

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
PROGRAMA ACADÊMICO DE TUBERCULOSE**

**“PESQUISA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* ENTRE CEPAS DE
MICOBACTÉRIAS ISOLADAS NO COMPLEXO HOSPITALAR HUCFF / IDT-
UFRJ NO PERÍODO DE 2005-2006”**

Luciana Fonseca Sobral

**RIO DE JANEIRO
Fevereiro, 2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

“PESQUISA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* ENTRE CEPAS DE
MICOBACTÉRIAS ISOLADAS NO COMPLEXO HOSPITALAR HUCFF / IDT-
UFRJ NO PERÍODO DE 2005-2006”

Luciana Fonseca Sobral

Orientadores: Prof. Neio Lucio Fernandes Boechat

Profa. Leila de Souza Fonseca

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em
Clínica Médica - Setor Ciências Pneumológicas da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Ciências

Banca Examinadora

Prof . Eduardo Rocha

Prof. Walter Lilenbaum

Prof. Rafael Silva Duarte

Suplente: Dra Maria Helena Feres Saad

Rio de Janeiro

Fevereiro, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Sobral, Luciana Fonseca

Pesquisa de *Mycobacterium bovis* entre cepas de micobactérias isoladas no complexo hospitalar HUCFF/IDT-UFRJ no período de 2005-2006 / Luciana Fonseca Sobral. - Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2009.

xi, 63 f. : il. ; 31cm.

Orientadores: Neio Lucio Fernandes Boechat e Leila de Souza Fonseca

Dissertação (Mestrado) – UFRJ / Faculdade de Medicina / Clínica Médica, 2009.

Referências bibliográficas; f. 56-63

1. *Mycobacterium bovis*. 2. Amostras clínicas humanas. 3. Tuberculose zoonótica. 4. Clínica Médica – Tese. I . Boechat, Neio Lúcio Fernandes. II. Fonseca, Leila de Souza. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina. Clínica Médica. IV Título.

DEDICATÓRIA

**A meus filhos Jéssica e Eduardo,
razão do meu viver.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade de ter permitido que eu chegasse até aqui.

Aos meus orientadores Neio Boechat e Leila Fonseca, pela oportunidade, dedicação, ajuda, carinho e paciência.

A Equipe do Laboratório de Micobactérias do Instituto de Microbiologia UFRJ, em especial ao Professor Rafael Silva Duarte, às mestrandas Karen e Rachel pela ajuda, e principalmente ao Marlei que esteve sempre a disposição para colaborar.

A todos os meus colegas de trabalho do Laboratório de Micobactérias do HUCFF/IDT-UFRJ, pela colaboração, em especial a Francinete e Elizabete, companheiras de trabalho, pela amizade, ajuda e constante apoio e a Anna Grazia e Gisele Vieira, responsáveis pelo laboratório, pela compreensão e incentivo.

A coordenação da Pós-Graduação na pessoa do coordenador Professor José Roberto Lapa e Silva e da secretária Teresa Gouda.

À minha família, pelo incentivo, apoio e ajuda durante todos os momentos.

Aos meus queridos amigos, que não tenho como citar neste pequeno espaço, por todos os momentos de lazer e descontração, pelo incentivo e apoio.

A CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
Histórico.....	01
Agente Etiológico.....	04
Tuberculose Bovina.....	06
Tuberculose Zoonótica.....	08
Diagnóstico.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVO.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5. RESULTADOS.....	27
6. DISCUSSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
HCL	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IDT	Instituto de Doenças do Tórax
LJ	Lowenstein – Jensen
LSPs	large sequence polymorphisms
NALC	N- acetyl –cisteína
NaOH	Hidróxido de sódio
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PZA	Pirazinamida
TB	Tuberculose
RNA	Àcido ribonucléico
UV	Ultravioleta
VNTR	Variable-number tandem reapeat
WHO	World Health Organization

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Relatos de TB ocupacional devido à exposição a aerossóis contendo *M. bovis* de gado bovino ou outros animais infectados.

TABELA 2 : Casos de tuberculose humana por *M. bovis*, descrito na literatura, distribuído por regiões.

TABELA 3: Características fenotípicas utilizadas para discriminação entre cepas de *M. tuberculosis* e *M. bovis*.

Tabela 4a: Iniciadores utilizados no presente estudo.

TABELA 4b: Positividade de 664 espécimes respiratórios, enviados em 2005 para isolamento de micobactérias, em meio contendo glicerol ou piruvato como fonte de carbono.

TABELA 5: Positividade de 123 espécimes extra-respiratórios, enviados em 2005 para isolamento de micobactérias, em meio contendo glicerol ou piruvato como fonte de carbono.

TABELA 6: Positividade de 929 espécimes respiratórios, enviados em 2006 para isolamento de micobactérias, em meio contendo glicerol ou piruvato como fonte de carbono.

TABELA 7: Positividade de 77 espécimes extra-respiratórios, enviados em 2006 para isolamento de micobactérias, em meio contendo glicerol ou piruvato como fonte de carbono.

TABELA 8: Comparação do meio de LJ com glicerol e piruvato no favorecimento de isolamento de cepas do complexo *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas.

TABELA 9: Características dos isolamentos das cepas de pacientes que tiveram pelo menos uma cepa crescendo apenas no meio com piruvato, ano 2005.

TABELA 10: Características dos isolamentos das cepas de pacientes que tiveram pelo menos uma cepa crescendo apenas no meio com piruvato, ano 2006.

TABELA 11: Propriedades bioquímicas e fisiológicas de micobactérias de crescimento lento não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e comumente isoladas de espécimes clínicos.

TABELA 12: Propriedades bioquímicas e fisiológicas de micobactérias de crescimento rápido não pigmentadas.

TABELA 13: Identificação preliminar das micobactérias não tuberculosas de crescimento lento

TABELA 14: Identificação preliminar das micobactérias de crescimento rápido

TABELA 15: Resultados dos testes complementares para identificação de *M. bovis* a partir das cepas isoladas em 2005.

TABELA 16: Resultados dos testes complementares para identificação de *M. bovis* a partir das cepas isoladas em 2006.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Filogenia do complexo *M. tuberculosis* baseado em regiões de deleção. O eixo vertical apresenta as deleções. No eixo horizontal estão os grupos de microrganismos que as deleções tem revelado.

Figura 2: Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio a 0,5% para a visualização dos produtos da PCR.

RESUMO

Luciana Fonseca Sobral

Pesquisa de *Mycobacterium bovis* entre Cepas de Micobactérias Isoladas no Complexo Hospitalar HUCFF/IDT-UFRJ no Período de 2005-2006

A rotina de isolamento de micobactérias no HUCFF/IDT-UFRJ utiliza meio contendo glicerol como fonte de carbono. Para investigar a ocorrência de *Mycobacterium bovis* em espécimes clínicos, foi adicionado à rotina um tubo de meio de cultura contendo piruvato de sódio, no período de dois anos, 2005-2006. Neste período foram semeados nos dois meios 8.140 espécimes clínicos, com crescimento de micobactérias em 1.793 espécimes. Oitenta e três cepas cresceram apenas no meio com piruvato e foram consideradas como suspeitas de *M. bovis*. Os testes bioquímicos de triagem forneceram perfil de *Mycobacterium tuberculosis* (niacina e nitrato positivos e catalase negativa) em 65 cepas, perfil de micobactéria não tuberculosas em 17 cepas, e uma cepa contaminou. Entre as 65 cepas com perfil de *M. tuberculosis* 28 foram submetidas ao teste de resistência à pirazinamida e 25 foram sensíveis. Em 42 cepas foi realizada amplificação de DNA por reação de polimerase em cadeia utilizando os primers Rv0577 (específico para o complexo *M. tuberculosis*) e Rv1510 (presente em várias espécies do complexo *M. tuberculosis*, mas ausente em *M. bovis* e BCG). Todas as cepas testadas, incluindo as três cepas com resistência a pirazinamida, apresentaram perfil de *M. tuberculosis*. Os resultados não evidenciaram a presença de *M. bovis* entre os espécimes clínicos processados no HUCFF/IDT, sugerindo que a tuberculose zoonótica deve ser rara na área metropolitana do Rio de Janeiro.

ABSTRACT

Luciana Fonseca Sobral

Search of *Mycobacterium bovis* strains among the mycobacterial strains isolated in the period of 2005-2006 at the HUCFF/IDT-UFRJ

Routine detection of mycobacteria at HUCFF/IDT-UFRJ includes inoculation of clinical specimens in glycerol-containing culture medium. In order to investigate the concomitant occurrence of *Mycobacterium bovis* over a period of 2 years (2005-2006), specimens were additionally inoculated in culture medium containing sodium pyruvate. During this time, a total of 8,140 specimens were inoculated in both media, and mycobacteria were isolated from 1,793 specimens. Eighty-three isolates grew in pyruvate containing medium only and were considered presumably *M. bovis*. Biochemical screening tests yielded in 65 cases profiles consistent with *Mycobacterium tuberculosis* (positive for niacin and nitrate, negative for catalase), and in 17 cases mycobacteria other than tuberculosis (MOTT) profiles. One isolate was contaminated. Pyrazinamide resistance was assessed for 28 of 65 *M. tuberculosis* isolates, and 25 isolates were sensitive. A total of 42 *M. tuberculosis* isolates, including 3 pyrazinamide resistant isolates, was evaluated by polymerase chain reaction amplification using primers specific for the open reading frames Rv0577 (*M. tuberculosis* complex specific) and Rv1510 (present in several mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex but absent from *M. bovis* and BCG). All isolates tested presented a *M. tuberculosis* specific pattern. Therefore, in this study we were unable to detect *M. bovis* in clinical specimens routinely processed at HUCFF/IDT, suggesting that zoonotic tuberculosis may be considered a rare event in the metropolitan area of Rio de Janeiro.

1. INTRODUÇÃO

HISTÓRICO

A origem exata da tuberculose é desconhecida. Entretanto é considerada uma das doenças transmissíveis mais antigas da humanidade. O início de seu histórico remete ao surgimento da civilização (HAAS & DES PREZ, 1995).

Estudos realizados em múmias, datados de 4.000 a.c. e originárias de vários locais no Egito, apresentaram evidências de um tipo de lesão típica da tuberculose em seus esqueletos, sendo descrita como Doença de Pott (ROSEMBERG & TARANTINO &, 1997).

A hipótese de que a tuberculose ocorria de forma casual e sem representatividade, foi proposta através de estudos de fósseis, provavelmente pelo fato de não haver formação de comunidades pelos povos da antiguidade (BATES & STEAD, 1993).

A partir do momento em que os indivíduos se fixavam em determinados lugares e formavam povoados, havia uma grande disseminação da doença passando a enfermidade ocorrer com maior frequência.

Conhecida na antiguidade entre os povos do Oriente Médio, a tuberculose permaneceu como uma enfermidade sem grande importância, no continente europeu, durante o período feudal. Entretanto, a pobreza e a formação de pequenas comunidades com grande densidade populacional foram fatores que propiciaram o início de uma epidemia que foi chamada "A Grande Peste Branca" (MURRAY, 1989; BATES & STEAD, 1993; DANIEL, 2000).

Durante os séculos XVI e XVII, segundo Bloom & Murray (1992), 20% das mortes na Inglaterra foram devidos à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

A partir da última metade do século XVIII, houve um aumento progressivo das infecções causadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, tal fato deve-se ao advento da Revolução Industrial que levou a um crescimento desordenado das cidades levando a uma alta densidade populacional, más condições de vida da população como: moradia inadequada, alimentação deficiente, jornadas extensas e outras condições extenuantes de trabalho que mantinham as pessoas em locais fechados por longos períodos, favorecendo a transmissão do microrganismo homem a homem (MURRAY, 1989; BATES & STEAD, 1993)

A tuberculose também alcançou as Américas, possivelmente trazida por vários povos asiáticos que passaram pela Sibéria, atravessaram o estreito de Bering e se estabeleceram no Alasca. E, enquanto algumas comunidades permaneciam na América do Norte, outras se organizaram na América Central, (DANIEL, 2000). Estas hipóteses são apoiadas por evidências lingüísticas, genéticas e arqueológicas, como a descoberta de um único DNA de *M. tuberculosis*, em lesão de pulmão, em uma mulher adulta mumificada há mil anos, no sul do Peru. Fragmentos de DNA persistem na lesão e podem ser usados pela biologia molecular para o diagnóstico da tuberculose (SALO et al., 1994).

Entre a população do continente americano, se existente, a tuberculose era uma enfermidade rara ou desconhecida (BATES & STEAD, 1993).

Com a colonização européia e viagens freqüentes de indivíduos infectados, a epidemia foi vagarosamente disseminada por todo o mundo (MONTENEGRO, 1971).

Antes da descoberta, a população indígena, em nosso país, permanecia intacta à infecção. Após a colonização portuguesa, os nativos sofreram com o impacto da chegada dos europeus. Tudo indica que foram os portugueses que ao aportar no Brasil, trouxeram várias doenças infecto contagiosas, entre elas a tuberculose (AMARANTE & COSTA, 2000).

Entre os séculos XVIII e XIX, ocorreu uma melhoria significativa nas condições sócio econômicas da população européia, como consequência houve a queda na prevalência de doenças como a tuberculose (MURRAY, 1989).

Após grandes conquistas científicas e tecnológicas, como a descoberta do agente etiológico da tuberculose em 1882, por Robert Koch; em 1895 a descoberta do Raio-X por Wilhem C. Roegtgen, houve um grande avanço na área diagnóstica.

Com a descoberta do *Mycobacterium tuberculosis*, em 1882, por Robert Koch, iniciou-se a era microbiana da tuberculose, com o estabelecimento do isolamento de *M. tuberculosis* em cultura. Entretanto, na área terapêutica pouco progresso foi obtido.

Em 1943, surgiu a estreptomicina, primeiro antibiótico efetivo contra o bacilo da TB e com baixa toxicidade. Com a emergência de bacilos resistentes,

tornou-se necessária uma terapia antituberculosa com a droga combinada com o PAS (ácido para-amino salicílico) e a isoniazida

Em 1963, a rifampicina, um antibiótico bactericida para o bacilo da TB, que é rapidamente absorvido, foi introduzido na quimioterapia da TB. O seu uso combinado com a isoniazida e a pirazinamida mostrou-se o esquema mais eficiente para o tratamento da TB.

Com o advento da moderna quimioterapia, a TB teve um grande declínio, principalmente nos países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento onde o declínio foi bem menor, a doença continuava sendo um grave problema de saúde pública (SANT'ANNA, 2002).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB emergência mundial, pois houve inversão na curva de declínio de casos novos nos países desenvolvidos principalmente associados à epidemia da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). A TB continua vitimando todas as camadas sociais, encontra-se essencialmente confinada aos países em desenvolvimento, estimulada pela miséria, infra-estrutura de saúde pública inadequada, pela co-infecção HIV/AIDS e pelo surgimento de cepas com resistência múltipla às drogas atuais. É a maior responsável pela mortalidade nos adultos e configura-se como o maior agente isolado de morte entre as doenças infecciosas (RAVIGLIONE, 2003).

Segundo estimativas da OMS, a terça parte da população mundial está infectada com *M. tuberculosis*. O número de casos anuais chega a 8,7 milhões, sendo que 80% destes concentrados em 22 países, dos quais, dez estão situados na Ásia, dez na África, um na Europa e um na América Latina, o Brasil. A estimativa de mortalidade anual é de 1,8 milhão, 98% delas ocorrem em países em desenvolvimento e cerca de 350.000 casos em associação com a AIDS (WHO, 2006).

AGENTE ETIOLÓGICO

O principal agente infeccioso da TB é *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* pertence, junto com *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* e *M. bovis* BCG, ao complexo *M. tuberculosis*. Outra espécie, *M. canetti*, tem sido proposta como pertencente ao complexo *M. tuberculosis* (VAN SOOLINGEN et al., 1997; ARANAZ et al., 1999; RASTOGI et al., 2001; BROSCH et al., 2002, COUSINS et al., 2003; Brasil, 2008), porém seus status taxonômicos ainda não estão definidos. Incluídos no complexo *M. tuberculosis* estão microrganismos que possuem seqüências 16S rRNA geneticamente idênticas e similaridade genética acima de 99%. Os membros deste podem ser identificados por um restrito número de testes fenotípicos, porém eles diferem em características de virulência, fisiológicas e em relação aos hospedeiros. (VAN SOOLINGEN et al., 1997). Embora, esteja estabelecido que *M. tuberculosis* e *M. africanum* são isolados do homem, *M. bovis* é predominantemente de bovinos, há casos de isolamento de microrganismos do complexo de vários animais domésticos e selvagens. *M. bovis* é o microrganismo com a maior variedade de hospedeiro, incluindo o homem, esporadicamente desde a introdução da pasteurização dos produtos lácteos (O'REILLY & DABORN, 1995). *Mycobacterium caprae* ou *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* tem sido isolado de caprinos e *Mycobacterium pinnipedii* de focas (ARANAZ et al., 2003; COUSINS et al., 2003).

Com as recentes técnicas de sequenciamento e comparação dos genomas, sabe-se hoje que seqüências que foram deletadas (large sequence polymorphisms – LSPs) de *M. tuberculosis* servem como marcadores da evolução biológica (COLE et al., 1998; FLEISCHMANN et al., 2002; GARNIER et al., 2003; HUARD et al., 2003; BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002; TSOLAKI et al., 2004). Assim, as LSPs de *M. tuberculosis* e as específicas para *M. bovis* e cepas relacionadas tem sido usadas para estudar relacionamentos entre as cepas e seus hospedeiros. (HIRSH et al., 2004; MOSTOWY et al., 2004a; MOSTOWY et al., 2004b)

Antes da era das ferramentas moleculares que conhecemos atualmente, a hipótese mais aceita para explicar a origem do *M. tuberculosis* era que este evoluiu do *M. bovis* fazendo sua etapa evolutiva em associação com a domesticação de gado pelos homens, há cerca de 10.000- 15.000 anos (DANIEL,

2000), mas à luz da era pós-genética, em que o genoma micobacteriano foi elucidado, verificou-se que o *M. tuberculosis* tem mais genes que as outras espécies do complexo, pois estas espécies perderam materiais genéticos através de deleção. Estes achados enfraquecem a hipótese da tuberculose ser resultado de uma zoonose (BROSCH *et al.*, 2002; DOMENECH & BARRY, 2001).

Atualmente acredita-se que *M. bovis* é o membro final de uma linhagem de micobactérias (*M. africanum*, *M. microtti* e *M. bovis*) que se dividiu de um ancestral comum dos quais os membros do complexo *M. tuberculosis* se originaram. As cepas de *M. tuberculosis* circulantes atualmente parecem constituir uma linhagem separada que emergiu aproximadamente há 35.000 anos, antes da linhagem de *M. bovis* e assim é mais relacionada ao ancestral comum do complexo *M. tuberculosis* (BROSCH *et al.*, 2002; GARNIER *et al.*, 2003)

Estudando 20 regiões variáveis do genoma de membros do complexo *M. tuberculosis*, que resultaram de eventos de deleção e inserção, Brosch *et al* (2002) construíram um esquema evolucionário do complexo *M. tuberculosis*. A presença ou ausência de uma sequência específica de *M. tuberculosis* (TbD1) permitiu dividir as cepas de *M. tuberculosis* em ancestral e modernas, sendo as cepas Beijing, Haarlem e os clusters africanos de *M. tuberculosis* considerados modernos. A perda da região de diferença (RD) 9 e outras deleções subsequentes foram identificadas na evolução de *M. africanum*, *M. microti* e *M. bovis*.

Mostowy *et al.* (2005) estudaram os marcadores LSPs e construíram um esquema evolucionário do complexo *M. tuberculosis* (figura 1).

Inicialmente *M. caprae* e *M. pinnipedii* foram considerados subespécies de *M. bovis*, no entanto os estudos mais recentes têm sugerido que *M. pinnipedii* é distinto de *M. bovis*. Entre todos os microrganismos do complexo, *M. bovis* é o que apresenta maior espectro de hospedeiros.

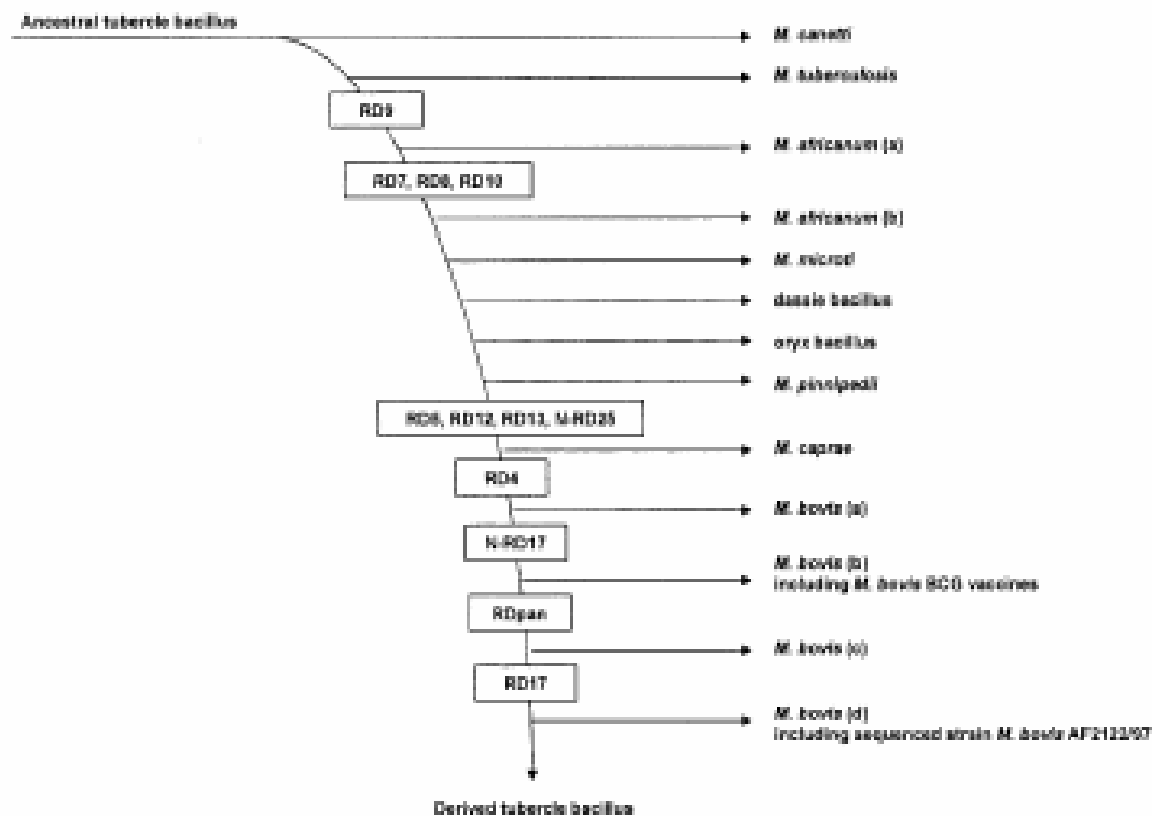


Figura 1 – Filogenia do complexo *M. tuberculosis* baseado em regiões de deleção. O eixo vertical apresenta as deleções. No eixo horizontal estão os grupos de microrganismos que as deleções tem revelado. (MOSTOWY et al, 2005)

TUBERCULOSE BOVINA

M. tuberculosis é o membro do complexo *M. tuberculosis* primariamente responsável por tuberculose humana. *M. bovis* é o agente etiológico causador da tuberculose no gado e em grande número de mamíferos domésticos e selvagens, nos quais causa doença crônica, progressiva e na maioria dos casos respiratória (O'REILLY & DABORN, 1995).

A tuberculose bovina é uma enfermidade de ocorrência mundial que determina prejuízos à pecuária e riscos à saúde da população que consome produtos de origem animal. A forma mais freqüente da doença no gado bovino é a pulmonar, que caracteriza-se por evolução lenta, febre intermitente, tosse, baixa do peso e astenia. Pode ainda ocorrer a forma intestinal, com diarréia crônica que leva o animal à caquexia, em cerca de 10-20% dos casos, e uma forma ganglionar difusa.

Embora, possam haver fontes de infecção entre os animais silvestres é consenso entre os pesquisadores que a tuberculose é uma doença rara nestas espécies, o que limita bastante a possibilidade de transmissão para os bovinos. Assim, considera-se que o gado tuberculoso constitui a principal fonte e agente mantenedor da infecção no rebanho. A principal forma de transmissão é por via respiratória e, entre as fontes não-respiratórias, a mais comum ocorre em bezerros que se infectam ao mamarem leite infectado. Outras vias, como a cutânea ou a genital, são de ocorrência bastante rara, (NEILL et al., 1994).

Enquanto *M. tuberculosis* é essencialmente um patógeno humano, *M. bovis* possui um vasto número de hospedeiros, que inclui o homem. O termo “TB zoonótica” é usualmente utilizado para a tuberculose humana causada por *M. bovis*.

No continente africano, somente sete dos 54 países possuem política de controle da tuberculose bovina, utilizando o método de teste-e-abate do gado infectado, nos restantes o controle não existe ou é inadequado. Na Ásia, em 29 países não há controle da doença bovina ou o controle é inadequado, sendo que sete países aplicam as medidas de teste-e-abate dos animais infectados. Assim aproximadamente 82% da população da África e 94% da população da Ásia vivem em regiões onde não há controle da tuberculose bovina ou o controle é inadequado (COSIVI et al., 1998). Na região da América Latina, as medidas de controle com teste-e-abate dos animais infectados estão implantadas em 12 países, que consideram a TB bovina uma doença de notificação obrigatória. Nos 22 países restantes a doença é parcialmente controlada. Estima-se que 60% da população humana na América Latina vivem em regiões sem controle ou controle limitado da TB bovina.

No Brasil, a doença é endêmica, e afeta cerca de 20% das propriedades de rebanho leiteiro de elite. Sendo a transmissão normalmente respiratória, o confinamento predispõe à doença, que, assim, atinge mais o gado de leite, estabulado, do que o gado de corte, usualmente criado em sistema extensivo.

No Rio de Janeiro, Lilenbaum *et al.* (1998) testaram 1632 bovinos de aptidão leiteira em propriedades com histórico sugestivo da ocorrência de tuberculose e verificaram 12,7% de reatividade ao teste intradérmico cervical simples, alertando para a alta ocorrência da enfermidade neste estado.

A tuberculose bovina em animais naturalmente infectados apresenta-se como uma doença predominantemente do trato respiratório, portanto não é surpreendente que o bacilo seja excretado na forma de aerossóis, representando a mais reconhecida forma de infecção do gado (PRITCHARD, 1988; NEILL et al., 1994). Vários autores têm revisado os mecanismos da transmissão de *M. bovis* de animais infectados para o homem, transmissão natural de *M. bovis* pode ocorrer entre animais domésticos e selvagens, mesmo de diferentes espécies, de animais para homem e mais raramente de homem para animais ou entre humanos (PRITCHARD, 1988; GRANGE & YATES, 1994; O'REILLY & DABRON, 1995; ASHFORD et al., 2001). Na realidade, todos os mamíferos terrestres são susceptíveis ao *M. bovis* e o grau de susceptibilidade depende do nível de exposição, da resistência inata, do tipo de biotério e ecologia. O gado bovino sendo mais abundante e totalmente susceptível a infecção é rotineiramente examinado e freqüentemente atua como animal sentinela. Entre os animais domésticos, caprinos podem atuar como hospedeiro de manutenção de *M. bovis*, entre os mamíferos de vida livre, gambá, furão, antílope e veados podem também ser considerados animais de manutenção de *M. bovis* (RUA-DOMENECH, 2006).

Transmissão de *M. bovis* de animais, outros que gado bovino, para o homem ocorre esporadicamente, com potencial risco para fazendeiros, veterinários, trabalhadores de abatedouros, inspetores sanitários e tratadores de animais.

Em várias espécies animais que não o gado bovino, a infecção por *M. bovis* é auto-limitada como equinos e ovinos, que não transmitiriam a doença. Por outro lado, suínos, caprinos, caninos e alpacas são considerados hospedeiros com potencial poder de amplificação de *M. bovis*. Em 2004, na Inglaterra, infecção por *M. bovis* foi confirmada em 6 dos 38 casos de felinos suspeitos de tuberculose e em um dos três casos de caninos investigados. (RUA-DOMENECH, 2006).

TUBERCULOSE ZOONÓTICA

A infecção humana pelo *M. bovis* foi primeiramente descrita no início do século XX, onde estimou-se que foi causa de 10-18% de todos os casos de tuberculose, existindo uma associação entre o número de casos humanos identificados e a prevalência da tuberculose na população bovina local. Calcula-se

que 70 a 80% dos casos de tuberculose dos gânglios cervicais em crianças e 20% dos casos de tuberculose renal do homem foram causados pelo *M. bovis* (SAURET et al., 1992; ABRAHÃO, 1998)

A porta de entrada de *M.bovis* no hospedeiro humano é variada, por aerossóis, ingestão ou contato direto com mucosas e ferimentos na pele. A prevalência da via de transmissão depende da eficácia do programa de controle de TB no gado, alimentos e da população estudada. Em países onde a pasteurização do leite é largamente utilizada e obrigatória, a tuberculose bovina não constitui risco para a população em geral. No entanto, entre trabalhadores de abatedouros e fazendeiros e peões há risco de infecção por contato com animais contaminados ou suas carcaças ou através de consumo de leite e derivados sem pasteurização.

Historicamente, leite in natura tem sido o principal veículo de infecção para o homem antes da descoberta da pasteurização. *M. bovis* é um dos mais resistentes patógenos encontrado no leite, porém a pasteurização (63,5º/30 minutos ou 72º/15 segundos) o inativa completamente (GRANT et al., 1996). Embora *M. bovis* não se multiplique no leite, o grande número de bacilos excretados por uma única vaca com mastite por TB é suficiente para contaminar o leite de 100 vacas, quando armazenados em mesmo recipiente (PRITCHARD, 1988). O leite pode também ser contaminado por *M. bovis* exógeno, por bacilos de equipamentos da indústria leiteira. *M. bovis* sobrevive bem no leite e pode ser isolado a partir de queijos, iogurtes e manteigas vários dias após a preparação (RUA-DOMENECH, 2006). Em países onde a prevalência da tuberculose bovina é elevada ou onde os programas de controle e erradicação não existem ou estão em fase de implantação como no caso do Brasil, o leite e seus derivados não pasteurizados são considerados uma das principais fontes de transmissão da doença (ASHFORD et al., 2001). Quando a contaminação se dá por ingestão, pode ocorrer uma infecção inicial das amígdalas, prosseguindo então para as cadeias de linfonodos cervicais. A lesão inicial não passa de uma amigdalite, entretanto lesões supurativas podem ocorrer nas cadeias cervicais, afetando linfonodos pré-auriculares, tonsilares e supraclaviculares, com posterior envolvimento da pele sobrejacente. Tais lesões são comumente conhecidas como "scrofulodermia" ou "lupus vulgaris" (FELDMAN, 1955). A tuberculose na forma intestinal pode ser consequência da ingestão do bacilo ou secundária a outro foco

do hospedeiro. A sintomatologia é bastante variada e inespecífica, a dor abdominal é o sintoma mais comum, associado á distensão abdominal, outros sintomas como febre, anemia e emagrecimento são bastante freqüentes O íleo terminal e o ceco são as porções do intestino mais comumente envolvidas. A baciloscopia e a cultura apresentam baixa sensibilidade, sendo o diagnóstico comumente realizado por biopsia intestinal (RAVIGLIONE & O'BRIEN, 2005). A localização óssea e articular também é comum nos casos extra-pulmonares, provocando lesões ósseas localizadas e artrite. Em crianças, é comum encontrar-se acometimento intestinal (GRANGE & YATES, 1994). A via de infecção alimentar geralmente ocasiona a tuberculose do tipo extra-pulmonar. Segundo Sinha (1994) somente 4% dos animais diagnosticados como positivos no teste de tuberculinização, apresentam *M. bovis* no leite em quantidade capaz de ser mensurada por cultura, uma vez que a percentagem real de eliminação do bacilo no leite por animais positivos na tuberculinização é de 31,3%.

Portanto, o consumo de leite cru e derivados não pasteurizados constituem um risco à saúde pública, não somente em relação ao *M. bovis*, mas também para muitas outras infecções zoonóticas (KAVANAGH, 2002).

A transmissão respiratória de *M. bovis*, em geral, constitui infecção ocupacional ocorrendo entre veterinários, inspetores de vigilância sanitária, trabalhadores de fazenda, abatedouros e de zoológicos, entre caçadores e pessoal técnico de laboratório. Relatos recentes de TB ocupacional descritos na literatura estão apresentados na tabela 1.

A via de infecção respiratória, através da inalação de aerossóis de animais doentes causa a tuberculose pulmonar típica (NEILL et al., 1994), sendo a tuberculose pulmonar causada por *M. bovis* em humanos é indistinguível clinicamente, radiologicamente e patologicamente da tuberculose causada pelo *M. tuberculosis* (GRANGE, 2001; WEDLOCK et al., 2002).

Tabela 1 – Relatos de TB ocupacional devido à exposição a aerossóis contendo *M. bovis* de gado bovino ou outros animais infectados^a

Descrição	País
Cinco trabalhadores de abatedouro	Austrália
Surto em abatedouro	Austrália
Cento e cinquenta casos entre trabalhadores da indústria de carnes, fazendeiros e pessoal de laboratório	Austrália
Surto de viragem tuberculínica entre expostos a veados contaminados	Canadá
Alta prevalência de reatores ao PPD entre trabalhadores de abatedouro	Canadá
Surto em trabalhadores de zoológico contato rinoceronte com TB	Estados Unidos
TB Zoonótica em hospital, 2 pacientes eram veterinários	Espanha
Três pacientes com TB zoonótica, fonte de infecção caprino	Espanha
Alta prevalência de reatores ao PPD e TB zoonótica entre veterinários	Itália
Infecção em trabalhador de açougue e seu irmão gêmeo	Inglaterra

^aAdaptado de Rua-Domenech, 2006

A maioria das informações sobre a epidemiologia de TB zoonótica tem sido obtida de países desenvolvidos. O uso da microscopia do escarro como único método de diagnóstico de TB humana explica a relativa baixa notificação da doença humana causada por *M. bovis*. Estima-se que uma pequena proporção das infecções em humanos em países desenvolvidos (0,5-7,2%) seja causada por *M. bovis* (RUA-DOMENECH, 2006).

Tabela 2 - Casos de tuberculose humana por *M. bovis*, descrito na literatura, distribuído por regiões, adaptado de Thoen et al. (2006)

Regiões	1966-1975	1976-1985	1986-1995	1995-2005
Europa Ocidental	37	10	31	36
Europa Oriental	13	9	4	0
USA e Canada	7	7	16	10
América Latina (1)	3	1	5	3
Australia e Nova Zelandia	0	1	6	2
África	5	1	2	11
Índia, Israel, Taiwan e Turquia	0	0	3	3
WHO/OIE/FAO/IUATLD	2	0	3	3
Total	67	29	70	68

(1) Argentina, Brasil e México

Nos países em desenvolvimento a infecção por *M. bovis* deve ainda constituir um problema de saúde pública. Alguns autores especulam que 10 a 15% dos casos de tuberculose que ocorrem nestes países sejam devido a *M. bovis* (COSIVI et al., 1998; ASHFORD et al., 2001).

No Brasil, a real situação da tuberculose humana causada pelo *M. bovis* não é conhecida, pois não existem dados que forneçam objetivamente a frequência do *M. bovis* em tuberculose humana. Há, entretanto, referência de 1 caso na cidade do Rio de Janeiro em 1938, cujo paciente apresentava alterações intestinais intensas. No Rio Grande do Sul, em 1940, foram identificados 4 casos; em São Paulo, em 1941, foram isoladas 16 cepas de *M. bovis* (13,2%) em 121 pacientes com meningite tuberculosa; e em Minas Gerais, em 1955, de um total de 52 doentes, foram isoladas 2 cepas de *M. bovis* (3,8%) (FELDMAN, 1955; ABRAHÃO, 1998). Outro caso de tuberculose por *M. bovis*, descrito por Andrade et al. (1972), ocorreu na cidade do Rio de Janeiro em 1968, em um homem de 39 anos de idade, que havia trabalhado como lavrador até os 18 anos, e que apresentava tuberculose pulmonar. Em São Paulo, no período de setembro de 1970 a outubro de 1973, entre 200 cepas de micobactérias isoladas de diferentes casos de humanos, com diagnóstico clínico de tuberculose, foram encontradas 7

cepas de *M. bovis* (3,5%). A tuberculose pulmonar foi responsável por 5 casos (2,5%) e a tuberculose renal por 2 (1,0%) (CORRÊA E CORRÊA, 1974).

M. bovis é sabidamente resistente a pirazinamida e sensível às demais drogas utilizadas no tratamento da tuberculose. Parreiras et al (2004) determinaram o perfil de sensibilidade de 65 cepas isoladas de gado bovino com sinais de tuberculose e não encontraram resistência a nenhuma das cinco drogas testadas – estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etionamida e etambutol.

No entanto, Palenque et al. (1998) relataram um surto de tuberculose multi-resistente por *M. bovis* na Espanha, entre pacientes HIV positivos, um parente canadense HIV soronegativo ao visitar um dos doentes HIV soropositivo foi infectado, com exteriorização da doença ao retornar ao Canadá. A cepa apresentou resistência a todas as drogas de primeira e segunda linha, com exceção de cicloserina e clofazimina. A transmissão para o contato canadense e o surto na Espanha foram causados pela mesma cepa, fato confirmado por tipagem molecular (LONG et al., 1999). Especula-se que várias mutações sucessivas decorrentes da pressão seletiva do uso de inúmeros e diferentes antibióticos pelo paciente HIV positivo tenha levado à multi-resistência.

DIAGNÓSTICO

Tuberculose é a doença causada por bactérias do complexo *M. tuberculosis*. Apesar de diferenças morfológica, bioquímica entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*, os dois microrganismos são intimamente relacionados e produzem doenças em humanos clínica, radiológica e patologicamente indistinguíveis. Adicionalmente, o tratamento da maioria dos pacientes não depende da precisa identificação dos dois microrganismos e o diagnóstico por microscopia do escarro não os distingue (KOVALYOV, 1989; RUA-DOMENECH, 2006), no entanto, não pode deixar de ser mencionado que a grande maioria das cepas de *M. bovis* apresenta resistência intrínseca à pirazinamida, um dos medicamentos de primeira linha no tratamento da doença.

Para a correta identificação de *M. bovis* é essencial que o microrganismo seja isolado em cultura e submetido a testes bioquímicos e moleculares. As características fenotípicas diferenciais de *M. tuberculosis* e *M. bovis* estão

descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Características fenotípicas utilizadas para discriminação entre cepas de *M. tuberculosis* e *M. bovis* ^a

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>
Morfologia colonial	Rugosa (eugônica)	Lisa (disgônica)
Exigência de O ₂	Aeróbio	Microaerófilo
Favorecimento do crescimento por glicerol	Sim	Não
Favorecimento do crescimento por piruvato	Não	Sim
Redução do nitrato	Positivo	Negativo
Produção de niacina	Sim	Não
Nicotinamidase	Positiva	Negativa
Resistência a PZA	Não	Sim

^a Adaptado de Rastogi et al., 2001, Pritchard et al, 1988, Aranaz et al 2003

M. tuberculosis e *M. bovis* possuem 99,9% de similaridade de DNA e seqüências idênticas do 16S rRNA (BROSCH et al., 2002; GARNIER et al, 2003). Entre os marcadores moleculares mais utilizados para diferenciar os membros do complexo *M. tuberculosis* encontramos a seqüência de inserção *IS6110*, a região DR, a seqüência rica em poliGC PGRS e seqüência variável repetida VNTR. A técnica de spoligotyping usa a seqüência espaçadora variável encontrada na região DR como marcador molecular, e é atualmente a principal técnica de tipagem de *M. bovis* (KAMERBEECK et al., 1997; HADDAD et al., 2004)

De acordo com a WHO (1993), a infecção por *M. bovis* é responsável por 5% dos casos de tuberculose humana em países em desenvolvimento. Dados sobre *M. bovis* em humanos na América Latina e Caribe hoje são muito escassos. Este fato ocorre principalmente devido ao método de eleição para diagnóstico da tuberculose representado pela baciloscopia do escarro, carecendo do isolamento e identificação do agente na maioria dos laboratórios da rede de saúde. Por ser o quadro patológico e o tratamento convencional praticamente o mesmo na tuberculose causada tanto por *M. tuberculosis* como por *M. bovis*, pouca importância se dá à identificação do agente para fins epidemiológicos.

Na Argentina, que dispõe de uma alta taxa de diagnóstico bacteriológico

para a tuberculose humana com isolamento e identificação do agente, a doença por *M. bovis* assume um caráter basicamente profissional, com transmissão principal por aerossóis. No período de 1984 a 1989, entre 2,4% a 6,2% dos casos humanos eram causados pelo bacilo bovino, sendo que 64% deles eram casos de doença ocupacional (KANTOR & RITACCO, 1994)

2. JUSTIFICATIVA

A tuberculose bovina é ainda uma doença comum no Brasil, o último inquérito tuberculínico mostrou prevalência que variou de 0,37% na região sudeste a 3,62% na região norte (ROXO, 2005). Apesar da ocorrência de TB bovina no país, não existem dados sobre a tuberculose humana causada por *M. bovis*, tuberculose zoonótica, apenas uns poucos casos recolhidos por informação pessoal. A falta de notificação de casos humanos de TB por *M. bovis*, deve-se, provavelmente, a pouca utilização de meios de cultura contendo piruvato. Além do natural interesse epidemiológico sobre a prevalência de TB zoonótica no país, *M. bovis* é naturalmente resistente a PZA, um dos três fármacos utilizados no esquema 1 de tratamento da doença, o que faz com que o isolamento e identificação de *M. bovis* em espécimes clínicos humanos tenha um objetivo prático de orientar o tratamento.

O Laboratório de Micobacteriologia do complexo hospitalar HUCFF/IDT-UFRJ possui infra-estrutura e pessoal especializado para isolamento, identificação e testes de susceptibilidade para *M. tuberculosis*, o laboratório recebe anualmente cerca de 5.500 espécimes clínicos para pesquisa de micobactérias, estes espécimes são oriundos de pacientes de toda a região metropolitana, sendo um dos locais estratégicos para pesquisa da ocorrência de *M. bovis* em espécimes humanos.

Devido à escassez de dados sobre a prevalência de tuberculose zoonótica no país, resolvemos pesquisar a prevalência de *M. bovis* entre as cepas de micobactérias isoladas no complexo hospitalar HUCFF/IDT-UFRJ, acrescentado na rotina, por um período de dois anos, meio de cultura para isolamento contendo piruvato.

3. OBJETIVO:

No período de dois anos pesquisar a ocorrência de *M. bovis* em todos os espécimes clínicos enviados ao Laboratório de Micobacteriologia do IDT/HUCFF-UFRJ para pesquisa de micobactérias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Comparar o rendimento entre os meios de Lowenstein-Jensen com piruvato e Lowenstein-Jensen com glicerol para o isolamento de *M. bovis*.
- Analisar a associação de formas extra-pulmonares da tuberculose com o crescimento de micobactérias no meio de Lowenstein-Jensen com piruvato.
- Verificar a performance do teste de susceptibilidade a pirazinamida na identificação de *M. bovis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Tipo de Estudo

Estudo retrospectivo de identificação genotípica e fenotípica nas cepas micobacterianas isoladas no período de 2005-2006.

4.2 - Período de estudo

Todos os espécimes clínicos foram provenientes da rotina do Laboratório de Micobacteriologia IDT/HUCFF-UFRJ, durante o período de dois anos. O laboratório possui uma rotina com a demanda de 5500 espécimes clínicos ao ano, dos quais 65% são amostras respiratórias.

O IDT/HUCFF é um hospital terciário, referência para tratamento de pacientes com múltiplas co-morbidades e com doença que exigem tratamento complexo, como transplantes, doenças auto-imunes, neoplasias e “diabetes mellitus” grave. Além disso, o hospital é referência para o tratamento de pacientes com HIV/AIDS.

4.3 - Critérios de inclusão

Todos os espécimes clínicos de paciente com suspeita de tuberculose que foram encaminhados ao laboratório de Micobacteriologia do HUCFF/IDT-UFRJ, e cumpriram os procedimentos corretos de coleta e transporte, sem seleção de paciente.

4.4 – Critérios de exclusão

Foram excluídos os espécimes colhidos e transportados de maneira incorreta, por não cumprirem os procedimentos estabelecidos.

4.5 - Técnicas laboratoriais:

4.5.1 – Baciloscopia

A baciloscopia é o exame básico para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose, especialmente na forma pulmonar. Permite ampla cobertura diagnóstica, identifica os casos bacilíferos e possibilita o acompanhamento da eficácia do tratamento.

Foi realizado um esfregaço a partir dos espécimes e as lâminas foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen de acordo com o Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 1994). Com a técnica de Ziehl-Neelsen, as micobactérias apresentam-se como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, isolados, aos pares ou em grupos, corados em vermelho com fundo azul e, portanto, referidos como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

4. 5.3 - Cultura para Micobactérias: isolamento primário de micobactérias.

Os espécimes foram submetidos ao processo de digestão e descontaminação pelo método de Kubica (KENT & KUBICA 1985). No método de Kubica o agente mucolítico N-acetil-L-Cisteína (NALC) foi usado para fluidificar o escarro e o NaOH a 2% para descontaminação. O citrato de sódio foi incluído na solução devido a sua habilidade em se ligar a metais pesados possivelmente presentes na amostra clínica e que poderiam inativar a acetil-cisteína.

Do sedimento homogeneizado, 0,2 mL foi semeado no meio de Lowenstein-Jensen e incubados a 37°C. Cada amostra foi semeada em dois tubos de Lowenstein-Jensen contendo glicerol e um tubo de Lowenstein-Jensen contendo piruvato. O crescimento foi analisado após a semeadura, a cada três dias, até 60 dias, de acordo com o Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 1994)

4.5.4 - Bioquímica básica para identificação do complexo *M. tuberculosis*

A identificação das cepas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* foi feita a partir de cepas álcool-ácido resistentes isoladas no meio de cultura Lowenstein-Jensen. Foram realizadas provas bioquímicas de produção da niacina, redução do nitrato, catalase semiquantitativa e termoinativação da catalase a 68°C de acordo com o Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 1994) e Kent & Kubica (1985).

4.5.4.1 - Redução do Nitrato

O teste do nitrato para identificação de micobactérias é usado para separar

M. tuberculosis das outras espécies do “Complexo *M. tuberculosis*”.

Controle da Qualidade

Positivo: *M. tuberculosis*

Negativo: *M. bovis* (BCG) ou tubo não inoculado

Procedimento

Foram adicionados 2,5 mL de solução tampão de fosfato-nitrato de sódio a 0,1% pH 7.0 ao tubo de cultura com crescimento micobacteriano e a seguir realizados vários cortes paralelos no meio de cultura a fim de liberar a niacina acumulado no meio e o tubo foi incubado por 2 horas em estufa a 37°C. Após a incubação, um e meio mililitros foram retirados para os testes de niacina e catalase. Ao tubo com 1 mL restante de tampão foram adicionadas 2 gotas da solução de HCL a 1:2, 4 gotas da solução de sulfanilamina a 0,2%, 4 gotas da solução de á naftilamina a 0,1%. Foi observado imediatamente a formação de cor rosa ao vermelho.

Leitura e interpretação

Positiva: Pode variar do rosa pálido (3+) ao vermelho intenso (5+) comparando com a cor dos tubos padrões.

Negativa: Nenhuma cor. Se não houve aparecimento de cor, o teste foi negativo ou a redução se processou além do nitrito formando N₂.

4.5.4.2 - Teste da niacina

A niacina desempenha um papel vital nas reações de oxidação-redução que ocorrem durante as sínteses metabólicas em todas as micobactérias. A niacina é geralmente detectada pela reação com um halogeneto de cianogênio (brometo de cianogênio) na presença de uma amina primária (anilina ou benzidina).

Controle da Qualidade

Positivo: *M. tuberculosis*

Negativo: “Complexo *M. avium-intracellulare*”

Procedimento

Do tubo incubado com tampão do teste de redução de nitrato, foi retirado 0,5 mL colocado em tubos de rosca 13 x100 mm e adicionado 0,5 mL de solução de anilina a 4% ou 0,5 mL de benzidina a 3%. Após a adição desta solução, o líquido deve permanecer incolor. Foi adicionado 0,5 mL da solução de brometo de cianogênio à 10%. E observado a formação imediata de cor amarela se foi utilizada a anilina, ou cor rosa forte no caso da benzidina.

Leitura e interpretação

Positiva: Desenvolvimento imediato (1 a 2 minutos) de cor amarela (anilina) ou rosa forte (benzidina).

Negativa: Não há mudança de cor.

4.5.4.3 - Teste da catalase a 68° C para a identificação de micobactérias

A catalase é uma enzima que decompõe a água oxigenada, liberando o O₂. A presença de catalase em uma amostra traduz-se para um desprendimento gasoso logo que esta amostra entra em contato com a água oxigenada.

Controle de Qualidade:

Negativo: *M. tuberculosis*

Positivo: *M. terrae*

Procedimento:

Foi colocado 0,5 mL do tampão incubado com a cultura do teste de nitrato em dois tubos. Após um dos tubos foi colocado em banho-maria a 68°C por 20 minutos, retirado e deixado esfriar. A seguir, foi adicionado 0,5 mL da solução reveladora nos dois tubos e observado a formação de bolhas em até até 20 minutos.

Leitura e interpretação:

Positiva: Formação de bolhas no tubo.

Negativa: Não há formação de bolhas no tubo.

Não agitar os tubos para fazer leitura, pois o Tween forma bolhas.

4.5.5 – Teste Bioquímico Adicional para Identificação de *M. bovis* - Teste de sensibilidade ao PZA – Método das Proporções

Esta metodologia foi descrita por Canetti, Rist & Grosset em 1963 e consiste em detectar a proporção de bacilos resistentes presentes em uma amostra de *M. tuberculosis*, frente a uma concentração da droga que é capaz de inibir o desenvolvimento das células sensíveis, mas não o das células resistentes, “concentração crítica”. Para cada droga foi definida uma proporção de mutantes resistentes em uma população bacilar, igual ou acima da qual a amostra é considerada resistente, “proporção crítica”.

Foi utilizado o meio de Lowenstein-Jensen com a droga incorporada ao mesmo antes da coagulação. A pirazinamida foi testada em meio previamente acidificado entre pH 5,0 e 5,2 utilizando-se HCl 2 N, na concentração de 100 µg/mL.

Técnica:

O teste de sensibilidade foi realizado a partir da cultura (teste indireto).

Preparação da suspensão bacilar, diluição e semeadura: A partir do crescimento em meio de LJ, isento de droga, foi feita uma suspensão, utilizando o maior número de colônias possível, em um tubo 16 x 150 mm contendo cerca de 10 pérolas de vidro e aproximadamente 0,5 mL de água destilada estéril. O tubo foi agitado em vórtex por 20 a 30 segundos para homogeneizar a suspensão, foi adicionado 0,5 mL de água destilada estéril, o tubo foi novamente agitado e após mantido em repouso por 5 minutos. A suspensão foi gotejada lentamente a em um tubo contendo 3 mL de água destilada estéril até obter a turvação correspondente ao tubo nº 1 da escala de Mac Farland. A partir desta suspensão padronizada, foram efetuadas diluições decimais até 10^{-6} e semeados 0,1 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-6} , nos tubos controle (sem droga) e nos tubos com a droga. No presente estudo, foram semeados as diluições 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} .

Após a semeadura, os tubos foram colocados inclinados horizontalmente em uma bandeja de forma que o inóculo se distribua sobre toda a superfície do meio, mantendo-os com a tampa frouxa por 24 - 48 horas para secar o inóculo. Após este período os tubos foram incubados na posição vertical em estufa a 37°C por 28 dias.

Leitura e Interpretação:

Após a leitura do teste, o cálculo da porcentagem de bacilos resistentes foi realizado da seguinte maneira:

Número de colônias no tubo com drogas x 100 = % de bacilos

Número de colônias no tubo controle

Quando esta porcentagem for superior ou igual à proporção crítica de 1% estabelecida para a droga, a amostra é considerada resistente.

Controle de Qualidade:

Cada partida de meio com droga preparada foi sempre ser avaliada semeando-se *M. tuberculosis* (H37Rv) e fazendo o mesmo procedimento do teste.

4.5.6 – Testes Bioquímicos Adicionais para Identificação de Micobactérias não Pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*

As cepas de micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* foram inicialmente classificadas de acordo com a classificação de Runyon, através de provas de velocidade de crescimento e produção de pigmento (BRASIL, 1994).

As que apresentaram crescimento até sete dias foram consideradas de crescimento rápido, e as que apresentaram crescimento acima de sete dias foram consideradas de crescimento lento.

As micobactérias conceituadas de crescimento lento foram divididas em fotocromogênicas (com produção de pigmento induzida pela luz), escotocromogênicas (com produção de pigmento constitucional) e não cromogênicas (não produzem pigmento).

4.5.6.1 - Atividade Arilsulfática em 3 dias.

Foi preparado um inóculo padronizado de acordo com a escala nº1 de McFarland e semeado 0,1 mL nos tubos contendo 2,0 mL de caldo Dubos, à 37° C por 3 dias. Nos respectivos dias foi adicionado 1,0 mL de carbonato de sódio 1M.

A leitura foi realizada após a adição do carbonato de sódio, considerando-se positivo a formação de um anel rósea entre o meio e o reagente. Foi utilizado

controle negativo (tubo inoculado com *Mycobacterium fortuitum*) e controle positivo (tubo inoculado com *Mycobacterium smegmatis* ATCC 19420).

Caldo Dubos:

- ✓ Dissulfato de fenolftaleína tripotássio – 0,065g
- ✓ Glicerol – 1,0 mL
- ✓ Água destilada q.s.p. – 100 mL.
- ✓ Dubos oleic Agar base – 2g

4.5.6.2 - Hidrólise do Tween 80

A partir de um cultivo em meio L-J, uma alça cheia de crescimento foi emulsionada em um tubo contendo 2,0 mL da solução substrato e incubou-se em estufa a 37° C até 10 dias.

A leitura foi realizada no 5º e 10º dia, e considerada positiva a mudança de cor âmbar para rosa ou vermelho até o 5º dia. Foram utilizados controle positivo (tubo inoculado com *Mycobacterium aurum*) e controle negativo (tubo inoculado com *Mycobacterium avium* ATCC 13950).

Solução Substrato:

- ✓ Tampão fosfato, pH 7,0 – 100mL;
- ✓ Tween 80 – 0,5 mL;

4.5.6.3 - Urease

A partir de um cultivo recente em meio L-J, uma alça cheia de crescimento foi emulsionada num tubo contendo 1,0 mL de caldo de uréia (Difco) e incubou-se em estufa a 37° C por 18 horas.

A leitura foi realizada com 2, 18, 42 48 e 72 horas e considerado positivo a mudança de cor do caldo de amarelo para rosa escuro ou vermelho. Foram utilizados controle positivo (tubo inoculado com *Mycobacterium aurum*) e controle negativo (tubo inoculado com *Mycobacterium terrae* ATCC 15755).

4.5.6.4 - Redução do telurito de potássio:

A partir de um cultivo recente de meio de L-J, foi emulsionada uma alça cheia num tubo contendo 2,5 mL de caldo Middlebrook 7H9 com Tween 80 a 0,05% e aditivo ADC; o tubo foi incubado em estufa a 37°C por 7 dias. Posteriormente foi adicionada 0,1 mL de solução de telurito de potássio a 0,2%, assepticamente. Os tubos foram agitados e reincubados em estufa a 37°C por 3

dias.

Foram considerados positivos os tubos onde houve a formação de um precipitado preto de telurito metálico no fundo do tubo. Foram utilizados controle positivo (tubo inoculado com *Mycobacterium avium*) e controle negativo (tubo inoculado com *Mycobacterium terrae*).

4.5.6.5 - Captação do Ferro

A partir de um cultivo recente em L-J, obteve-se uma suspensão de acordo com a escala nº 1 de McFarland. Diluiu-se até 10⁻² e semeou-se 0,1 mL, em um tubo de L-J contendo Citrato de Ferro Amoniacal a 2,5%. E incubou-se em estufa a 37°C com tampa afrouxada por 4 semanas.

Foi considerado positivo (tubo inoculado com *Mycobacterium fortuitum*) quando as colônias ficaram com coloração amarronzada; e negativo (tubo inoculado com *Mycobacterium chelonae* NCTC 946) quando não houve crescimento ou houve crescimento de colônias sem coloração amarronzada.

4.5.7. – Testes genotípicos

4.5.7.1 – Extração do DNA

A extração foi realizada segundo o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias (BRASIL, 2008), descrita a seguir. Foi retirada uma alça cheia do crescimento bacteriano em meio de L-J e colocado em um microtubo contendo 500 µL de água destilada e esterilizada. O tubo foi aquecido por 20 minutos a 100°C e congelado a -20°C. No momento do uso foi descongelado e centrifugado brevemente.

4.5.7.2. Amplificação e Leitura

A amplificação e leitura foram realizadas segundo Huard et al., (2003) com modificações descritas a seguir. Foram preparadas duas misturas de reagentes para reação de PCR de volume final igual a 25 µL, uma contendo: 1,25 µL de DMSO (dimetil sufóxido), 2,5 µL de tampão 10X, 0,75 µL de MgCl₂ a 50mM, 0,5 de DNTP a 10 mM (A,T,C,G), 0,5 µL do primer Rv1510, 13,8 µL de água purificada e 0,2 µL de Taq polymerase Platinum e 5 µL do DNA bacteriano. Outra

mistura foi preparada contendo os mesmo reagentes porém utilizando 0,5 µL do primer Rv0577.

Vinte microlitros de cada mistura foram distribuídos em microtubos diferentes e adicionado 5 µl do DNA bacteriano. Os tubos foram colocados em um termociclador e a amplificação foi feita em com um programa de 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 60°C, e 1 minuto a 72° C com uma extensão final de 10 minutos a 72° C. Os produtos do PCR foram visualizados em um gel de agarose a 1% colorido com uma solução de brometo de etídio a 0,5%. O gel foi observado sob luz UV e fotografado.

Tabela 4a - Iniciadores utilizados no presente estudo

Primer	Seqüência nucleotídica	Tamanho (pb)
Rv0577F	5' ATG CCC AAG AGA ACG GAA TAC AGG CAA 3'	786
Rv0577R	5' CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA 3'	
Rv1510F	5' GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC 3'	1.033
Rv1510R	5' TGT CGA CCT GGG GCA ATC AGT C 3'	

4. 6. Análise Estatística

O resultados dos isolamentos de micobactérias tuberculosas e não tuberculosas foram analisados pelos testes de Fisher e Yates, Epi Info 5.00.

5. RESULTADOS

Em 2005, o Laboratório de Micobacteriologia recebeu 5.346 espécimes clínicos para isolamento de micobactérias, sendo que 1268 (23,7%) apresentaram crescimento de micobacterias. Dos 5.376 espécimes, 3.337 foram semeados em tubos com meio de Loewenstein-Jensen contendo piruvato de sódio ou glicerol como fonte de carbono, dos quais 787 espécimes apresentaram crescimento para micobactérias ora meio com glicerol ou com piruvato ou em ambos. A positividade em glicerol ou piruvato ou em ambos de acordo com os espécimes clínicos está representada nas tabelas 4b e 5.

Tabela 4b – Positividade de 664 espécimes respiratórios, enviados em 2005 para isolamento de micobactérias, em meio contendo glicerol ou piruvato como fonte de carbono.

Crescimento em Piruvato	Crescimento em Glicerol							
	Escarro		EI		LBA		Outros	
	P	N	P	N	P	N	P	N
Positivo	379	6	174	7	30	1	9	0
Negativo	31	-	23	-	2	-	2	-

EI – escarro induzido, LBA – lavado bronquio-alveolar, P – positivo, N- Negativo

Tabela 5 - Positividade de 123 espécimes extra-respiratórios, enviados em 2005 para isolamento de micobactérias, em meio contendo glicerol ou piruvato como fonte de carbono.

Crescimento em Piruvato	Crescimento em Glicerol							
	Ganglionar		Pleural		Sangue e AMO		Outros	
	P	N	P	N	P	N	P	N
Positivo	13	0	14	2	45	0	31	0
Negativo	0	-	5	-	3	-	10	-

AMO – aspirado de medula óssea, P – positivo, N- Negativo

Analisando os resultados das tabelas 4 e 5, verifica-se que 592 (89%) dos espécimes respiratórios apresentaram crescimento de micobactérias em ambos

os meios, 58 (9%) apenas em meio com glicerol e 14 (2%) apenas em meio com piruvato de sódio. Em relação aos espécimes extra-pulmonares 103 (83,8%) apresentaram crescimento de micobactérias nos dois meios, 18 (14,6%) apenas no meio com piruvato e 2 (1,6%) apenas no meio com glicerol.

No ano de 2006, foram enviados ao Laboratório de Micobacteriologia 5.515 espécimes clínicos para isolamento de micobactérias, sendo que 1155 (20,9%) foram positivos para micobactérias. Dos 5.515 espécimes, 4.803 foram semeados em tubos com meio de Loewenstein-Jensen contendo piruvato de sódio ou glicerol como fonte de carbono, dos quais 1006 apresentaram crescimento de micobactérias ora em meio com glicerol ou com piruvato ou em ambos. A positividade em glicerol ou piruvato ou em ambos de acordo com os espécimes clínicos está representada nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Positividade de 929 espécimes respiratórios, enviados em 2006 para isolamento de micobactérias, em meio contendo glicerol ou piruvato como fonte de carbono.

Crescimento em Piruvato	Crescimento em Glicerol							
	Escarro		EI		LBA		Outros	
	P	N	P	N	P	N	P	N
Positivo	587	36	174	17	54	2	1	1
Negativo	33	-	21	-	3	-	0	-

EI – escarro induzido, LBA – lavado bronquio-alveolar, P – positivo, N- Negativo

Tabela 7 - Positividade de 77 espécimes extra-respiratórios, enviados em 2006 para isolamento de micobactérias, em meio contendo glicerol ou piruvato como fonte de carbono.

Crescimento em Piruvato	Crescimento em Glicerol							
	Ganglionar		Pleural		Sangue e AMO		Outros	
	P	N	P	N	P	N	P	N
Positivo	27	3	0	0	3	0	28	2
Negativo	12	-	2	-	3	-	0	-

AMO – aspirado de medula óssea P – positivo, N- Negativo

No ano de 2006, os resultados para os espécimes respiratórios diferiram do ano anterior, 816 (88%) dos espécimes mostraram crescimento de micobactérias quando semeados nos dois meios, e igual percentagem, 57 e 56 (6%), cresceram apenas em meio com glicerol ou em meio com piruvato.

Em relação aos espécimes extra-pulmonares 55 (71,5%) apresentaram crescimento de micobactérias nos dois meios, 5 (6,5%) apenas no meio com glicerol e 17 (22%) apenas no meio com piruvato

Como pode ser notado, os espécimes extra-pulmonares apresentaram melhor positividade no meio com piruvato em relação ao meio com glicerol 14,6% versus 1,6% e 22% versus 6,5% nos anos de 2005 e 2006 respectivamente.

O laboratório realiza de rotina a triagem de cepas do complexo *M. tuberculosis* através de três testes bioquímicos – produção de niacina, redução do nitrato e catalase após aquecimento, baseados nestes testes comparamos o número de cepas do complexo *M. tuberculosis* ou pertencentes a outras espécies micobacterianas que cresceram apenas no meio contendo glicerol ou no meio contendo piruvato para verificar se um dos meios favorecia o crescimento de micobactérias não tuberculosas ou não (tabela 8).

Como pode ser verificado, não houve diferença no número de cepas não tuberculosas que cresceram apenas em meio contendo piruvato ou glicerol.

Tabela 8 - Comparação do meio de LJ com glicerol e piruvato no favorecimento de isolamento de cepas do complexo *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculose.

	Crescimento apenas em glicerol		Crescimento apenas em piruvato	
	2005	2006	2005	2006
TB	53	50	13	51
NMT	17	20	3	10
Total	70	70	16	61

De acordo com o objetivo do projeto, verificar a ocorrência de *M. bovis* entre as cepas micobacterianas isoladas no Laboratório de Micobactérias, foram selecionados os pacientes que apresentaram cepas que cresceram apenas em meio com piruvato como fonte de carbono para análise das características das cepas isoladas visando à identificação de *M. bovis*.

Dos pacientes cujos espécimes clínicos apresentaram isolamento de micobactérias no ano de 2005, dezenove apresentaram pelo menos uma cepa crescendo apenas em meio com piruvato. Entre estes pacientes, de oito foram isoladas cepas que cresceram nos dois meios, com glicerol e com piruvato, e cepas que cresceram apenas no meio com piruvato.

As características destes isolamentos estão apresentadas na tabela 9. Quando o paciente apresentou mais de uma cepa crescendo em determinado meio, o número de dias refere-se à média de dias para crescimento das cepas.

Tabela 9 – Características dos isolamentos das cepas de pacientes que tiveram pelo menos uma cepa crescendo apenas no meio com piruvato, ano 2005.

Paciente	Nº cepas	Espécime	Meio com glicerol		Meio com piruvato		Bioquímica
			Cresc.	dias	Cresc.	dias	
AFS	1	pleura	N	-	P	48	1
ACSM	1	EI	N	-	P	32	2
CAB	1	escarro	N	-	P	58	1
	2	EI	P	44	P	44	1
	2	escarro	P	19	P	19	1
DOF	1	EI	N	-	P	54	NR
ELBC	1	escarro	N	-	P	55	NR
JEF	1		N	-	P	58	1
JSL	1	pleura	N	-	P	56	1
	1	EI	P	43	NR	-	1
LS	1	LBA	N	-	P	38	1
	1	pele	P	39	P	39	1
LNC	1	escarro	N	-	P	48	1
MLB	1	EI	N	-	P	53	1
NF	1		N	-	P	54	1
RRL	1	escarro	N	-	P	43	2
RFSA	1	EI	N	-	P	40	1
	2	escarro	P	29	P	29	1
	1	EI	P	40	P	40	1
	1	LBA	P	26	P	26	1
SRP	1	escarro	N	-	P	57	1
	8	escarro	P	25	p	25	1
TSJ	1	EI	N	-	P	58	1
	1	escarro	P	19	P	19	1
	5	EI	P	36	P	36	1
VJV	1	escarro	N	-	P	57	2
VMPB	1	EI	N	-	P	57	1
	1	escarro	P	34	NR		1
VFSN	1	outros	N	-	P	32	NR
WOA	1	EI	N	-	P	59	1
	2	escarro	P	26	P	26	1
	3	EI	P	47	P	47	1

NR – não tem criotubo ou contaminou. Bioquímica 1 =complexo M. tuberculosis, 2 = micobactérias não tuberculose

Dos pacientes cujos espécimes clínicos apresentaram isolamento de micobactérias no ano de 2005, cinquenta e três apresentaram pelo menos uma cepa crescendo apenas em meio com piruvato. Entre estes pacientes, de alguns foram isoladas cepas que cresceram nos dois meios, com glicerol e com piruvato, e cepas que cresceram apenas no meio com piruvato.

As características destes isolamentos estão apresentadas na tabela 10. Quando o paciente apresentou mais de uma cepa crescendo em determinado meio, o número de dias refere-se à média de dias para crescimento das cepas.

Tabela 10 – Características dos isolamentos das cepas de pacientes que tiveram pelo menos uma cepa crescendo apenas no meio com piruvato, ano 2006.

Paciente	Nº cepas	Espécime	Meio com glicerol		Meio com piruvato		Bioquímica
			Cresc.	dias	Cresc.	dias	
ABC	1	EI	N	-	p	47	1
AJSS	1	escarro	N	-	P	45	1
ATA	1	sangue	N	-	P	45	1
	2	escarro	P	26	P	26	1
APBS	1	EI	N	-	P	53	1
	2	EI	P	36	P	36	1
	1	EI	P	39	N	-	1
ALGD	1	LBA	N	-	P	40	1
AFL	1	EI	N	-	P	59	2
	1	EI	P	35	P	35	2
AE	2	escarro	N	-	P	39	1
	1	EI	P	40	N	-	1
	3	EI	P	32	P	32	1
	2	escarro	P	28	P	28	1
ACSF	1	escarro	N	-	P	52	2
CRL	1	escarro	N	-	P	42	1
	3	escarro	P	16	P	16	1
DMF	1	LBA	N	-	P	27	2
DSL	1	EI	N	-	P	55	1
	1	EI	P	54	N	-	1
DLS	1	sangue	N	-	P	47	1

Continuação da tabela 10

	4	escarro	P	22	P	22	1
ERC	1	EI	N	-	P	56	1
	1	escarro	P	26	P	26	1
ES	1	EI	N	-	P	48	1
	4	EI	P	42	P	42	1
ESP	1	escarro	N	-	P	38	1
	3	escarro	P	26	p	26	1
ESS	1	EI	N	-	P	45	1
EOP	1	AMO	N	-	P	55	1
	1	sangue	P	28	P	28	1
FJC	2	escarro	N	-	P	46	1
	1	escarro	N	-	P	47	2
	1	escarro	P	26	P	26	1
FEAN	1	EI	N	-	P	47	1
	5	EI	P	45	P	45	1
GCFS	1	EI	N	-	P	48	1
	3	EI	P	36	P	36	1
IAM	1	EI	N	-	P	60	2
JSV	1	escarro	N	-	P	53	1
	4	escarro	P	38	P	38	1
JS ^a	2	escarro	N	-	P	40	2
	1	escarro	P	13	P	13	2
JDM	1	escarro	N	-	P	42	1
JS ^b	1	escarro	N	-	P	59	1
JFS	1	escarro	N	-	P	54	2
JSS	1	escarro	N	-	P	56	1
	1	Escarro	P	34	P	34	1
KCS	1	escarro	N	-	P	55	1
	3	escarro	P	22	P	22	1
LGS	1	escarro	N	-	P	39	2
LLL	1	EI	N	-	P	39	1
	1	LBA	P	17	P	17	1
MOS	1	escarro	N	-	P	54	1
	1	outros	N	-	P	45	1
	1	pleura	P	24	P	24	1
MAL	1	escarro	N	-	P	55	1
	1	escarro	P	38	N	-	1
MGBS	1	escarro	N	-	P	59	1

Continuação da tabela 10

	1	escarro	P	38	N	-	1
MAC	1	EI	N	-	P	47	2
MCR	1	escarro	N	-	P	59	2
MGPC	2	escarro	N	-	P	50	1
	3	escarro	P	31	P	31	1
MRL	2	escarro	N	-	P	40	1
	3	escarro	P	33	P	33	1
NSP	1	escarro	N	-	P	54	1
	5	escarro	P	32	P	32	1
PVS	1	pleura	N	-	P	41	1
RFC	1	escarro	N	-	P	42	1
	2	escarro	P	27	P	27	1
RXO	1	escarro	N	-	P	47	1
	2	escarro	P	27	P	27	1
RM	1	EI	N	-	P	42	1
	1	escarro	P	27	P	27	1
	1	EI	P	44	N	-	1
RSF ^a	1	escarro	N	-	P	33	2
RSF ^b	1	pleura	N	-	P	45	1
SV VC	1	escarro	N	-	P	53	1
	1	EI	P	46	P	46	1
SIS	1	pleura	N	-	P	48	1
	1	pleura	P	34	P	34	1
SS	1	pleura	N	-	P	54	1
	1	pleura	P	33	P	47	1
SA	4	escarro	N	-	P	52	1
	1	liquor	P	38	N	-	1
	1	outros	P	18	P	18	1
	1	EI	P	2	p	20	1
SBGS	1	escarro	N	-	P	45	1
SISE	1	escarro	N	-	P	49	1
VPS	1	EI	N	-	P	47	1
VLC	1	EI	N	-	P	47	1
	1	EI	P	41	N	-	1
WLVO	2	EI	N	-	P	49	1
	1	EI	P	32	P	32	1

Bioquímica 1 =complexo M. tuberculosis, 2 = micobactérias não tuberculose

Como pode ser observado, todas as cepas de micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* foram isoladas a partir de espécimes clínicos naturalmente contaminados (escarro e escarro induzido) (tabelas 9 e 10). No período do estudo foram, também, isoladas micobactérias outras que não *M. tuberculosis* a partir de espécimes naturalmente estéreis, porém todas as cepas dos pacientes que albergavam estas espécies cresceram nos dois meios (glicerol e piruvato) e não foram selecionadas para a etapa posterior. O resultado da identificação das micobactérias não tuberculosas isoladas de espécimes estéreis constituiu um projeto a parte e foi apresentado em congresso científico (Senna et al., 2008).

As cepas de micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* foram submetidas a esquema simplificado de testes fenotípicos para sua identificação. Os testes selecionados foram aqueles que melhor identificam as espécies mais prevalentes em amostras clínicas e estão apresentados nas tabelas 11 e 12.

No ano de 2005, foram isoladas micobactérias não tuberculosa, que não cresceram em meio com glicerol de 3 pacientes (ACSM, RRL e VJV). No ano de 2006, foram isoladas micobactérias não tuberculosa, que não cresceram em meio com glicerol de 11 pacientes. A cepa de JFS não cresceu ao ser repicada, não sendo possível a sua identificação, e as dos demais pacientes (AFL, ACSF, DMF, FJC, IAM, JS^a, LGS, MAC, MCR, RSF^a) foram identificadas.

As tabelas 13 e 14 apresentam esta identificação preliminar e pode-se verificar, que com exceção de *M. mucogenicum*, as espécies isoladas são consideradas potencialmente patogênicas, porém foram todas isoladas de amostra clínica naturalmente contaminada.

Na segunda etapa de investigação da presença de *M. bovis* entre as cepas do complexo *M. tuberculosis* isoladas no HU/IDT-UFRJ, verificamos que todas as cepas apresentaram padrão bioquímico de *M. tuberculosis*, produção de niacina e redução de nitrato positivos e catalase a 68° negativo, denominado de padrão 1 nas tabelas 9 e 10. *Mycobacterium bovis* apresenta todos os três testes

negativos, e não foi encontrado nenhuma cepa com este padrão, ainda assim, selecionamos algumas cepas para realizar o teste de resistência a pirazinamida e a PCR, utilizando dois primers, o Rv0577 amplifica seqüência comum a todas as espécies do complexo *M. tuberculosis* e o Rv1510, amplifica seqüência específica de *M. tuberculosis* não existente em *M. bovis*.

A figura 2 apresenta um dos géis confeccionados, onde podem ser observados produtos de amplificação dos primers Rv0577, primers Rv1510, padrão positivo *M. tuberculosis* H37Rv nos slots 13 e 17, padrão negativo Para Rv1510 - *M. bovis* nos slots 12 e 16, micobactéria não tuberculose nos slots 14 e 18, padrão de PM de 100 pb nos slots 1 e 20, e controle da reação – mix - no slot 15.

Como pode ser observado na tabela 15 que apresenta os resultados das cepas de 16 pacientes de 2005, foi possível realizar PCR nas cepas de 6 pacientes, nestas a amplificação para Rv0577, seqüência comum a todas as espécies do complexo *M. tuberculosis*, foi positiva em cepas de 4 pacientes e inconclusiva em 2. No entanto, a amplificação para Rv1510, seqüência comum as espécies do complexo, exceto para *M. bovis* e BCG foi positiva em todas as 6 cepas.

O teste de resistência ao PZA foi realizado apenas nas cepas de 4 pacientes, apresentando em todas o resultado esperado para *M. tuberculosis*, sensibilidade ao PZA.

A tabela 16 apresenta os resultados das cepas de 53 pacientes de 2006. Foi possível realizar PCR nas cepas de 36 pacientes, nestas a amplificação para Rv0577 foi positiva em cepas de 29 pacientes e inconclusiva em 7. No entanto, a amplificação para Rv1510, seqüência comum as espécies do complexo, exceto para *M. bovis* e BCG foi positiva em todas as 36 cepas.

O teste de resistência ao PZA foi realizado apenas nas cepas de 24 pacientes, apresentando o resultado esperado para *M. tuberculosis* em cepas de 21 pacientes, e positivo, isto é, resistente ao PZA, em cepas de 3 pacientes, porém estas cepas apresentaram amplificação para Rv1510, seqüência não encontrada em *M. bovis*.

Tabela 11 - Propriedades bioquímicas e fisiológicas de micobactérias de crescimento lento não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e comumente isoladas de espécimes clínicos

Espécie	Produção de pigmento		Tempo de crescimento < 7 dias	Produção de niacina	Redução do nitrato	Atividade catalásica a 68°C	Hidrólise do Tween 80	Urease	Redução do telurito de K
	escuro	luz							
<i>M. kansasii</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>M. simiae</i>	-	+	-	V	-	+	-	+	+
<i>M. marinum</i>	-	+	-	V	-	V	+	+	-
<i>M. asiaticum</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. szulgai</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>M. lentiflavum</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>M. gordonae</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. xenopi</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>M. flavescens</i>	+	+	V	-	+	+	+	-	-
MAC	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>M. terrae</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>M. gastri</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	+

MAC = complexo *M. avium-intracellulare*; V - variável; + positivo; - negativo. Adaptado das referências: Kent & Kubica (1985), Leão et al. (2004) e Brasil (2008)

Tabela 12 - Propriedades bioquímicas e fisiológicas de micobactérias de crescimento rápido não pigmentadas

Espécie	Tempo de crescimento < 7 dias	Produção de niacina	Redução do nitrato	Atividade. catalásica a 68°C	Aril sulfatase em 3 dias	Incorporação de ferro
<i>Grupo M. fortuitum</i>	+	-	+	+	+	+
<i>Grupo M. chelonae-abscessus</i>	+	-	-	+	+	-
<i>Grupo M. smegmatis</i>	+	-	+	+	-	+
<i>M. mucogenicum</i>	+	-	V	+	+	-

Adaptada de Brown-Elliot & Wallace, 2002; Brasil, 2008.

Tabela 13 – Identificação preliminar das micobactérias não tuberculose de crescimento lento

Paciente/ ano de isolamento/ espécie	Produção de pigmento		Tempo de crescimento < 7 dias	Produção de niacina	Redução do nitrato	Atividade catalásica a 68°C	Hidrólise do Tween 80	Urease	Redução do telurito de K
	escuro	luz							
ACSM/ 2005/ <i>M. szulgai</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	-
FJC/ 2006/ MAC pigmentada	+	+	-	-	-	+	-	-	+
AFL/ 2006/ MAC	-	-	-	-	-	+	-	-	+
IAM/ 2006/ <i>M. scrofulaceum</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	-/+
MCR/ 2006/ MAC pigmentada	+	+	-	-	-	+	-	-	+

MAC = complexo *M. avium-intracellulare*; + positivo; - negativo;

Tabela 14 – Identificação preliminar das micobactérias de crescimento rápido

Paciente/ ano de isolamento/ espécie	Pigmento	Tempo de crescimento < 7 dias	Produção de niacina	Redução do nitrato	Atividade catalásica a 68°C	Aril sulfatase em 3 dias	Incorporação de ferro
RRL/ 2005/ complexo <i>M. fortuitum</i>	-	+	-	+	+	+	+
VJV/ 2005/ complexo <i>M. fortuitum</i>	-	+	-	+	+	+	+
JS/ 2006/ complexo <i>M. fortuitum</i>	-	+	-	+	+	+	+
AFL/ 2006/ complexo <i>M. fortuitum</i>	-	+	-	+	+	+	+
ACSF/ 2006/ <i>M. mucogenicum</i>	-	+	-	+	+	+	-
RSF/ 2006/ complexo <i>M. fortuitum</i>	-	+	-	+	+	+	+
DMF/ 2006/ <i>M. chelonae/abscessus</i>	-	+	-	-	+	+	-
MAC/ 2006/ complexo <i>M. fortuitum</i>	-	+	-	+	+	+	+
LGS/ 2006/ complexo <i>M. fortuitum</i>	-	+	-	+	+	+	+

Tabela 15 – Resultados dos testes complementares para identificação de *M. bovis* a partir das cepas isoladas em 2005

Paciente	Nº cepas	Espécime	Bioquímica	Resistência a PZA	PCR p/ Rv0577	PCR p/ Rv1510
AFS	1	pleura	1	NR	NR	NR
CAB	1	escarro	1	NR	NR	NR
DOF	1	EI	NR	NR	NR	NR
ELBC	1	escarro	NR	NR	NR	NR
JEF	1		1	NR	NR	NR
JSL	1	pleura	1	NR	+	+
LS	1	LBA	1	-	Inconclusivo	+
LNC	1	escarro	1	NR	NR	NR
MLB	1	EI	1	-	+	+
NF	1		1	NR	NR	NR
RFSA	1	EI	1	-	+	+
SRP	1	escarro	1	NR	NR	NR
TSJ	1	EI	1	-	Inconclusivo	+
VMPB	1	EI	1	NR	NR	NR
VFSN	1	outros	NR	NR	NR	NR
WOA	1	EI	1	NR	+	+

Tabela 16 – Resultados dos testes complementares para identificação de *M. bovis* a partir das cepas isoladas em 2006.

Paciente	Nº cepas	Espécime	Bioquímica	Resistência a PZA	PCR p/ Rv0577	PCR p/ Rv1510
ABC	1	EI	1	NR	NR	NR
AJSS	1	escarro	1	NR	+	+
ATA	1	sangue	1	NR	+	+
APBS	1	EI	1	NR	+	+
ALGD	1	LBA	1	NR	NR	NR
AE	1	escarro	1	-	+	+
CRL	1	escarro	1	-	+	+
DSL	1	EI	1	+	Inconclusivo	+
DLS	1	sangue	1	-	Inconclusivo	+
ERC	1	EI	1	NR	NR	NR
ES	1	EI	1	-	Inconclusivo	+
ESP	1	escarro	1	-	+	+
ESS	1	EI	1	+	+	+
EOP	1	AMO	1	NR	NR	NR
FEAN	1	EI	1	-	+	+
FJC	1	escarro	1	NR	+	+
GCFS	1	EI	1	-	+	+
JSV	1	escarro	1	NR	NR	NR
JDM	1	escarro	1	NR	Inconclusivo	+
JS ^b	1	escarro	1	-	+	+
JSS	1	escarro	1	-	+	+
KCS	1	escarro	1	-	+	+
LLL	1	EI	1	NR	NR	NR
MOS	1	escarro	1	-	+	+
MAL	1	escarro	1	NR	+	+
MGBS	1	escarro	1	NR	+	+
MGPC	1	escarro	1	+	+	+
MRL	1	escarro	1	-	+	+
NSP	1	escarro	1	-	+	+
PVS	1	pleura	1	NR	+	+
RFC	1	escarro	1	-	+	+
RXO	1	escarro	1	-	+	+
RM	1	EI	1	NR	+	+
RSF ^b	1	pleura	1	NR	Inconclusivo	+
SV VC	1	escarro	1	-	+	+
SIS	1	pleura	1	NR	+	+
SS	1	pleura	1	-	+	+
SA	1	escarro	1	-	+	+
SBGS	1	escarro	1	NR	NR	NR
SISE	1	escarro	1	NR	+	+
VPS	1	EI	1	-	Inconclusivo	+
VLC	1	EI	1	-	+	+
WLVO	1	EI	1	-	Inconclusivo	+

EI = escarro induzido, NR = não realizado

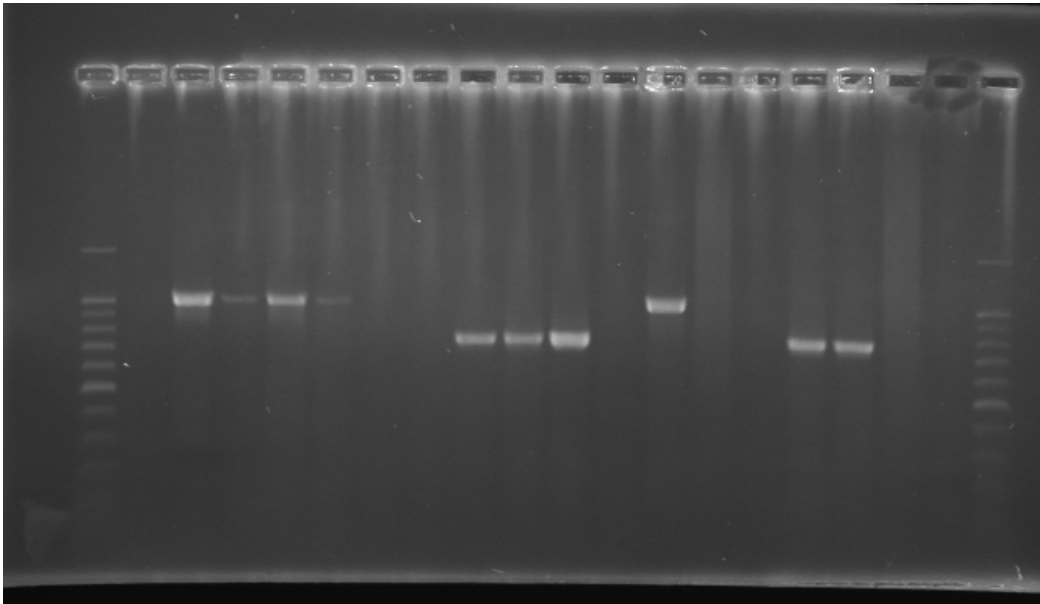


Figura 2 – Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio a 0,5% para a visualização dos produtos da PCR. Slot 1 - padrão de PM 100pb slot de 2 a 6 produtos de amplificação do primer Rv1510, slots 2 e 3 cepas do paciente WLVO/2006; slot 4 – cepa do paciente ESS/2006, slot 5 cepa do paciente ESP/2006 e slot 6 – cepa do paciente PVS/2006. Slots de 7 a 11 produtos de amplificação do primer Rv0577, slots 7 e 8 – cepas do paciente WLVO/2006, slot 9 – cepa do paciente ESS/2006, slot 10 – cepa do paciente ESP/2006, slot 11 – cepa do paciente PVS/2006. Slots 12 a 15 produtos de amplificação do primer Rv1510, slot 12 – *M. bovis*, slot 13 – *M. tuberculosis* H37Rv, slot 14 – micobactéria não tuberculose, slot 15 – controle da reação (mix). Slots 16 a 19 produtos de amplificação do primer Rv0577, slot 16- *M.bovis*, slot 17- *M. tuberculosis* H37Rv, slot 18- micobactéria não tuberculosa, slot 19 - controle negativo (mix). Slot 20 - padrão de PM 100pb.

FLUXOGRAMA

Etapa 1 – Isolamento de micobactérias em meio com glicerol ou piruvato:

Ano 2005

592 espécimes respiratórios cresceram em LJ – P e LJ – G

58 espécimes respiratórios cresceram em LJ-G

14 espécimes respiratórios cresceram em LJ – P

103 espécimes extra-pulmonares cresceram em LJ – P e LJ – G

18 espécimes extra-pulmonares cresceram em LJ – P

2 espécimes extra-pulmonares cresceram em LJ – G

Ano 2006

816 espécimes respiratórios cresceram em LJ – P e LJ – G

57 espécimes respiratórios cresceram em LJ-G

56 espécimes respiratórios cresceram em LJ – P

55 espécimes extra-pulmonares cresceram em LJ – P e LJ – G

17 espécimes extra-pulmonares cresceram em LJ – P

5 espécimes extra-pulmonares cresceram em LJ – G

Etapa 2 – Foram selecionadas as cepas de micobactérias obtidas de pacientes que apresentaram isolamento de pelo menos uma cepa apenas no meio com piruvato.

Ano 2005

19 pacientes apresentaram cepas isoladas apenas em meio com piruvato.

De 3 pacientes foram isoladas micobactérias não tuberculosas – 1 com *M. szulgai* e 2 com complexo *M fortuitum*.

A PCR foi realizada em cepas de 6 pacientes.

O teste de sensibilidade a PZA foi realizado em cepas de 4 pacientes.

Ano 2006

153 pacientes apresentaram cepas isoladas apenas em meio com piruvato.

De 11 pacientes foram isoladas micobactérias não tuberculosas – 4 com complexo *M. fortuitum*, 3 com complexo *M. avium* e 1 cada com *M. mucogenicum*, *M. chelonae – abscessus*, e *M. scrofulaceum*, a cepa do paciente restante não pode ser identificada.

A PCR foi realizada em cepas de 29 pacientes.

O teste de sensibilidade a PZA foi realizado em cepas de 24 pacientes.

6. DISCUSSÃO

A tuberculose causada por *M. bovis* é clinicamente indistinguível da doença causada por *M. tuberculosis*. Nos países onde a tuberculose bovina ainda não foi controlada, a maioria dos casos ocorre em adultos jovens e crianças, como resultado da ingestão de leite e derivados contaminados, as formas extra-pulmonares são as mais comuns, como linfadenopatia cervical, lesões intestinais, etc. No entanto, são escassas as informações sobre a prevalência da tuberculose zoonótica em países em desenvolvimento, devido, principalmente, ao fato do diagnóstico da tuberculose ser limitado a baciloscopia. Mesmo os laboratórios que realizam cultura, utilizam apenas meio contendo glicerol como fonte de carbono, no qual *M. bovis* cresce pobremente. Estimativas da Organização Panamericana da Saúde (PAN AMERICAM HEALTH ORGANIZATION, 1991), sugerem que 7.000 novos casos por ano ocorram na América do Sul, com prevalência de 0,4 a 1% em relação ao total de casos de tuberculose humana. Apesar da ampla utilização da pasteurização do leite nas grandes cidades e o hábito de se ferver o leite de bebida, o costume de preparar queijo fresco com leite cru é freqüente em muitos países.

A tuberculose zoonótica está mudando a sua apresentação, no passado era basicamente doença digestiva em crianças, porém, atualmente, ela passou a ter, também, o caráter de doença profissional, acometendo principalmente magarefes, tratadores, veterinários, laboratoristas e profissionais que lidam diretamente com animais ou seus produtos.

Para a realização do nosso trabalho, incluímos na rotina do Laboratório de Micobacteriologia do complexo hospitalar HUCFF/IDT meio com piruvato. Investigamos um total de 8.140 espécimes clínicos enviados para pesquisa de micobactérias. Como na tuberculose humana por *M. bovis* é mais freqüente o acometimento extra-pulmonar, iniciamos a análise de dados separando as cepas provenientes de espécimes pulmonares e extra-pulmonares e observamos que a positividade da cultura dos espécimes extra-pulmonares foi maior no meio com piruvato do que no meio com glicerol, 14,6% versus 1,6% e 22% versus 6,5% nos anos de 2005 e 2006 respectivamente. No entanto, este fato não foi observado na positividade dos espécimes pulmonares.

Uma possível explicação para esta maior positividade dos espécimes extra-pulmonares em meio com piruvato, pode ser encontrada na utilização da fonte de carbono, para que as micobactérias utilizem o glicerol necessitam transformar o glicerol em fosfo-enolglicerato, fosfo-enolpiruvato e a seguir em piruvato. A adição do piruvato simplifica a utilização da fonte de carbono e permitiria a positividade da cultura a partir de inóculos paucibacilares, como os espécimes extra-pulmonares. Em relação aos espécimes pulmonares, que normalmente apresentam maior quantidade de bacilos, esta simplificação metabólica não teria impacto na positividade da cultura.

A positividade do meio com piruvato em relação ao meio com glicerol em relação as micobactérias não tuberculose, também, foi investigada, não sendo encontrada diferenças significante, isto é, o meio com piruvato não favoreceu o crescimento de micobactérias não tuberculose.

M. bovis é um microrganismo metabolicamente pouco ativo *in vitro*, fornecendo resultado positivo em poucos testes bioquímicos, sua predileção em utilizar o piruvato como fonte de carbono foi investigada por Keating et al. (2005) que reportaram ser devido à presença da enzima piruvato quinase inativa. Assim sendo, para analisar a possível ocorrência de *M. bovis* entre os espécimes clínicos humanos, separamos os 83 espécimes clínicos que apresentaram crescimento apenas em meio com piruvato.

Para melhor investigar a ocorrência de *M. bovis*, selecionamos os 72 pacientes que forneceram espécimes crescendo apenas em meio com piruvato e os relacionamos juntamente com todos os espécimes provenientes destes pacientes tanto os que forneceram cepas que cresceram apenas em glicerol ou em piruvato ou nos dois meios.

Analisando as tabelas 9 e 10 podemos verificar que os 72 pacientes selecionados forneceram 189 espécimes clínicos positivos para micobactérias, sendo que 83 cepas cresceram apenas no meio com piruvato, 30 pacientes forneceram espécimes com crescimento micobacteriano apenas no meio com piruvato, os demais possuíam outros espécimes, coletados na mesma época, que cresceram nos dois meios de cultura.

Considerando o padrão bioquímico encontrado nos testes bioquímicos de triagem foi possível identificar 14 pacientes albergando 17 cepas de

micobactérias não tuberculose. Todos os espécimes eram de origem respiratória. Dos 14 pacientes, 12 forneceram apenas micobactéria não tuberculose, em apenas um paciente houve isolamento concomitante de micobactéria não tuberculose e *M. tuberculosis*, e a cepa do último paciente não foi identificada devido a contaminação.

A identificação preliminar por pequeno número de testes bioquímicos foi realizada em cepas dos 13 pacientes, sendo o complexo *Mycobacterium fortuitum* a espécie mais prevalente, encontrada em sete pacientes, seguido do complexo *Mycobacterium avium* identificado em três pacientes, *M. chelonae-abscessus*, *M. mucogenicum*, *M. szulgai* e *M. scrofulaceum* foram identificados em espécimes clínicos de um paciente cada (tabelas 13 e 14). Em um paciente (AFL/2006) foram isoladas duas espécies diferentes a partir de duas amostras de escarro induzido, MAC e *M. fortuitum*.

Estas espécies, com exceção de uma cepa identificada como complexo *M. avium*, não foram isoladas concomitantemente com *M. tuberculosis*, isto é, a época do isolamento o paciente albergava apenas a micobactéria não tuberculosa. Todas as espécies, com exceção de *M. mucogenicum*, são micobactérias potencialmente patogênicas, sendo vasta a literatura sobre patologias causadas por estas espécies em pacientes HIV positivos ou com outra causa de imunodepressão. No entanto, no presente trabalho, não podemos considerar que estes microrganismos seriam responsáveis por alguma patologia, desde que foram isolados de amostras clínicas naturalmente contaminadas e estão presentes no meio ambiente, para incriminá-los como patogênicos seria necessária uma extensa investigação clínica que caracterizasse lesão patológica nos pacientes, descartasse outras etiologias, além da obtenção de isolamentos múltiplos da mesma espécie.

No período de 2001-2006, Senna (2008) estudou 50 cepas de micobactérias não tuberculose isoladas de amostras clínicas estéreis de 14 pacientes no mesmo complexo hospitalar, utilizando testes fenotípicos e genotípicos identificou majoritariamente *Mycobacterium avium* em 43 cepas. Com exceção de um paciente, do qual foi isolado *M. abscessus* de válvula cardíaca após cirurgia, todos eram HIV positivos.

Continuando a pesquisa de *M. bovis*, selecionamos entre os 189

espécimes clínicos com crescimento micobacteriano das tabelas 9 e 10, apenas as 65 cepas, provenientes de 59 pacientes, identificadas como complexo *M. tuberculosis*, padrão 1 de bioquímica e que cresceram apenas no meio com piruvato. Apesar de todas terem apresentado teste de niacina e de nitrato positivos, e *M. bovis* é negativo nestes testes (KENT & KUBICA, 1985), continuamos o estudo realizando teste de resistência a PZA e testes genotípicos.

Cepas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* podem ser separadas através dos testes de produção de niacina, redução do nitrato e susceptibilidade à PZA e ao ácido tiofeno carboxílico (TCH). Scorpio et al., (1997) clonaram gene da PZAase (*pncA*) de *M. tuberculosis* e *M. bovis* e encontraram mutação que só foi observada em cepas de *M. bovis* e várias sub-espécies de BCG (Pasteur, Copenhagen e Glaxo), esta mutação resulta da troca do nucleotídeo C para G na posição 169 do gene *pncA* causando a substituição do amino ácido 57 de histidina (CAC) para ácido aspártico (GAC), tornando *M. bovis* intrinsecamente resistente à PZA.

Jong et al. (2005) utilizaram o teste de PZA para identificar *M. bovis* entre 1.526 cepas isoladas em São Francisco, Califórnia, todas as 11 cepas de *M. bovis* foram resistentes à PZA, enquanto que apenas 1,3% das 1.515 cepas de *M. tuberculosis* apresentaram resistência. A identificação das cepas como *M. bovis* e *M. tuberculosis* foi confirmada por testes genotípicos.

No nosso trabalho, 28 cepas foram submetidas ao teste de PZA, sendo que três delas apresentaram resistência a este fármaco (cepas de três pacientes DSL, ESS e MGPC, todos de 2006), o paciente DSL possuía outra cepa, isolada em glicerol, sensível aos cinco fármacos testados na rotina (estreptomicina, etambutol, isoniazida, rifampicina e etionamida), os outros dois pacientes não possuíam cepas testadas a outros fármacos. Apesar das três cepas apresentarem resistência a PZA foram caracterizadas como *M. tuberculosis* por testes bioquímicos e por apresentarem amplificação positiva para a seqüência Rv1510, levantando a hipótese de serem cepas de *M. tuberculosis* que se tornaram resistentes a PZA ou a erro no teste de susceptibilidade que é realizado a pH 5,5.

A performance dos testes de sensibilidade dependem da padronização

rigorosa do inóculo, esta padronização é realizada na rotina por comparação da turvação da suspensão teste com a turvação de uma suspensão padrão, método este com grande margem de erro. Para confirmar a resistência destas cepas à PZA, seria necessário a repetição do teste e caso permanecesse dúvidas, sequenciamento do gene *pncA*.

O complexo *M. tuberculosis* é composto por espécies que possuem idênticas seqüências de 16S rRNA e 99,9% de similaridade entre os nucleotídios, sendo considerados bactérias altamente relacionadas (BROSCH ET AL., 2002), diferindo apenas em alguns testes fenotípicos e no espectro de hospedeiros susceptíveis.

Antes da aplicação das técnicas moleculares na identificação das espécies deste complexo, acreditava-se que *M. tuberculosis* tinha se originado de *M. bovis* adaptando-se ao hospedeiro humano há cerca de 10.000 a 15.000 anos atrás quando ocorreu a domesticação do gado. Atualmente, se sabe que o genoma de *M. bovis* é menor que o *M. tuberculosis* e que estas espécies possuem um ancestral comum. *M. tuberculosis* é considerado um microrganismo mais antigo e mais próximo ao ancestral comum do que *M. bovis*.

A evolução das espécies do complexo foi mediada principalmente por deleções de DNA, sendo possível acompanhar a evolução destes microrganismos através do estudo das deleções (MOSTOWY ET AL., 2005). Atualmente, várias técnicas de biologia molecular tem sido empregadas com sucesso na caracterização das espécies deste complexo e, em especial, na diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, como spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU) e tipagem por variable-number tandem repeat (VNTR).

Huard et al. (2003) desenvolveram um painel de PCR baseado nas deleções das espécies do complexo *M. tuberculosis* para ser utilizado na identificação destas espécies. Utilizando sete primers que amplificavam regiões dentro dos loci 16S rRNA, Rv0577, IS1561', Rv1510, RV1970, Rv3877/8 e Rv3120, e 71 cepas do complexo *M. tuberculosis* e 44 cepas de micobactérias não tuberculose, eles mostraram que o painel diferencia o complexo *M. tuberculosis* de micobactérias não tuberculose, assim como identifica as

espécies que compõe o complexo. No trabalho de Huard et al. (2003), todas as 71 espécie do complexo *M. tuberculosis* e as 44 não tuberculose amplificaram com o primer 16S rRNA, todas as espécies do complexo amplificaram com o primer Rv0577, apenas as espécies *M. tuberculosis*, *M. africanum* I e *M. canettii* amplificaram com Rv1970, todas as espécies do complexo com exceção de *M. bovis* e BCG amplificaram com RV1510, apenas *M. tuberculosis*, *M. africanum* I e *M. microti* amplificaram com o primer Rv3120, amplificação ocorreu com o primer IS1561' em todas as espécie do complexo exceto para *M. microti* e todas as espécies do complexo exceto BCG amplificaram com o primer Rv3877/8.

No nosso trabalho escolhemos realizar PCR com dois pares de primers (Rv0577 e Rv 1510). O gene Rv0577 foi demonstrado estar presente em todas as espécies do complexo *M. tuberculosis* e ausente na maioria das espécies de micobacteria não tuberculose, enquanto que o gene Rv1510 é encontrado em *M. tuberculosis*, *M. africanum* tipo I e II e *M. canettii*.

Submetemos 42 cepas que cresceram apenas em piruvato e possuíam padrão bioquímico compatível com *M. tuberculosis* ao PCR utilizando os dois pares de primers. Trinta e três cepas mostraram amplificação positiva para o gene Rv0577, específico para o complexo *M. tuberculosis*, em nove cepas o resultado foi inconclusivo, não houve amplificação, possivelmente por quantidade insuficiente de DNA ou problemas na preparação dos reagentes, isto porque, curiosamente, todas a 42 cepas, incluindo as resistentes à PZA e aquelas que não amplificaram com o primer Rv0577, apresentaram amplificação positiva para o primer Rv1510, específico para *M. tuberculosis*, *M. africanum* I e II e *M. canettii*.

As identificações fenotípica e genotípica realizadas no nosso trabalho permitiram concluir que no período estudado não foi isolada cepa de *M. bovis*.

Este resultado aparentemente nos surpreendeu, a tuberculose bovina ainda é prevalente no nosso país. Em inquérito tuberculínico realizado em uma amostragem composta de 454.108 animais em 2004 forneceu uma prevalência animais reatores ao teste de 0,37% no sudeste, e 3,62% nos estados do norte. As regiões que são consideradas as áreas mais importantes da criação de gado foram as que apresentaram a mais baixa prevalência (0,37-0,92%),

certamente por programa de controle de tuberculose bovina mais rigoroso (ROXO, 2005). No Rio de Janeiro, onde foi realizado o presente trabalho, Lilenbaum *et al.* (1998) em pesquisa de tuberculose bovina, encontrou 12,7% de animais de aptidão leiteira reativos ao teste intradérmico.

O presente trabalho foi realizado em hospital terciário, onde é comum a presença de pacientes imunocomprometidos, com AIDS, transplantados, neoplasias e outras co-morbidades, o que facilitaria a externalização da doença por *M. bovis*.

Recentemente, Kantor *et al.*, (2008) realizaram extensa pesquisa na literatura internacional a fim de averiguar a ocorrência de tuberculose zoonótica na América Latina, a prevalência de TB zoonótica em relação ao total de casos humanos de TB variou de 0% a 2,5%, entre os 10 países pesquisados. Notificações de tuberculose humana por *M. bovis* só foram encontradas na Argentina, Brasil, Equador e Venezuela. Aparentemente, Chile, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Peru e Uruguai nunca isolaram *M. bovis* a partir de material humano.

Esses autores relataram que no período de 20 anos (1987-2006) o Laboratório Nacional de Referência Prof. Hélio Fraga, Ministério da Saúde, Brasil que recebe cepas de micobactérias aparentemente diferentes de *M. tuberculosis* de todos os estados identificou apenas um caso de TB por *M. bovis*, a cepa foi isolada a partir de sangue de um paciente HIV positivo. Entre 2002-2004, o laboratório utilizou meio com piruvato, porém não obteve isolamento de *M. bovis*. Em São Paulo, a Rede de Laboratórios do Instituto Adolpho Lutz realizou cerca de 355 mil culturas no período de 2001-2005, e isolou *M. bovis* apenas de 2 pacientes, em um a partir de gânglio linfático e de outro a partir do liquor. Neste período a Rede de Laboratórios do Instituto Adolpho Lutz utilizou os meios de Loewenstein-Jensen e Stonebrink.

No Rio Grande do Sul, estado com tradição em pecuária, no período de 1997-2005 também não foi observado o isolamento de *M. bovis*, entre as 5.000 cepas do complexo *M. tuberculosis* isoladas, 370 destas cepas foram submetidas a tipagem por RFLP (restriction fragment length polymorphism) e por spoligotyping não tendo sido encontrado perfil compatível com *M. bovis*.

Entre os países da América Latina, a Argentina é considerada possuir rebanho em boas condições sanitárias, no entanto é o país do continente com maior número de notificações de tuberculose zoonótica. Nos anos 80 a 90, foram realizadas extensas pesquisas de todos os casos clínicos de tuberculose zoonótica, onde se verificou que a doença se apresentava tanto na forma digestiva quanto pulmonar em 5 a 6% dos casos totais e que 64% desses casos ocorriam em trabalhadores rurais (KANTOR & RITACCO, 1994). Atualmente, o país possui uma incidência de 41 novos casos de TB/100.000 habitantes e notificou 40 casos de TB zoonótica entre 2000-2006, sendo oito destes em pacientes HIV positivos, e número considerável de TB extrapulmonar (KANTOR ET AL., 2008). A Argentina tem como política de saúde pública o uso do meio de Stonebrink (meio com piruvato), juntamente com o meio de Loewenstein-Jensen nos laboratórios de Saúde Pública. Entre os vários estudos realizados neste país a prevalência de TB zoonótica variou de 0% a 8,8%.

No Brasil, onde as condições sanitárias do nosso rebanho bovino não são comparáveis com as da Argentina, praticamente não temos dados sobre o comprometimento humano pelo bacilo bovino. No nosso trabalho não foi possível identificar nenhuma cepa com perfil de *M. bovis* entre as 1.793 cepas de micobactérias isoladas no período não foi. Este resultado é compatível com pesquisas realizadas em São Paulo e Rio Grande do Sul, que apesar de utilizarem meio com piruvato obtiveram isolamento apenas de 2 cepas em São Paulo e nenhuma no Rio Grande do Sul.

Aparentemente ocorre um paradoxo, o país possui taxa de animais positivos ao teste intradérmico não desprezível, segundo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) as notificações oficiais indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados. Cepas de *M. bovis* já foram isoladas a partir de leite cru por Pardo et al. (2001) e Leite et al. (2005) no estado de São Paulo, considerando que exista um consumo significativo de leite cru pela população brasileira, estes isolamentos demonstram o risco potencial de contaminação e adoecimento por *M. bovis*, no entanto não há praticamente notificação de tuberculose por *M. bovis* em humanos no país.

Os raros casos de notificação de tuberculose zoonótica no Brasil certamente representam sub-notificação. No país, a cultura para micobactéria, na maioria dos Laboratórios Centrais Estaduais, é realizada apenas em casos especiais ou em inquéritos de resistência a drogas, mesmo quando realizada, utiliza apenas meio com glicerol, no qual *M. bovis* cresce pobremente. Adicionalmente *M. bovis* não é facilmente diferenciado de *M. tuberculosis* e muitos laboratório que isolam micobactéria não realizam testes bioquímicos, confirmando o crescimento apenas como bacilos álcool-ácido-resistentes através da coloração de Ziehl-Neelsen. Por outro lado, a maioria dos laboratórios que realizam cultura estão localizados em áreas metropolitanas, onde a população tem menor chance de se infecta com *M. bovis*, além disso, a população mais susceptível a doença por *M. bovis* são as crianças, sabidamente pacientes dos quais a coleta de espécimes clínicos é mais laboriosa, exigindo coleta de lavado gástrico no acometimento pulmonar.

Não podemos descartar a hipótese que a falta de isolamento de *M. bovis*, apesar da incorporação de meio com piruvato em pesquisas realizadas nos últimos anos, possa ser conseqüência da melhoria das atividades de controle da tuberculose bovina e das condições sanitárias dos rebanhos brasileiros, assim como melhores condições de trabalho nos frigoríficos, abatedouros e na indústria de carne em geral. Favorecendo esta hipótese a partir de 2001, o PNCEBT tornou obrigatória a realização de teste intradérmico nos animais das cooperativas produtoras de leite, a medida que o programa avança os animais estão sendo diagnosticados em fase inicial da doença, fase na qual não estão ainda eliminado bacilo no leite, soma-se o fato de apenas 10% dos animais com doença clínica eliminarem *M. bovis* no leite. Por outro lado são preocupantes os dados do comércio clandestino. Em 1998 era estimado que 50% da carne e 48% do leite consumidos no Brasil não tinham o aval da Inspeção Sanitária (ABRAHÃO ET AL., 2005). Em especial, é comum a utilização de leite de pequenas propriedades para produção artesanal de queijos e bebidas lácteas, nos quais não podemos afirmar que são preparados com leite pasteurizado.

Para resolver este paradoxo, teríamos que incluir meio com piruvato em

todos os laboratórios das diversas regiões do país, especialmente nas regiões rurais, e aumentar a cobertura do diagnóstico da tuberculose por cultura.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO RMCM. 1998. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

ABRAHÃO RMCM, NOGUEIRA PA, MALUCELLI MIC. 2005. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. Arch. Vet. Sci. 10:1-17.

AMARANTE, JM & COSTA, VLA, 2000. A tuberculose nas comunidades indígenas brasileiras na virada do século. Boletim de Pneumologia Sanitária, 8:5-12

ANDRADE L, SANTIAGO AC, ANDRADE EM. 1972. Caso de tuberculose pulmonar por bacilo bovino na Guanabara. Revista da Divisão Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro. 16:372-390.

ARANAZ A, COUSINS D, MATEOS A, DOMINGUEZ L. 2003. 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. 53:1785–1789.

ARANAZ A, LIENANA E, GOMEZ-MAMPASO E, GALAN J. C, COUSIN D, ORTEGA A, BLANQUEZ J, BLAQUERO F, MATEOS A, SUAREZ G, DOMINGUEZ L. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int.

J. Syst. Bacteriol, 3:1263-1273

ASHFORD DA, WHITNEY E, RAGHUNATHAN P, COSIVI O. 2001. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. Rev. Sci. Tech. 20:325–337.

BATES JH, STEAD WW. 1993. The history of tuberculosis as a global epidemic. Med. Clin. North. Amer. 77:1205-1217.

BLOOM, M. R, and MURRAY, C. J. L. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science 257:1055-1064.

Brasil, MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 1994, 2a edição, Rio de Janeiro.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. 2008. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília, DF.

BROSCH R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, EIGLMEIER K, GARNIER T, GUTIERREZ C, HEWINSON G, KREMER K, PARSONS LM, PYM AS, SAMPER S, VAN SOOLINGEN D, COLE ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:3684–3689.

BROWN-ELLIOTT BA & WALLACE JR. RJ. 2002. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 15:716-746

COLE ST, BROSCH R, PARKHIL J, GARNIER T, CHUCHER C, HARRIS D, GORDON SV, EIGLMEIER K, GAS S, BARRY III CE, TEKAIA F, BADCOK K, BASHAM D, BROWN D, CHILLINGWORTH T, CONNOR R, DAVIES R, DEVLIN K, FELTWELL T, GENTLES S, HAMLIN N, HOLROYD S, HORNSBY T, JAGELS K, KROGH A, McLEAN J, MOULE S, MURPHY L, OLIVER K, OSBORNE J, QUAIL MA, RAJANDREAM A, ROGERS J, RUTTER S, SEEGER K, WHITEHEAD S, BARREL

BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 393 :537-544.

CORRÊA CNM, CORRÊA WM. 1974. Tuberculose humana por bacilo bovino em São Paulo Brasil. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo. 41:131-134.

COSIVI O, GRANGE JM, DABORN CJ, RAVIGLIONE MC, FUJIKURA T, COUSINS D, ROBINSON RA, HUCHZERMEYER HFAK, KANTOR I, MESLIN F-X. 1998. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg. Infect. Dis. 4:59-70.

COUSINS D V, BASTIDA R, CATALDI A, QUSE V, REDROBE S, DOW S, DUIGNAN P, MURRAY A, DUPONT C, AHMED N, COLLINS DM, BUTLER WR, DAWSON D, RODRIGUEZ D, LOUREIRO J, ROMANO MI, ALITO A, ZUMARRAGA M & BERNARDELLI A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1305–1314.

DANIEL TM. 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? Int. J. Tuberc. Lung Dis. 4:395-400.

DE KANTOR, AMBROGGI M, POGGI S, MORCILLO N, TELLES MASD, RIBEIRO MO, TORRES MCGT, POLO CL, WELLMAN RIBÓN W, VICENTE GARCIA V, KUFFO D, ASENCIOS L, CAMPOS LMV, CARLOS RIVAS C, WAARD JH. 2008. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. Tuberculosis. 88:358–365

KANTOR, I. N., RITACCO, V. 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. Vet. Microbiol. 40:5-14.

DOMENECH P, BARRY CE. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. Curr. Opin. Microbiol. 4:28-34.

FLEISCHMANN, RD; ALLAND, D; EISEN, JA; CARPENTER, L; WHITE, O; PETERSON R; DEBOY, R; DODSON, R; GWINN, M; HAFT, D; HICKEY, E; KOLONAY, JF; NELSON, WC; UYAMAY, LA; ERMOLAEVA, M; SALZBERG, SI;

DELCHER, A; UTTERBACK, T; WEIDMAN, J; KHOURI, H; GILL, J; MIKULA, A; BISHAI, W; JACOBS Jr, JW; VENTER, JC; FRASE, CM. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J. Bacteriol. 184:5479-5490.

GARNIER T, EIGLMEIER K, CAMUS J-C, MEDINA N, MANSOOR H, PRYOR M, DUTHOY S, GRONDIN S, LACROIX C, MONSEMPE C, SIMON S, HARRIS B, ATKIN R, DOGGETT J, MAYES R, KEATING L, WHEELER PR, PARKHILL J, BARRELL BG, COLE ST, GORDON SV, HEWINSON RG. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 7782–7787.

GRANGE JM, YATES MD. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Vet. Microbiol. 40:137–151.

GRANGE JM. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. Tuberculosis. 81:71-77.

GRANT IR, BALL HJ, ROWE MT. 1996. Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. in milk by pasteurization. Lett. Appl. Microbiol. 22:253–256.

HAAS DW & DES PREZ RM. 1995. Tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome: a historical perspective on recent developments. Amer. J. Med. 96: 439-450, 1994.

HADDAD N, MASSELOT M, DURAND B. 2004. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. Res. Vet. Sci. 76:1–18.

HIRSH, EAE ; TSOLAKI, AG ; DERIEMER, K ; FELDMAN, MW ; SMALL, PM. 2004. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:4871-4876.

HUARD, RC ; OLIVEIRA-LAZZARINI, LC ; BUTLER, WR ; VAN SOOLONGEN, D ; HO, JL. 2003. PCR-based method to differentiate subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. J. Clin. Microbiol. 41:1637-1650.

JONG BC, ONIPEDE A, PYM AS, GAGNEUX S, AGA RS, DERIEMER K, SMALL PM. 2005. Does Resistance to Pyrazinamide Accurately Indicate the Presence of *Mycobacterium bovis*? J. Clin. Microbiol. 43:3530-3532.

KAMERBEEK J, SCHOULS L, KOLK A, VAN AGTERVELD M, VAN SOOLINGEN D, KUIJPER S, BUSCHOTEN A, MOLHUIZEN H, SHAW R, GOYAL M, VAN EMBDEN J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis. J. Clin. Microbiol. 35:907-914.

KAVANAGH N. 2002. Milk borne zoonotic infections. Cattle Practice.10:15

KEATING LA, WHEELER PR, MANSOOR H, INWALD JK, DALE J, HEWINSON RG. 2005. The pyruvate requirement of some members of the Mycobacterium tuberculosis complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. Mol. Microbiol. 56:163–74.

KENT, P.T. & KUBICA, G.P. 1985. Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control. Atlanta. U.S.A.

KOVALYOV GK. 1989. On human tuberculosis due to *M. bovis*. A review. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 33:199–206.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA, G.I.M.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.R.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. 2004. Practical Handbook for the Phenotypic and Genotypic Identification of Mycobacteria.

LEITE CQF, ANNO IS, LEITE SRA, ROXO E, MORLOCK GP, COOKSEY RC. 2003. Isolation and Identification of Mycobacteria from Livestock Specimens and Milk Obtained in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98:319-323.

LILENBAUM, W ; SHETTINNI, J ; SOUZA, GN ; RIBEIRO, ER ; MOREIRA, EC ; FONSECA, LS. 1998. Tuberculose bovina : prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção na região dos lagos do Estado do Rio de Janeiro. Rev Brás. Medicina Veterinária. 20:20-123.

LONG R, NOBERT E, CHOMYC S, VAN EMBDEN J, MCNAMEE C, REY DURAN R,

TALBOT J, FANNING A. 1999. Transcontinental spread of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis*. *Amer. J. Respir. Crit. Care. Med.* 159:2014–2017.

MONTENEGRO H. 1971. In: *tuberculose e Literatura*. A Casa do Livro. Rio de Janeiro.

MOSTOWY S, COUSINS D, BEHR MA. 2004b. Genomic interrogation of the classic bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Bacteriol.* 186:104-109.

MOSTOWY S, COUSINS D, BRINKMAN J, ARANAZ A, BEHR MA. 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Infect. Dis.* 186 :74-80.

MOSTOWY S, INWALD J, GORDON S, MARTIN C, WARREN R, KREMER K, COUSINS D & BEHR MA. 2005. Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. *J. Bacteriol.* 187:6386–6395

MOSTOWY S, ONIPEDE A, GAGNEUX S, NIEMANN S, KREMER K, DESMOND EP, KATO-MAEDA M, BEHR M. 2004a. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J. Clin. Microbiol.* 42:3594-3599.

MURRAY JF. 1989. The white plague: down and out, or up and coming? *Am. Rev. Resp. Dis.* 140:1788-1795.

NEILL SD, POLLOCK JM, BRYSON DB, HANNA J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 40:41–52.

O'REILLY LM, DABORN CJ. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.* 76:1–46.

PALENQUE E, VILLENA V, REBOLA M J, JIMENEZ M S, SAMPER S. 1998. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* to an immunocompetent patient. *Clin. Infect. Dis.* 26:995–996.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. 1991. Health conditions in the Americas,

vol I. Scientific publication nº524. Pan American Health Organization, Washington, DC

PARDO RB, LANGONI H, MENDONÇA LJP, CHI KD. 2001. A isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38: 284-287.

PARREIRAS PM, LOBATO FCF, ALENCAR AP, FIGUEIREDO T, GOMES HM, BOECHAT N, LAGE AP, ASSIS RA, PEREIRA MAS, SOUZA PR, MOTA PMPC, SUFFYS PN. 2004. Drug susceptibility of brazilian strains of *Mycobacterium bovis* using tradicional and molecular techniques. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99;749-752.

PRITCHARD DG. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888–1988: conquest and controversy. J. Comp. Pathol. 9:357–99.

RASTOGI N, LEGRAND E, SOLA C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev. Sci. Tech. 20:21–54.

RAVIGLIONE MC. 2003. The TB epidemic from 1992 to 2002. Tuberculosis. 83:4-14.

RAVIGLIONE MC & O'BRIEN R. 2005. Tuberculosis In: Harrison's Principles of Internal Medicina, 16th Ed . Kasper DL, Fauci AS, Longo DI, Braunwald E, Hausser SL, Jameson JL, Editora MacGrae-Hill, New York, USA.

ROSEMBERG J, TARANTINO AB. 1997. Tuberculose. In: Tarantino. Doenças Pulmonares. 4a ed Guanabara Koogan, RJ, p. 323-418.

ROXO E. 2005. Situação atual da tuberculose bovina no Brasil. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal, PNCEBT. Secretaria de Defesa Agropecuaria. Docum. PNCEBT DDD2005, São Paulo: SDA; 2005. p. 1–5.

RUA-DOMENECH R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis 86:77–109.

SALO, WL; AUFDERHEIDE, AC; BUIKSTRA, J; HOLEOMB, TA. 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 91:2091-2094

SANT'ANNA CC. 2002. Tuberculose na infância e na adolescência. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu.

SAURET J, JOLIS R, AUSINA V, CASTRO E, CORNUDELLA R. 1992. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. Tubercle Lung Dis. 73:388–391.

SCORPIO, A., D. M. COLLINS, D. WHIPPLE, D. CAVE, J. BATES, AND Y. ZHANG. 1997. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. J. Clin. Microbiol. 32:106–110.

SENNA SG, MARSICO AG, SOBRAL LF, SUFFYS PN, FONSECA LS. 2008. Identificação de Micobactérias Não Associadas a Tuberculose Isoladas de Amostras Clínicas Estéreis de Pacientes do Hospital Universitário do Rio de Janeiro – HUCFF/UFRJ III Encontro Nacional de Tuberculose. Salvador 18 a 21 de junho

SINHA RN. 1994. The significance of Pathogenic Microorganisms in Raw Milk. International Dairy Federation, Ref. S.I. 9405. Brussels, Belgium, p. 117-167.

THOEN C, LOBUE P, KANTOR I. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet. Microbiol. 112: 339–345

TSOLAKI, AG; HIRSH, AE; DERIEMER, K; ENCISO, JÁ; WONG, MZ; HANNAN, M; GOGUET DE LA SALMONIERE, YO; AMAN K; KATO-MAEDA, M; SMALL, PM. 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:4865-4870.

VAN SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; DE HASS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; KOEDAM, M. A.; TEPPEMA, K. S.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L. M. and VAN EMBDEN, J. D. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from África. Int J. Syst. Bacteriol., 47(4):1236-45.

WEDLOCK DN, SKINNER MA, DE LISLE GW, BUDDLE BM. 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect.* 4:471–480.

WHO. 1993. Brief history of age-old disease. In: *The magazine of the World Health Organization.* 4: 22-23.

WHO. 2006. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.* WHO report, Geneva.

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](#)