos de *M. flavescens* e *M. intracellulare* com respectivamente um isolamento cada. *M. simiae* têm sido isolado de água de abastecimento e fezes de indivíduos assintomáticos. Muito raramente causa patologia em humanos, incluindo doença pulmonar crônica, osteomelite e infecção sistêmica com comprometimento do rim, sendo uma bactéria altamente resistente aos antibióticos (SATO, 1999; KONEMAN et al., 2001); *M. flavescens* é raramente considerado como patógeno humano, considerada micobactéria de contaminação ambiental, tem a água e o solo como reservatórios (KONEMAN et al. 2001); e *Mycobacterium intracellulare* pertence ao complexo *M. avium* (MAC), é considerado um patógeno oportunista no homem, podendo causar adenopatias cervicais principalmente em crianças e infecções pulmonares em idosos. Esta associada às infecções oportunistas em pacientes com AIDS, provocando infecções disseminadas (SATO, 1999). Todas essas

micobactérias foram isoladas do leite cru de búfalas, usado na fabricação de “muzzarella”, doce de leite, queijos etc. Esses dados estão de acordo com Leite et al. (2003), que também utilizou a análise dos ácidos micólicos por cromatografia de camada delgada para identificar várias espécies de micobactérias provenientes de amostras de leite. Além do *M. bovis*, foram identificadas micobactérias consideradas ambientais, como *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. kansasii* e *M. gordonae*.

O isolamento de micobactérias atípicas do leite tem relevante importância para a saúde pública, porque *M. fortuitum*, tanto quanto *M. avium* e *M. kansasii* são potencialmente patogênicos para o homem, especialmente em indivíduos imunodeprimidos. O isolamento de outras micobactérias atípicas como *M. terrae*, *M. flavescens* e *M. smegmatis* é menos comum e também de pequena importância para a saúde pública (KAZWALA et al., 1998).

A participação do leite na transmissão da tuberculose bovina e de outras micobacterioses foi evidenciando por Hosty e McDurmont (1975) pelo isolamento de *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens* and *M. fortuitum* de 68,8% de um total de 51 amostras de leite cru. Appuswami et al., em 1980, observou *M. tuberculosis*, *M. bovis* e micobactérias atípicas em 4,3% de um total de 209 amostras de leite coletadas de rebanhos de gado leiteiro. Batish et al., em 1989, isolou *M. spp* de amostras de leite cru coletadas de vacas clinicamente normais. Pardo et al. (2001), coletaram e analisaram 780 amostras de leite de 52 animais positivos ou suspeitos de tuberculose. Utilizando hidróxido de sódio (2%) e ácido sulfúrico (1,8%) na descontaminação do leite, *Micobacterium spp* foi confirmado em 10% das amostras, que resultou nas seguintes espécies: *M. avium*, *M. fortuitum* e *M. bovis*. Além do *M. bovis*, outras espécies de micobactérias como *M. intracellulerae*, *M. scrofulaceum* e *M. vaccae*, também foram identificadas por Bastawrons et al., em 1995, como agentes de tuberculose em bovinos, camelos e búfalos abatidos para

consumo. Estas micobactérias estavam presentes em bovinos e búfalos que apresentaram reação positiva ao teste da tuberculina.

Freitas et al., em 2001, realizou um estudo anátomo-patológico e microbiológico a respeito da tuberculose em búfalos abatidos para consumo em Belém do Pará. Entre as micobactérias isoladas nas lesões encontradas nas carcaças, o *M. bovis* foi a espécie predominante, correspondendo a 67,3% das cepas isoladas, oito (16,3%) eram cepas de *M. fortuitum*, quatro (8,2%) de crescimento rápido e escotocromogênico, duas (4,1%) do complexo *M. avium* e duas (4,1%) de *M. gordonae*.

Das cinco micobactérias isoladas neste trabalho, duas foram provenientes de búfalas com PPD+ e três de búfalas PPD-. Das amostras de leite provenientes de búfalas PPD+ foram isoladas o *M. intracellulare* e o *M. simiae*. Como o teste de PPD nas búfalas foi realizado apenas utilizando a tuberculina de mamíferos (específica para *M. bovis*), não foi possível fazer uma comparação com a tuberculina aviária (específica para micobactérias do complexo *avium*) para se detectar uma possível reação do animal a bactérias ambientais. Estes dados indicam que o teste da tuberculina simples possui problemas como reação a outras micobactérias ambientais, reação alérgica do próprio animal à tuberculina, e resultados falso-positivos quando aplicado em bubalinos sem a utilização do teste comparativo confirmatório com tuberculina aviária, tornando então não confiável os seus resultados.. Láu (1994), sugeriu que os bubalinos podem apresentar uma reação alérgica ao teste da tuberculina e Kanameda et al. (1999) questionaram a sensibilidade e especificidade do teste para bubalinos, mostrando que pode haver reação positiva do teste devido ao contato desses animais com outras micobactérias consideradas ambientais. Os autores ainda sugeriram que diagnósticos mais precisos devem ser desenvolvidos para a correta detecção da tuberculose em búfalos, como por exemplo, o teste da tuberculina comparativo usando a tuberculina de mamíferos junto com a tuberculina aviária.

Levando-se em conta as predileções do bubalinos de chafurdar na água e na lama, esses animais devem ter uma larga exposição a micobacterias saprófitas e ambientais, que poderiam causar uma reação cruzada com a tuberculina bovina (PPD), gerando assim vários resultados falso-positivos (KANAMEDA et al., 1999). Hein e Tomasovic, em 1981, isolaram essas micobactérias ambientais de búfalos selvagens na Austrália, porém eles não incluíram os teste da tuberculina no estudo. O teste da tuberculina pode produzir reações cruzadas não somente com outras espécies de micobactérias, mas também com outros diferentes patógenos, como por exemplo, *Corynebacterium* e *Nocardia* spp (ROMERO et al., 1999). Uma baixa especificidade do teste da tuberculina em búfalos pode ser devido a sensibilização do animal a micobactérias saprófitas (KANAMEDA et al., 1999).

Neste trabalho, assim como outros autores (HOSTY e McDURMONT, 1975; JONES et al., 1966; KANAMEDA e EKGATAT, 1995; KAZWALA et al., 1998; LEITE et al., 2003; VITALE et al., 1998) foram encontradas micobactérias ambientais (MOTT) no leite, que podem ter influenciado o teste de PPD nos bubalinos. Por outro lado, este achado pode indicar um risco potencial ao ser humano, pela veiculação dessas bactérias potencialmente patogênicas através do leite cru, utilizado normalmente na produção de alimentos como doce de leite e vários laticínios.

Também no búfalo, a tuberculose precisa ser melhor conhecida, para que qualquer campanha de controle dessa doença considere as características peculiares da espécie, as aptidões das raças e o sistema de produção predominante em cada região (FREITAS et al., 2001).

Conclusão

6. CONCLUSÃO

- A metodologia empregando os pares de *primer* JB21 e JB22 é mais sensível quando testamos a identificação direta do leite, pois detectou até 80 UFC/ mL contra 800 UFC/ml da metodologia dos *primers* INS1 e INS2.
- A metodologia empregando os pares de *primers* JB21 e JB22 foi também mais específica que a metodologia usando os pares de *primers* INS1 e INS2, pois amplifica um fragmento do genoma do *Mycobacterium bovis*, ao contrário o outro par de *primers* fornece como resultado apenas Complexo *M. tuberculosis*.
- No leite de Bubalinos, podem ser encontradas MOTT (*Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli*) como, por exemplo: *M. simiae*, *M. intracellulare* e *M. flavescens*, que foram identificadas neste trabalho.
- A cultura bacteriológica foi mais sensível que a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quando testada diretamente usando amostras de leite, como por exemplo, o de búfalas.
- As técnicas dos ácidos micólicos juntamente com a técnica do PRA (Análise da PCR por enzimas de restrição) foram ferramentas fundamentais na identificação das espécies de micobactérias provenientes de culturas puras.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB – Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. Disponível em :
<http://www.bufalo.com.br> Acesso em : 26/02/2003.

AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche: principios y aplicaciones**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1991, 547p.

ANDRADE, L. E. C. Theoretical and basic principles in molecular biology. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 33, p.31-40, 1993.

APPUSWAMY, S.; BATISH, V. K.; PARKASHI, O. M.; RANGANATHAN, B. Prevalence of mycobacteria in raw milk sampled in Karnal, India. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 43, n. 4, p. 778-781, 1980.

ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp.*caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, v.53, p.1785–1789, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BUIATRIA, A tuberculose bovina como zoonose. **TbBovNet**. Disponível em <http://www.mgar.vet.br/buiatria/tbbovnet/tbzoon.htm> Acesso: 09/11/2003

AYELE, W. Y.; NEILL, S. D.; ZINSSTAG, J.; WEISS, M. G.; PAVLIK, I.. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **Int. J. Tuberc.Lung. Dis.**, Paris, v.8, n.8, p.924–937, 2004.

BASTAWRONS, A. F.; ABDEL-HAFFEZ, M. M.; ABDEL-KADER, H. A.; SEDDEK, R. S. Isolation and identification of mycobacteria from cattle and camels lymph nodes in Assiut. **Assiut Vet. Med. J.**, Assiut, v. 33, n. 66, p. 91-101, 1995.

BATISH, V. K.; YADAV, J. S.; GROVER, S. Detection of tubercle bacilli in milk. **Livestock Adviser**, v. 14, n. 1, p. 38-42, 1989.

BIBLIOTECA DE MANGUINHOS/CICT/FIOCRUZ, **Série Doenças : Tuberculose**.2004.

Disponível em: <http://www.fiocruz.br/cict/estrutura/departamentos/bibmang/pindex.shtml>

Acesso:07/12/2004.

BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FOSNECA, B. A. L. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 9, p. 1073-1076, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº2 de 10 jan. 2001. Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 jan. 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acesso: 28/09/ 2004

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT**. Brasília, DF, 2004.

Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acesso: 28/09/ 2004

BRASIL. Ministério da Saúde, **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1994.115p.

COLLINS, C. H. The bovine tubercle bacillus. **Brit. J. Biomed. Sci.**, London, v. 57, p. 234-240, 2000.

COOKSEY, R. C.; Recent advances in laboratory procedures for pathogenic mycobacteria. **Clin. Lab. Med.**, Philadelphia, v.23, n. 4, p. 801-821, 2003.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.40, n. 1-2, p.53-63, 1994.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F.; DE KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerg. Inf. Dis.**, Atlanta, v.4, p.59-70, 1998.

DANKER, W. M.; DAVIS, C. E. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in Baja California region.

Pediatrics. v.105, n. 6,p.e79-e79, 2000. Disponível em :
<http://www.pediatrics.org/cgi/cotent/full/105/6/e79> Acesso em:10/11/2003

DE KANTOR, I. N. Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal. OPAS/OMS. **Nota técnica nº 11**, 1979, 63 p.

DE KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.40, p.5-14, 1994.

DUBEY, P. C., SUMAN, C. L., SANYAL, M. K. et al. Factors affecting composition of milk of buffaloes. **Ind. J. Anim. Sci.**, New Delhi, v. 67, n. 9, p.802-804, 1997.

FALKINHAM 3rd, J. O. Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, n. 9, p.5685-5689, 2003.

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. Control of bovine tuberculosis, particularly in Brazil. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v. 11, p. 9-13, 1997.

FREITAS, J. A. Tuberculose em um búfalo (*Bubalus bubalis* var *bubalis* Linneus, 1978). **Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará**, v. 14, p. 32-42, 1984.

FREITAS, J. A.; GUERRA, J. L.; PANETTA, J. C. Características da tuberculose observada em búfalos abatidos para consumo: aspectos patológicos e identificação de micobactérias. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 170-176, 2001.

GRANGE, J. M., YATES, M.D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Vet Microbiol.**, Amsterdam, v.40, p.137-51,1994.

HAAGSMA, J. Bovine tuberculosis. **OIE Manual (Amendment 2)**, 1995, 11 p.

HEIN, W. R.; TOMASOVIC, A. A. An abattoir survey of tuberculosis in feral buffaloes. **Aust. Vet. J.**, Victoria, v. 57, n. 12, p.543-547, 1981.

HERNANDEZ DE ANDA, J.; EVANGELISTA, T. R.; VALENCIA, G. L.;HODGERS, M. M. An abattoir monitoring system for diagnosis of tuberculosis in cattle in Baja California, Mexico. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.211, n.6, p. 709-711,1997.

HOSTY, T. S.; MACDURMONT, C. I. Isolation of acid-fast organisms from milk and oysters. **Health Lab. Sci.**, Washington, v. 12, n. 1, p. 16-19, 1975.

JENSEN, R. G.; THOMPSON, M. P. **Handbook of milk composition**. San Diego: Academic Press, 1995, 919p.

JONES, E. J.; JENKINS, D. E.; HSU, K. H. K. Raw milk as a source of mycobacteria. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 12, p. 979-984, 1966.

KANAMEDA, M.; EKGATAT, M. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Trop. Anim. Health Prod.**, Edinburgh, v. 27, p. 227-228, 1995.

KANAMEDA, M.; EKGATAT, M.; WONGKASEMJIT, S.; SIRIVAN, C.; PACHIMASIRI, T.; KONGKRONG, C.; BUCHAPHAN, K.; BOONTARAT, B. An evaluation of tuberculin skin tests used to diagnose tuberculosis in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Prev. Vet. Med.**, Amsterdam, v. 39, p.129-135, 1999.

KAZWALA, R. R.; DABORN, C. J.; KASILUKA, L. J. M.; JIWA, S. F. H.; SHARP, J. M.; KAMBARAGE, D. M. Isolation of mycobacterium species from raw milk of pastoral cattle of the southern highlands of Tanzania. **Trop. Anim. Health Prod.**, Edinburgh, v.30, p. 233-239, 1998.

KIDANE, D.; OLOBO, J. O.; HABTE, A.; NEGESSE, Y.; ASEFFA, A.; ABATE, G.; YASSIN, M. A.; BEREDA, K.; HARBOE, M. Identification of the Causative Organism of Tuberculous Lymphadenitis in Ethiopia by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.40, n. 11, p. 4230–4234, 2002.

KIM, B.; PARK, B.; KIM, S.; BAI, G.; KIM, S.; KOOK, Y. Differentiation of Mycobacterial species by PCR-Restriction Analysis of DNA (342 Base Pairs) of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*) . **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 6, p. 2102-2109, 2001.

KLEEBOG, H. K. Tuberculosis humana do origen bovino y salud publica. **Rev. Sci. Tech. O.I.E.**, Paris, v.3, p.55-76, 1984.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 1465p.

LÁU, H. D. **Doenças em búfalos no Brasil. Diagnóstico, epidemiologia e controle.**

Brasília: Embrapa-SPI; Belém: Embrapa-CPATU,1999, 202p.

LÁU, H. D. Important economic diseases in buffaloes. **Proceedings IVth World Buffalo**

Congress, São Paulo, p.209-220, 1994.

LE DANTEC, C.; DUGUET, J.; MONTIEL, A.; DUMOUTIER, N.; DUBROU, S.; VICENT,

V. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from water distribution system. **J.**

Clin. Microbiol., Washington, v. 68, n. 3, p. 1025-1032, 2002.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY,

R. C. Isolation and Identification of Mycobacteria from Livestock Specimens and Milk

Obtained in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p.319-323, 2003.

LEITE, C. Q. F.; BARRETO, A. M. W.; LEITE, S. R. A. Thin-layer chromatography of

mycobactins and mycolic acids for the identification of clinical mycobacteria. **Rev.**

Microbiol., São Paulo, v. 26, n. 1, p. 192-199, 1995.

LEITE, C. Q. F.; FERRACINI JUNIOR, R.; FALCÃO, D. P. Prevalência e distribuição de

micobactérias nas águas de algumas regiões do Estado de São Paulo-Brasil. **Rev. Microbiol.**,

São Paulo, v. 20, n. 4, p. 432- 441, 1989.

LEITE, C. Q. F.; SOUZA, C. W. O., LEITE, S. R. A. Identification of mycobacteria by thin

layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: Four

years of experience. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 6, p. 801-805, 1998.

MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A.; AMARAL, J. B.; SOUZA, J. C.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. V. Composição Físico-Química e Produção do Leite de Búfalas da Raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. **Rev. bras. zootec.**, Viçosa, v. 30, n.3, p.1084-1088, 2001. Suplemento 1.

MILIAN-SUAZO, F.; SALMAN, M. D.; RAMÍREZ, C.; PAYEUR, J. B.; RHYAN, J. C.; SANTILLAN, M. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in México. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 1, n. 61, p. 86-89, 2000.

MODA, G.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M.; COSIVI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tuber. Lung. Dis.**, Avenel, v. 77, p. 103-108, 1996.

MORAES, M. J. **Rápidas observações sobre tuberculose em bubalinos**. Macapá: Associação de Assistência Técnica e Extensão Rural do Amapá, 1990, 15p.

MULLIS, K.; FALOONA, F. A.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol.**, Cold Spring Harbor, v.51, p.263-273, 1986.

NAIN, S. P. S.; KAUSHIK, R. K. Examination of tuberculin-positive animals. **Indian J. Anim. Scien.**, New Delhi, v.55, n.10, p.877-878, 1985.

NICOLETTI, P. An update on selected diseases which affect buffaloes. **Proceedings IVth World Buffalo Congress**, São Paulo, v.1, p.221-228, 1994.

OLIVEIRA, R. S.; SIRCILI, M. P.; UEKI, S. Y.; TELLES, M. A.; SCHNABEL, B.; BRIONES, M. R.; LEAO, S. C. PCR-restriction enzyme analysis of a bone marrow isolate from a human immunodeficiency virus-positive patient discloses polyclonal infection with two *Mycobacterium avium* strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, 2000 v.38, n.12, p.4643-4645, 2000.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tuber. Lung Dis.**, Avenel, v.76, n.1, p.1-46, 1995.

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P.; CHI, K. D. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** São Paulo, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

PATEL, R. S.; MISTRY, V.V. Physicochemical and structural properties of ultrafiltered buffalo milk and milk powder. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 80, p. 812-817, 1997.

PEREZ, A.; RENIERO, A.; FORTEIS, A.; MEREGALLI, S.; LÓPEZ, B.; RITACCO, V.; Estudio de *Mycobacterium bovis* en la leche mediante métodos bacteriológicos y la reacción en cadena de la polimerasa. **Rev. Argent. Microbiol.**, Buenos Aires, v.34, p. 45-51, 2002.

PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, n. 12, p. 5355-5365, 2003.

PORTUGAL, M. A. S. C.; GIORG, W.; SIQUEIRA, P. A. Ocorrência de tuberculose em bubalinos (*Bubalus bubalis* var. *Bubalis lineus*, 1789) no Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 4, p.231-238, 1971.

PRASITE. Identification of Mycobacteria. **Hospices cantonaux**. 2000. Disponível em : <http://app.chuv.ch/prasite/index.html> acesso em : 11 out. 2004.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988. **J. Comp. Pathol.**, Edinburg, v.99, p.357-399, 1988.

RATLEDGE, C.; STANFORD, J. **The biology of the mycobacteria**. London: Academic Press, v.2, 1983, 554p.

ROCHA, A. S.; BARRETO, A. M. W.; CAMPOS, C. E. D.; DA SILVA, M. V.; FONSECA, L.; SAAD, M. H.; DEGRAVE, W. M.; SUFFYS, P. N.. Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-Restriction Enzyme Analysis of *hsp65*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, n.11, p. 4191-4196, 2002.

RODRIGUEZ, J. G.; MEJIA, G. A.; DEL PROTILLO, P.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiol.**, Reading, v.141, p. 2131-2138, 1995.

RODRIGUEZ, J. G.; FISSANOTI, J. C.; DEL PORTILLO, P.; PATARROYO, M. E.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A. Amplification of a 500-base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.7, p.2330-2, 1999.

ROMERO, R. E.; GARZÓN, D. L.; MEJÍA, G. A.; MONROY, W.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. **Can. J. Vet. Res.**, Ottawa, v.63, p. 101-106, 1999.

ROXO, E. **Avaliação da resposta imunoalérgica e cutânea à tuberculina em bubalinos.** São Paulo, 1996. 55f. Dissertação (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 1996.

ROXO, E. *M. bovis* como causa de zoonose. **Rev. Cienc. Farm.**, Araraquara, v.18, n.1, p. 101-108, 1997a.

ROXO, E. Tuberculose e brucelose em búfalos. In: OLIVEIRA, G.J.C.; ALMEIDA, A.M.L.; SOUZA FILHO, U.A. **O búfalo no Brasil.** Cruz das Almas: UFBA, 1997b. p.185-196.

ROXO, E.; AMARAL, R. Surto de tuberculose em búfalos no Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 65, p.92, 1998, suplemento.

ROXO, E.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; HARAKAVA, R.; RUGGIERO, A. P. M.; VIALTA, A. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA de *Mycobacterium bovis* a partir de leite. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, p.46, 2002, suplemento.

RUSSEL, A. D.; YARNYCH, V. S.; KOULIKOVSKII, A.V. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases.** Geneve: WHO, 1984, 61p.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FOLOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T., ERLICH, H. A. ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.

SAKAMOTO, S. M. **Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 1997. 43f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 1997.

SATO, D. N. *Mycobacterium*. In: SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis: Eventos, 1999, 531p.

SCALON, M. P.; QUINN, P. J. Inactivation of *Mycobacterium bovis* in cattle slurry by five volatile chemicals. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 89, n.5, p.854-861, 2000.

SILVA, C. F.; UEKI, Y. M.; GEIGER, D. C. P.; LEÃO, S. C. *hsp65* PCR- Restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 25-28, 2001.

SOMOSKÖVI, A.; KÖDMON, C.; LANTOS, Á.; BARTFAL, Z.; TAMÁSI, L.; FÜZI, J.; MAGYAR, Z. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Löwenstein-Jensen medium. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 6, p. 2395-2397, 2000.

SOUZA, A. W.; SOUZA, C. F. A.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, A.L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.13, n.59, p.22-27, 1999.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.2, p.175-178, 1993.

TERRUGGI, C.H.B. **Padronização de metodologia para recuperar M. bovis veiculado pelo leite e derivados.** 2000. 72f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP, Rio Claro, 2000.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999, 586p.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.16, n.2, p.319-54, 2003.

VACCARO, A.; CAPUANO, G.; DAMIANO, N. Ricerche sulla prevalenza della tubercolosi nell'allevamento bufalino della province di caserta e salerno. **Sec.Con.Intern.sull'allemamento bufalino nel mondo. Atti del Convegno.** Caserta. p.191, 1982.

VALE, W.G. Water buffalo world uptake. Prospects of buffalo production in Latin America. **Proceedings IVth World Buffalo Congress,** São Paulo, p.75-87, 1994.

VALLE, J. L. E. Características e usos do leite de bubalinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, v.27., Campinas, SP. *Anais...Campinas: SBZ*, p.739-743, 1990.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E. W. HAAGSMA, J.; EGER, T.; HERMANS, V. W. M.; RITACCO, V. et al. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, p. 2425-2433, 1994.

VANNAMAYYA, P. R.; SHARMA, A. K.; PARAI, T. P.; PALIWAL, O. P.; PARIHAR, N. S. Evaluation of tuberculin and johnin tests with pathological lesions in buffaloes. **Indian Jour.Anim.Sci.**, New Delhi, v.3, n.57, p.189-190, 1987.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p.609-615, 2002.

VITALE, F.; CAPRA, G.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph nodes aspirates, and nasal swabs. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 4, p. 1050-1055, 1998.

WELDLOCK, D. N.; SKINNER, M. A.; LISLE, G. W.; BUDDLE, B. M. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. **Microbres infect.**, Paris, v. 4, p 471-480, 2002.

WOODS, G. L.; BERGMANN, J. S.; WITEBSKY, F. G.; FAHLE, G. A.; BOULET, B.; PAUNT, M.; BROWN, B. A.; WALLACE JR, R. J.; WANGER, A. Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 2, p.656-661, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing. Geneva: World Health Organization, 2004. **(WHO report)**. Disponível em: <http://www.who.int/> Acesso : 28/09/ 2004

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*). Geneva, **Nota Técnica**, n.130, 1993, 27p.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T .P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIORAVANTE, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction Identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n6, p. 809-813, 2001.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T.; MOTA, P.; SALAS, C. E. Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polymerase chain reaction. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**, Berlin, v. 45, n.8, p. 473-479, 1998.

ZUMARRAGA, M. J.; CATALDI, A.; BIGI, F.; ALITO, A.; ROMANO, M. I. Application of polymerase chain reaction (PCR) in the detection of mycobacteria in milk. **Rev. Argent. Microbiol.**, Buenos Aires, v 31, p. 4-5, 1999. Suplemento 1.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)