

ARTIGO DE REVISÃO

TUBERCULOSE BOVINA: ALTERNATIVAS PARA O DIAGNÓSTICO

A.P. Ruggiero^{1*}, A.A. Ikuno², V.C.A. Ferreira², E. Roxo²

¹Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Departamento de Medicina Preventiva, Campus Universitário “Darcy Ribeiro”, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. E-mail: bibi_ruggiero@hotmail.com.

RESUMO

A tuberculose é uma das principais preocupações da Organização Mundial da Saúde, especialmente após o surgimento da AIDS e do aumento da multidroga resistência, sendo considerada a principal causa de morte por um único agente. Além do *Mycobacterium tuberculosis*, principal responsável pela doença em humanos, outra manifestação de importância epidemiológica é a infecção causada pelo *Mycobacterium bovis*, devido à transmissão ao homem, especialmente, pela ingestão de alimentos contaminados, e à escassez de dados relacionados a sua prevalência na população. Em várias partes do mundo existem programas de controle da doença nos bovinos, fundamentados na identificação por teste tuberculínico e na eliminação dos animais positivos. As lesões encontradas em exames *post-mortem* podem ser confirmadas através do isolamento e identificação do agente, porém esse procedimento pode demandar meses para a sua conclusão, razão pela qual, para reduzir o tempo de diagnóstico, novos métodos moleculares são propostos. Para proporcionar uma visão atualizada sobre os esforços no combate da tuberculose bovina, sobre os resultados das campanhas de controle e erradicação e sobre os métodos recentes disponíveis para diagnóstico da tuberculose bovina, como o PCR, neste trabalho é apresentada uma revisão bibliográfica, ressaltando as vantagens e dificuldades para o emprego dos ensaios para diagnóstico e a possibilidade de sua utilização em escala. Concluímos que apesar dos avanços alcançados, ainda não se tem disponível, para a rotina laboratorial, um ensaio sensível, reprodutível e rápido para o diagnóstico da tuberculose em bovinos, sendo essencial esforço e investimento em pesquisas para a solução desse ponto crítico no combate à enfermidade.

PALAVRAS-CHAVE: *Mycobacterium bovis*, reação de PCR, diagnóstico, Tuberculose.

ABSTRACT

BOVINE TUBERCULOSIS: DIAGNOSTIC ALTERNATIVES, A REVIEW OF THE LITERATURE. Tuberculosis is major concern for WHO especially after the onset of the AIDS epidemic and the increase of multidrug resistance, and is considered the main cause of death by a single agent. In addition to *Mycobacterium tuberculosis tuberculosis*, the main cause of the disease in humans, the infection by *Mycobacterium bovis* is also of epidemiological importance, as it can be transmitted to humans, especially by ingestion of contaminated foods, and the risk is heightened due to the lack of information related to population prevalence. In several parts of world, there are programs to control the disease in cattle based on the identification of positive animals using tuberculin tests, followed by slaughtering. The lesions identified by post-mortem exams can be confirmed through isolation and identification of the agent, but it takes months to conclude. New molecular methods have been proposed to reduce the time needed for diagnosis down to a few days. With a view to providing a picture of these new diagnostic methodologies for bovine tuberculosis, such as the PCR assay, these authors reviewed the results of studies reporting their advantages and shortcomings as well as the prospects for their large-scale application. Despite the advances in the development of viable methods there is yet no sensitive, reproducible and rapid method and, therefore, it is necessary to undertake research to overcome these problems.

KEY WORDS: *Mycobacterium bovis*, PCR, diagnosis, tuberculosis.

²Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil.

*Bolsista CAPES.

INTRODUÇÃO

A TUBERCULOSE

Sendo considerada em sua essência uma “epidemia lenta”, a tuberculose, apesar da evolução do conhecimento na área de saúde pública e dos novos métodos de diagnóstico disponíveis, ressurge nos dias de hoje como uma “emergência global” (PAULA, 1988). Por ser responsável pelo maior índice de mortalidade humana causada por um único agente infeccioso, em 1993 ela foi declarada pela Organização Mundial de Saúde como questão de urgência à saúde pública global, representando 26% das mortes previsíveis e 7% de todas as mortes na terra. A estimativa para os anos de 2000 a 2020 é de que aproximadamente um bilhão de pessoas estarão infectadas por esta doença e destas, caso o controle não seja eficiente e rígido, 200 milhões adoecerão e 35 milhões irão a óbito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

A tuberculose é provocada por micobactérias aeróbias estritas, em forma de bastonetes imóveis, que se caracterizam por não formarem esporos, por não possuírem cápsulas ou flagelos e por serem álcool-ácido resistentes. As principais espécies de importância epidemiológica para o homem pertencem ao complexo *M. tuberculosis*, que compreende: o *Mycobacterium tuberculosis*, o *Mycobacterium bovis*, o *Mycobacterium microti* (patogênico apenas para a ratazana – *Microtis agrestis*), o *Mycobacterium africanum* (ainda não isolado no Brasil) e o *Mycobacterium canettii*, não patogênico para o homem (ABRAHÃO, 1998; DUCATI *et al.*, 2004; BROSCHE *et al.*, 2002; CORNER, 1994).

A taxa de infecção por tuberculose no mundo é de 3%, sendo que os índices mais alarmantes são encontrados nos países em desenvolvimento, liderados pela Índia e China. A Índia apresenta cerca de ¼ do total de tuberculose no mundo, com estimativas de 3,5 milhões de pessoas doentes e meio milhão de mortos por ano, e na África a tuberculose corresponde a 80% das doenças de notificação obrigatória (EDGINTON, 2004; FRIEDEN *et al.*, 2003).

A epidemia de AIDS é uma das maiores causas da expansão da tuberculose no mundo, isso porque a co-infecção por *M. tuberculosis* e HIV tem um efeito devastador não só para a população HIV - infectada, como para a população imunocompetente em geral, acelerando o curso da AIDS e a progressão da tuberculose. Em razão do comprometimento do sistema imune causado pelo vírus HIV, aproximadamente um terço dos pacientes com AIDS morre de tuberculose. Vários aspectos associados corroboram para limitar as possibilidades de cura e entre eles podem ser mencionados: a restrição ao acesso de medicamentos, o atraso no diagnóstico, o tratamento inadequado e a presença

de cepas multidroga-resistentes, que na maioria das vezes ocorrem devido à interrupção do tratamento convencional (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE, 2004).

A tuberculose bovina é uma zoonose causada pelo *M. bovis* e apesar de ter uma distribuição cosmopolita, ela ocorre principalmente em países em desenvolvimento. Usualmente a doença apresenta uma evolução crônica com efeito debilitante, porém em alguns casos pode assumir um caráter agudo e ter curso rápido (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988; HAAGSMA, 1995; KANTOR; RITACCO, 1994). Além do bovino, que é o hospedeiro primário, o homem e diversos mamíferos domésticos e silvestres podem ser suscetíveis ao bacilo.

Em modelos animais foi demonstrado que de um a dez bacilos em suspensão podem causar a infecção. Esses bacilos, quando inalados, são fagocitados por macrófagos alveolares e poderão ser eliminados ou então crescer no interior de macrófagos, em lesões denominadas tubérculos. O agente da tuberculose causa uma doença primordialmente respiratória e de transmissão aerógena (MARCONDES, 2002; PRITCHARD, 1988). Além da disseminação pela respiração, o bacilo pode ser eliminado pelo corrimento nasal, leite, fezes, urina, secreção vaginal e uterina e também pelo sêmen. A manifestação da tuberculose é influenciada pela resposta imune individual e na maioria das vezes, em razão do predomínio dessa resposta, o bacilo coexiste com o hospedeiro na forma de uma infecção dormente, que em condições imunossupressivas poderá ser reativada, causando o aparecimento de uma tuberculose ativa.

A tuberculose causada por *M. bovis* é clinicamente indistinguível da tuberculose causada por *M. tuberculosis* e a baciloscopia do escarro, metodologia empregada usualmente no Brasil para o diagnóstico da doença, é ineficaz para distinguir o bacilo humano do bacilo bovino. Essa discriminação somente se torna possível pelo emprego de meios de cultivo específicos, como o meio de Stonebrink, isento de glicerol, tóxico para o cultivo de *Mycobacterium bovis*. (KANTOR; RITACCO, 1994; LATINI *et al.*, 1990; USABIAGA, 2001).

Tanto na América Latina como no Caribe, os registros de tuberculose por *M. bovis* em humanos são escassos. Na América Latina, estimativas conservadoras indicam que do total dos casos de tuberculose em humanos, 2% dos quadros pulmonares e 8% dos casos extrapulmonares são provocados pelo *M. bovis*. (KANTOR; RITACCO, 1994; LATINI *et al.*, 1990; USABIAGA, 2001). No início do século passado, 70 a 80% de tuberculose dos linfonodos cervicais em crianças e 20% de tuberculose renal em adultos foram provocados por *M. bovis*. Nos países onde não existe o controle da tuberculose bovina, a infecção pelo *M. bovis* ocorre

principalmente em jovens pela ingestão ou manipulação de leite contaminado (HARDIE; WATSON, 1992; KLEEGERG, 1984; NEIL *et al.*, 1992). Atualmente, principalmente na Europa, a reativação endógena de infecções adquiridas na infância ou na juventude representa o fator mais comum de tuberculose humana por *M. bovis* (HARDIE; WATSON, 1992; KLEEGERG, 1984; NEIL *et al.*, 1992).

PROGRAMAS DE CONTROLE DA TUBERCULOSE BOVINA

A análise da ocorrência da tuberculose bovina no mundo demonstra que graças aos programas de controle, dos 34 países que constituem a América Latina e Caribe; 23 são considerados livres ou com baixos índices da infecção, representando cerca de 26,3% de toda a população bovina da região. Os países da América do Norte, como o Canadá e Estados Unidos, que tiveram os seus programas de erradicação iniciados na primeira década do século passado e atualmente estão em estágios avançados, apresentam índices da doença muito baixos. (ESSEY; KOLLER, 1994; KANTOR; RITACCO, 1994).

Os dados de notificações oficiais de tuberculose bovina no Brasil, no período de 1989 a 1998, indicavam um percentual de prevalência de animais infectados de 1,3%. Em 1986, a ocorrência de tuberculose bovina no Brasil, com uma população estimada em 137 milhões de bovinos, estava entre 0,9 a 2,9%, com 6,2% a 26,3% dos rebanhos acometidos, sendo que neste mesmo ano, em matadouros, a taxa de identificação dos animais abatidos com lesões tuberculosas era de 0,14% (KANTOR, 1988; KANTOR; RITACCO, 1994). Esses valores se confirmam com as informações obtidas em 1999 no Triângulo Mineiro e nas regiões do centro e sul de Minas Gerais, onde os dados obtidos em aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais indicaram uma prevalência de animais infectados de 0,8%, e cerca de 5% das propriedades com animais reagentes; percentual esse que se elevava para 15% em razão do manejo e do confinamento, em propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção (BRASIL, 2001).

As perdas econômicas causadas pela tuberculose nos animais estão relacionadas principalmente à baixa produtividade e à condenação de carcaças em matadouros. Um animal tuberculoso pode apresentar de 10 a 25% de queda na capacidade produtiva, além de ser uma fonte de infecção para outros animais e para o homem. No Brasil não existem dados sobre o impacto da tuberculose na produção de leite, porém um estudo, realizado em 1988 na Argentina, mostra que as perdas na produção leiteira oriunda de vacas tuberculosas chega a 18%, havendo um decréscimo

no número e na duração de lactação nesses animais, quando comparados com vacas sadias. (KANTOR; RITACCO, 1994; ROXO, 1996).

Pressionados pelas perdas econômicas causadas pela tuberculose e com o propósito de assegurar o mercado de exportações, e se posicionar no mercado internacional, os países da América Latina estão sendo sensibilizados a atender as exigências relacionadas ao manejo sanitário dos rebanhos e a adotar medidas para o controle de zoonoses de relevância para a saúde pública (KANTOR; RITACCO, 1994), estabelecendo e mantendo áreas livres de enfermidades (USABIAGA, 2001).

Para o estabelecimento dos programas de controle deve ser considerado o grau de incidência da doença nos rebanhos, sendo importante ressaltar que diagnósticos falsos colaboram com a negligência dos casos. Em países com elevada incidência da doença é fundamental a vigilância epidemiológica, principalmente, através da inspeção das carcaças em matadouros, sendo pouco requisitados os diagnósticos definitivos que empregam a cultura e o isolamento do patógeno. Nos estágios avançados das campanhas, em razão da diminuição da incidência da doença, passa a ser essencial o diagnóstico definitivo baseado na cultura e no isolamento do material suspeito (CORNER, 1994).

Na América Latina, os planos de controle para combate da tuberculose baseiam-se em esquemas de regionalização, considerando o sistema de produção, as condições culturais, geográficas, econômicas e de infra-estrutura (USABIAGA, 2001).

A Argentina iniciou o programa de controle da tuberculose em 1993, entretanto ainda são poucas as estimativas de prevalência nacional e quando determinadas são feitas através de levantamentos realizados em províncias leiteiras de maior importância, como Santa Fé (ABDALA, 2003).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose, oficializado em 10 de janeiro de 2001, tem como principal objetivo baixar a prevalência e a incidência de tuberculose e brucelose no país. O programa recomenda o uso do teste tuberculínico para o diagnóstico, com o propósito de eliminar os animais positivos, e incentiva a certificação de rebanhos livres da doença. A adesão ao programa inicialmente é voluntária é estimulada por benefícios aos produtores com a valoração dos produtos certificados (BRASIL, 2001).

MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO

Para que os programas de controle de tuberculose assegurem uma rápida decisão é de extrema importância a existência de uma rede laboratorial que disponibilize o suporte técnico e um diagnóstico rá-

pido, específico e sensível. Apesar de nos recentes anos vários métodos bacteriológicos terem sido desenvolvidos para o diagnóstico da tuberculose, nenhum deles pode ser empregado isoladamente (COSIVI *et al.*, 1998), havendo sempre a necessidade do uso de técnicas complementares para o alcance de uma informação eficaz e completa. Vários métodos estão atualmente disponíveis e consistem em recentes avanços para o controle da tuberculose, porém, os resultados laboratoriais obtidos devem ser sempre interpretados em conjunto com os achados clínicos.

Um dos métodos de diagnósticos *in vivo* preconizados para bovinos é o exame clínico, que apresenta como restrição a dificuldade para sua utilização o fato dos sintomas ocorrerem em estágios avançados da doença. Outro ensaio empregado é o teste tuberculínico, que consiste em uma prova cutânea indireta, a qual pela sensibilidade, simplicidade e praticidade permanece como o teste de eleição.

O teste tuberculínico consiste na avaliação de uma reação de hipersensibilidade tardia deflagrada em animais previamente expostos ao bacilo da tuberculose. Como antígenos, para desencadear a reação de hipersensibilidade, são empregadas tuberculinas sintéticas de dois tipos: a PPD bovina, procedente do *M. bovis*; e a PPD aviária proveniente do *M. avium* (MONAGHAN *et al.*, 1994).

O ensaio de gama interferon bovino empregado no diagnóstico *in vitro* da tuberculose, tem como objetivo detectar a reatividade celular, através de uma resposta celular específica à infecção pelo *M. bovis* (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988; HAAGSMA, 1995; RIET-CORREA; GARCIA, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994). Ele está fundamentado na dosagem de uma citocina em amostras de sangue de animais infectados, após a prévia estimulação dos linfócitos com PPD bovino e aviário, uma vez que, as células dos animais quando estimulados não infectados não produzem a citocina (JONES *et al.*, 1992; WOOD *et al.*, 1991). Esse ensaio apresenta como vantagem o fato de ser um procedimento não invasivo, que pode ser realizado várias vezes e sem intervalo de tempo, e em relação ao teste tuberculínico, proporciona ainda, a vantagem de que para sua realização o animal precisa ser capturado somente uma vez. Vale ressaltar, porém, que seu emprego ainda oferece algumas restrições, como o elevado custo, a necessidade de um restrito tempo para o processamento das amostras de sangue (até 8h após a coleta) e a possibilidade da ocorrência de resultados falso-positivos, em razão das reações cruzadas com micobactérias inespecíficas (ABRAHÃO, 1999; KANTOR; RITACCO, 1994).

O ensaio de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), para diagnóstico da tuberculose, pode ser utilizado como um exame complementar aos ensaios baseados na imunidade celular, e se mostra útil para

identificar a infecção em animais anérgicos. Porém, mesmo sendo um método simples, rápido e de fácil execução, tanto a sua especificidade como a sua sensibilidade precisariam ainda ser aperfeiçoadas, embora alguns países o utilizem em seus programas de controle associado ao teste de tuberculina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para análise do ácido micólico (β -hidroxi ácido graxo), foi proposta como alternativa para identificar micobactérias de culturas (BUTLER *et al.*, 1991) e de secreções (JOSTK *et al.*, 1995). Contudo, esse ensaio não é tão sensível como aqueles que empregam a amplificação de ácidos nucleicos, pois a despeito de diferenciar *M. bovis*-BCG de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, não discrimina o *M. bovis* de *M. tuberculosis* (FLOYD *et al.*, 1992).

Usualmente, nas atividades de inspeção, no exame *post mortem*, para a comprovação e controle do diagnóstico realizado a campo e para a avaliação da eficácia das provas de tuberculina, as amostras provenientes de animais que apresentam lesões suspeitas são adequadamente coletadas e rapidamente encaminhadas para exames bacteriológicos e histopatológicos. (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995). Embora o diagnóstico definitivo da tuberculose esteja fundamentado no isolamento e identificação do agente, esta metodologia apresenta aspectos restritivos para uso em larga escala. Isso porque, as técnicas bacteriológicas empregadas apresentam baixa sensibilidade, necessitam de uma grande quantidade de bacilos viáveis e consomem muito tempo para crescimento em meios de cultura apropriados (que pode variar entre 4 a 6 semanas). Essas exigências nem sempre são atendidas em razão dos métodos drásticos de descontaminação do material, que além de destruir os contaminantes, também podem matar alguns bacilos, o que compromete o isolamento (CORNER, 1994; HAAGSMA, 1995; WARDS *et al.*, 1995; ZANINI *et al.*, 2001).

Os métodos histológicos empregados para o diagnóstico da tuberculose são rápidos e baratos, contudo exigem grandes concentrações de bactérias (cerca de 10^4 bacilos por mL ou mais), ressalte-se ainda que outros microrganismos podem produzir lesões semelhantes a da tuberculose bovina por *M. bovis* (HAAGSMA, 1995; WARDS *et al.*, 1995; ZANINI *et al.*, 2001).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose no Brasil recomenda o teste tuberculínico para a identificação dos animais infectados. Em bovinos da pecuária leiteira, emprega-se o Teste Cervical Simples – TCS (terço médio do pescoço) como teste de triagem para a identificação de animais positivos, e para os animais da pecuária de corte, o Teste da Prega Caudal – TPC, ambos com a

tuberculina bovina. Decorridos 60 a 90 dias da triagem os animais poderão ser submetidos ao teste confirmatório no Teste Cervical Comparativo – TCC, que pode ser empregado tanto em animais suspeitos, como positivos no teste de triagem. Quando da ocorrência de animais positivos no teste confirmatório esses animais serão encaminhados de imediato (até 30 dias) para eutanásia, mas, se os resultados forem inconclusivos, poderão ser re-testados após um intervalo de 60 a 90 dias (BRASIL, 2001), condenando-se, então, ao abate os animais que reagirem novamente de forma inconclusiva a este teste.

Nos países nos quais as normas de inspeção *post mortem* são rigorosas, o procedimento adotado tem como critério a detecção da totalidade das lesões suspeitas através de uma inspeção minuciosa dos tecidos apropriados. Na Austrália, onde se empregam estas normas, tem-se detectado 95% dos animais com lesões tuberculosas na inspeção *post mortem* (CORNER, 1994).

No Brasil, a inspeção das carcaças é regulamentada pelo RIISPOA “Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal” da Divisão de Normas Técnicas do Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Animal (DIPOA), do Ministério da Agricultura, segundo decreto de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos de 1962, 1994, 1997, e vigente nos dias atuais (BRASIL, 1952).

Uma alternativa que permite a identificação rápida de várias espécies de micobactérias encontradas em amostras clínicas ou em isolados que crescem em meio líquido ou sólido consiste no estudo de uma proteína de choque térmico (*heat-shock*) de 65 KDa empregando-se a reação em cadeia de polimerase (PCR), e a posterior análise do polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP). Esse ensaio requer uma biomassa menor do que a requerida para o HPLC anteriormente mencionado e pode identificar tanto bactérias do complexo *M. tuberculosis* como micobactérias que não pertencem a esse complexo (TELENTI *et al.*, 1993; TAYLOR *et al.*, 1997).

Uma tecnologia que parece promissora para a identificação e genotipagem de espécies de micobactérias, mas que ainda não está disseminada nos laboratórios de microbiologia clínica, é a técnica do microarranjo do DNA (DNA microarray) que possibilita a imobilização de seqüências de DNA (sondas) que hibridizam com RNAs mensageiros e possibilitam a identificação das funções das seqüências genômicas (GINGERAS *et al.*, 1998).

Pelas razões apresentadas anteriormente, quando comparada ao diagnóstico bacteriológico e bioquímico, a técnica de PCR, assim como outros métodos moleculares, são considerados um avanço promissor no diagnóstico rápido da tuberculose, tanto por reduzirem o tempo de diagnóstico de meses

para poucos dias, como por apresentarem a vantagem de uma elevada especificidade e sensibilidade, além da capacidade de detectar quantidades muito pequenas de bacilos vivos ou mortos na amostra (ABRAHÃO, 1998; KOCAGOZ *et al.*, 1993; BEIGE *et al.*, 1995).

REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

O desenvolvimento da técnica de PCR, que permite a amplificação de segmentos gênicos pela reação de polimerase em cadeia, foi um dos principais avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas e têm permitido o estudo da expressão gênica e o diagnóstico de doenças genéticas, neoplásicas e infecciosas.

A técnica de PCR foi introduzida em 1986 por Mullis e Faloona, sendo considerada revolucionária por permitir inúmeras vezes e em poucas horas a amplificação *in vitro* de uma seqüência alvo de DNA. Através do emprego da enzima Taq polimerase, proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*, este método permite a identificação e amplificação do DNA bacteriano (ANDRADE, 1993).

As seqüências de oligonucleotídeos, que constituem os *primers*, agem como sondas e são consideradas elementos chaves para garantir a especificidade da reação, uma vez que a amplificação do DNA só será possível se houver a hibridização do *primer* com a seqüência alvo de DNA da amostra. Os fragmentos amplificados podem ser evidenciados em gel de eletroforese corado com brometo de etídio, ou por *primers* marcados com isótopos radioativos, ou fluorescentes e ainda empregando-se métodos enzimáticos ou de quimiluminescência (ABRAHÃO, 1998; ANDRADE, 1993; COLLINS *et al.*, 1994).

EMPREGO DA PCR PARA DETECTAR TUBERCULOSE ANIMAL

Na tuberculose, o método de PCR, assim como outros métodos moleculares, vem sendo empregados para a identificação e detecção do agente, tanto em isolados de cultivos, como em amostras clínicas (DE WIT *et al.*, 1990; SAKAMOTO *et al.*, 1999). O interesse pelos métodos moleculares tem se intensificado devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da doença em animais, principalmente pelas limitações quanto à sensibilidade e especificidade do teste de reação cutânea e o longo período para a confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos de rotina (RORING *et al.*, 2000; ZANINI *et al.*, 2001). Apesar das vantagens e da clareza dos resultados, a complexidade e o custo têm sido restrições apontadas para a utilização da PCR no diagnóstico de tuberculose (KLAUSER *et al.*, 1998; VITALE *et al.*, 1998; ZANDEN, 2002).

O sucesso do método de PCR na rotina de diagnóstico da tuberculose está na dependência de uma série

de parâmetros, tais como: a qualidade do DNA, que deve estar livre de contaminantes (os quais interferem na amplificação); na escolha correta dos *primers* para a amplificação do material, assim como no emprego de métodos de extração adequados, especialmente para amostras paucibacilares (KLAster et al., 1998; RORING et al., 2000; ZANINI et al., 2001).

Primers ou oligonucleotídeos para diagnóstico de tuberculose por PCR

A escolha correta dos *primers* é um dos pontos críticos para o sucesso da reação de PCR no diagnóstico da tuberculose (SAKAMOTO et al., 1999). A discriminação do gênero *Mycobacterium* pode ser efetuada com *primers* gêneros-específicos, que detectam as micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, ou ainda os *primers* espécie-específicos que reconhecem sequência de DNA do *M. bovis*, embora não diferencie do *M. tuberculosis*. Portanto, quando não é essencial a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*, as sequências comuns de DNA presentes nestas espécies possibilitam um diagnóstico potencial da tuberculose por PCR (COLLINS et al., 1994; SAKAMOTO et al., 1999).

Muitos *primers*, que inicialmente se mostraram eficientes para discriminar o gênero e a espécie do bacilo da tuberculose, porém como veremos pelos exemplos citados a seguir, muitos deles falhavam em identificar determinadas amostras quando passaram a ser empregado no diagnóstico de rotina.

O emprego de *primers* específicos para o gênero *Mycobacterium* spp., com amplificação do segmento de 383 pares de bases do gene codificando o antígeno 65 kDa-*hsp65*, presente em todas as micobactérias, e das sondas específicas para o complexo *M. tuberculosis* capazes de amplificar um fragmento de 419 pares de bases do gene que expressa o antígeno protéico de 38 kDa-Pab38 foram evoluções de grande impacto (COLLINS et al., 1994; SAKAMOTO et al., 1999).

RODRIGUEZ et al. (1995) descreveram o emprego dos pares de *primers* JB-21 e JB-22, inicialmente considerados específicos para discriminar a espécie *M. bovis*, porém, com a ampliação da amostragem observou-se que muitas vezes não discriminavam com clareza *M. bovis* e também amplificavam pelo menos 25% de isolados de *M. tuberculosis*.

Em populações onde o status da doença é desconhecido uma técnica que diferencia as micobactérias que integram o complexo *M. tuberculosis* é um elemento repetitivo IS6110, encontrado em diferentes sítios do cromossomo de *M. tuberculosis* e que determina uma grande heterogeneidade genotípica em isolamentos (ROMANO et al. 1996; VITALE et al., 1998; ZANINI et al., 2000).

A diferenciação entre as espécies de micobactérias é estabelecida pelo número de cópias de IS6110 que os

microrganismos apresentam. No *M. tuberculosis* são observadas de oito a 20 cópias, em cepas de *M. bovis* há de 2 a 6 cópias e somente uma no *M. bovis* BCG (ARANAZ et al., 1996; ROMANO et al., 1996; VITALE et al., 1998; ZANINI et al., 2000). Porém, posteriormente WEIL e colaboradores (1996) mostraram que nem todas as cepas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* seguiam um mesmo padrão, apresentando uma mesma sequência com diferentes números de cópias de IS6110.

Outra tentativa para discriminar espécies de micobactérias foi proposta com o *primer* específico para o gene que codifica a proteína MTP40, que de início parece estar presente apenas em *M. tuberculosis*, porém posteriormente também foi encontrada em *M. bovis* (WEIL et al., 1996; YEBOAH-MANU et al., 2001).

A PCR multiplex, que emprega em uma mesma reação vários conjuntos de pares de *primers* específicos para determinadas regiões do genoma bacteriano, tem sido uma alternativa para diferenciar as micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. YEBOAH-MANU et al. (2001) descreveram um PCR-multiplex que apresentou bons resultados possibilitando a discriminação do *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. bovis* BCG. Porém, esse ensaio só pode ser empregado sem restrição em amostras provenientes de regiões livres do *M. africanum*. Nessa reação, *primers* específicos para o gênero *Mycobacterium*, foram associados a *primers* específicos para o complexo *M. tuberculosis* e para os espaçadores da região DR 33 e 34, específicos para *M. bovis*, que por sua vez diferenciam *M. bovis* de *M. bovis* BCG, pela presença de duas cópias da região 33 e uma da região 34, respectivamente (YEBOAH-MANU et al., 2001).

A descrição do genoma do *M. tuberculosis* e *M. bovis* introduziu novas alternativas para o diagnóstico da tuberculose, pois um novo cenário da evolução da doença está sendo delineado, principalmente com o conhecimento das regiões do genoma presentes ou ausentes nas bactérias integrantes do complexo *M. tuberculosis*. Estes avanços permitirão a escolha de *primers* adequados, bem como a compreensão e a definição do ancestral comum do agente (AAGAARD et al., 2003; BROSCHE et al., 2002).

Extração do DNA da micobactéria

Apesar da PCR ser um método de diagnóstico promissor, especialmente nos locais com índices de tuberculose elevados, ainda apresenta limitações não só no relativo à padronização, como também, quanto ao custo, complexidade, qualidade e armazenamento dos reagentes (KLAster et al., 1998; RORING et al., 2000).

Nos ensaios moleculares, um fator de relevante importância é o desenvolvimento de um método apropriado para a extração de um pequeno número de organismos de lesões teciduais e a liberação do DNA

presente nestes organismos para a amplificação por PCR (COLLINS *et al.*, 1994).

As técnicas utilizadas com sucesso para a extração de DNA de *M. tuberculosis* em amostras clínicas de escarro de seres humanos têm sido inadequadas para o processamento de *M. bovis* em tecidos de bovinos. Isto pode ser atribuído a grande quantidade de bacilos de *M. tuberculosis* presentes em espécimes humanos, facilitando a extração do DNA, o que não ocorre em materiais colhidos de bovinos infectados pelo *M. bovis* (COLLINS *et al.*, 1994; TAYLOR *et al.*, 2001).

Os primeiros estudos empregando PCR para a detecção direta de *M. bovis* em tecidos bovinos foram realizados em 1995, as vantagens referidas incluíam a rapidez e a habilidade para detectar bacilos inviáveis. Esse ensaio, porém, apresentava limitações, provavelmente relacionadas ao método de extração, principalmente, para a detecção de *M. bovis* em amostras paucibacilares, onde o cultivo mostrava uma sensibilidade muito superior (COLLINS *et al.*, 1994; RORING *et al.*, 2000).

Atualmente, com a diversidade de kits de extração de DNA e o aperfeiçoamento dos procedimentos de amplificação, o diagnóstico de culturas de micobactérias por PCR é muito sensível, mas a reação, quando empregada para amostras de tecido, ainda apresenta restrições quanto à sensibilidade em razão da pequena quantidade de bacilos (RORING *et al.*, 2000). O aspecto restritivo parece consistir na dificuldade em concentrar as micobactérias no *pellet*, especialmente devido à flutuação e a tensão superficial (ANTOGNOLI *et al.*, 2001).

Vários grupos têm tentado estabelecer protocolos para a extração de DNA de amostras clínicas utilizando kits comerciais, ou realizando a extração por solventes orgânicos (fenol-clorofórmio), porém os resultados ainda são muito irregulares (ANTOGNOLI *et al.*, 2001; RORING *et al.*, 2000; WARDS *et al.*, 1994; ROXO *et al.*, 2002).

A comparação de resultados interlaboratoriais com amostras padronizadas e submetidas a diferentes métodos de extração de DNA mostram grandes variações nos valores de sensibilidade e especificidade (DEL PORTILLO *et al.*, 1996).

Uma das alternativas para garantir melhores resultados da reação é o emprego de seqüências de captura de DNA, que apresentam boa resolução em amostras paucibacilares, (RORING *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 2001). Quando aplicados em culturas de bacilos positivas apresentam uma maior sensibilidade variando de 71,4 a 97% (LIÉBANA *et al.*, 1995; WARDS *et al.*, 1995; RORING *et al.*, 2000).

Kits comerciais de extração como: QIAamp DNA Blood Mini Kit - Qiagen® e Wizard Plus Minipreps DNA Purification System - Promega® foram empregados para a extração do DNA em amostras isoladas

em cultivos e apresentaram uma sensibilidade similar ao obtido com a coloração de Ziehl Neelsen. A ocorrência de resultados negativos pode ser atribuída a uma biomassa inadequada, ou pela existência de inibidores da reação na amostra examinada ou ainda por redução do poder de discriminação da espécie de micobactéria. Testes como o MTD® da Gen Probe, quando comparado ao do teste de sensibilização da pele mostram-se rápidos, fáceis e capazes de identificar poucos bacilos em tecidos, porém o mesmo não ocorre quando comparados com a cultura da micobactéria (RORING *et al.*, 2000; YEBOAH-MANU *et al.*, 2001).

Sensibilidade da PCR

O método de PCR é incapaz não diferencia organismos colonizadores e infectantes viáveis dos não viáveis, e pode propiciar resultados falso positivos, decorrentes de contaminações ambientais (MAC FADDEN *et al.*, 1990; ZANDEN, 2002).

A sensibilidade da reação de PCR pode ser influenciada pelas as soluções empregadas, a lise da parede celular, pequeno número de bacilos presentes (CORNEJO *et al.*, 1998), parâmetros cíclicos, bem como pelos procedimentos empregados para detectar e identificar o produto (ZANDEN, 2002).

Embora, uma das grandes vantagens mencionadas para emprego da técnica de PCR seja a alta sensibilidade e especificidade (LIÉBANA *et al.*, 1995; RORING *et al.*, 2000; WARDS *et al.*, 1995), alguns parâmetros da reação podem influenciar estes resultados. Entre eles destacam-se: baixas temperaturas de anelamento, que podem aumentar a inespecificidade da reação, a concentração de sal do tampão e a concentração de magnésio, que quando muito elevada pode inibir a atividade da polimerase e conseqüentemente a quantidade do produto.

Para avaliar a sensibilidade dos testes de PCR, alguns autores empregam diluições seriadas decrescentes de DNA do agente, com o objetivo de estabelecer o limite de detecção do método de extração, ou ainda realizam PCR em tempo real, com avaliação quantitativa do produto amplificado gerado. Tanto as informações referentes à capacidade de detecção quanto à sensibilidade do ensaio devem sempre ser comparadas ao ensaio equivalente de diagnóstico, que é a cultura do bacilo (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; RORING *et al.*, 2000; VITALE *et al.*, 1998; WARDS *et al.*, 1995).

Uma das alternativas para aumentar a sensibilidade da reação de PCR no diagnóstico molecular da tuberculose é o emprego da reação de *nested-PCR*, que consiste na re-amplificação, com *primers* internos, de um fragmento amplificado em uma primeira reação (ZANDEN, 2002).

Problemas de contaminação

Embora observando o pré-requisito para o trabalho laboratorial em tuberculose que exige um grau de segurança nível 3, a contaminação é ainda uma das dificuldades a ser vencida nos laboratórios de biologia molecular voltados para o diagnóstico da tuberculose. Relatos de contaminação cruzada variam entre 0,1 a 65%, taxas essas que podem ser reduzidas abaixo de 1% em laboratórios bem controlados e fiscalizados (KANDUMA *et al.*, 2003).

A contaminação pode ocorrer por reação cruzada entre espécies, normalmente através de amplificações de culturas de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, e pela contaminação das reações de amplificação a serem realizadas, por moléculas da sequência alvo, resultando muitas vezes em falso-positivos (KANDUMA *et al.*, 2003; ZANDEN, 2002).

Com o intuito de minimizar os riscos da contaminação, alguns procedimentos são aplicados como: a inativação fotoquímica, a desintegração do ácido nucléico com ácido clorídrico, e o isolamento de áreas do laboratório de biologia molecular para o processamento e análise do DNA de amostras clínicas e do produto amplificado. Devem ainda ser adotadas precauções no recebimento da amostra, na realização do ensaio em fluxo laminar, dos procedimentos de processamento, e na extração de DNA. Os laboratórios que realizam a rotina de diagnóstico por PCR devem adotar procedimentos padrões na realização da reação tais como: a distribuição, em primeiro lugar da água, nos tubos de reação e depois dos demais componentes, o emprego de ponteiras com filtros e tubos estéreis, além da adoção de cuidados com o armazenamento, processamento e emprego em temperaturas baixas do DNA, reagentes e produtos da PCR (ZANDEN, 2002).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostra que os programas de controle da tuberculose se ressentem da inexistência de ensaios rápidos e sensíveis para diagnóstico da doença, principalmente em regiões aonde é endêmica e a tuberculose bovina e humana coexistem. Um dos desafios atuais para os países em desenvolvimento é a disponibilização de metodologia que assegure a distinção entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*, para o acompanhamento da disseminação de *M. bovis* em humanos e para a elaboração de uma análise fiel da situação epidemiológica da tuberculose nas várias regiões.

Existem numerosas contribuições sobre o desenvolvimento e desempenho de métodos de diagnóstico para a tuberculose (teste tuberculínico, cultura, exame post-mortem, ELISA e γ -interferon) e ensaios moleculares como RFLP e em especial PCR, porém é

necessária a validação desses ensaios, empregando-se amostras clínicas e nas condições do país, no qual os mesmos serão empregados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994; WARDS *et al.*, 1995).

Algumas restrições técnicas impedem a aplicação do método de PCR na rotina laboratorial para o diagnóstico da tuberculose animal. Entre elas: a extração de DNA de amostras clínicas, especialmente em razão da pequena quantidade de bacilos presentes em lesões de bovinos tuberculosos; a escolha de *primers* adequados, que assegurem a especificidade da reação; além do alto custo do diagnóstico, em razão do emprego de kits comerciais, que somente serão viáveis com sua utilização em larga escala.

A técnica de PCR, assim como outras metodologias moleculares, não vem substituir os métodos clássicos de isolamento e identificação do agente, mas tem o objetivo precípuo de auxiliar os exames laboratoriais de tuberculose, permitindo uma expressiva redução no tempo necessário para a confirmação do diagnóstico esclarecendo a natureza das lesões sugestivas de tuberculose em carcaças seqüestradas em frigoríficos.

A diminuição do tempo de exame de lesões suspeitas possibilitará ações rápidas e adequadas para o controle da doença no homem e nos animais e auxiliará na identificação dos fatores de risco, que desempenham importante papel na epidemiologia da tuberculose.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; ØKKELS, L.M.; ANDERSEN, P.; POLLOCK, J.M. Genomic Approach to Identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.8, p.3719-3728, 2003.
- ABDALA, A.; TARABLA, H.; BERTERO, S.; TORRES, P. *Vigilancia epidemiológica de la tuberculosis bovina en el Departamento de Castellanos, Santa Fé*. Disponível em: <<http://www.rafaela.inta.gov.ar/anuario1999/p37.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2003.
- ABRAHÃO, R.M.C.M. *Tuberculose humana causada pelo Mycobacterium bovis: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais*. 1998. 273p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.39, p.175-186, 1993.
- ANTOGNOLI, M.C.; SALMAN, M.D.; TRIANTIS, J.; HERNÁNDEZ J.; KEEFE, T. A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.13, p.111-116, 2001.
- ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONZÁLEZ, O.; RODRÍGUEZ-FERRI, E.F.; BUNSCHOTEN, A.E.; VAN EMBDEN, J.D.A.; COUSINS, D. Spacer

- oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.11, p.2734-2740, 1996.
- BEIGE, J.; LOKIES, J.; SCHABERG, T.; FINCKH, U.; FISCHER, M.; MAUCH, H.; LODE, H.; KÖHLER, B.; ROLFS, A. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.1, p.90-95, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, 2001. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/Programa.doc>>. Acesso em: 16 jan. 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952.
- BROSCH, R.; GORDON, S.V.; MARMESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOLLIGEN, D.; COLE, A. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, v.99, n.6, p.3684-3689, 2002.
- BRUDNEY, K.; DOBKIN, J. Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness and the decline of tuberculosis control programs. *American Review of Respiratory Disease*, v.44, n.4, p.745-740, 1991.
- BUTLER, W.R.; JST, K.C.; KILBURN, J.O. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, p.268-272, 1991.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Manual de normas y procedimientos tecnicos para la bacteriologia de la tuberculosis. Parte I: La muestra. El exame microscopico. Buenos Aires: CEPANZO, 1988. 30p.il. (Notas tecnicas, 26/ rev 1).
- COLLINS, D.M.; RADFORD, A.J.; DE LISLE, G.W.; BILLMAN-JACOBE, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Veterinary Microbiology*, v.40, p.83-94, 1994.
- CORNEJO, B.J.; SAHAGUN-RUIZ, A.; SUAREZ-GUEMES, F.; THORTON, C.G.; FICHT, T.A.; ADAMS, L.G. Comparison of C18-Carboxypropylbetaine and glass bead DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium bovis* in bovine milk samples and analysis of samples by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.8, p.3099-3101, 1998.
- CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v.40, p.53-63, 1994.
- COSIVI, J.M.; GRANGE, C.J.; DABORN, M.C.; RAVIGLIONE, T.; FUJIKURA, D.; COUSINS, R.A.; ROBINSON, H.F.A.K.; HUCHZERMAYER, I.; DE KANTOR I., MESLIN, F.X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging infectious Diseases* v. 4, n. 1, p. 59-69, 1998.
- DE WIT, D.; STEYN, L.; SHOEMAKER, S.; SOGIN, M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, n.11, p.2437-2441, 1990.
- DEL PORTILLO, P.; THOMAS, M.C.; MARTINEZ, E.; MARAÑÓN, C.; VALLADARES, B.; PATARROYO, M.E.; LÓPEZ, M.C. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.2, p.324-328, 1996.
- DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. Micobactérias. In: TRABULSI, R.L.; ATERTHUM, F. (Eds.). *Microbiologia*. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap.56.
- ESSEY, M.A.; KOLLER, M.A. Status of bovine tuberculosis in North America. *Veterinary Microbiology*, n.40, p.15-22, 1994.
- EDGINTON, M. TB: past, present and future. *HSTUPDATE*, Issue n.56, p.3-6, 2000. Disponível em: <<http://www.hst.org.za/uploads/files/up56pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2004.
- FLOYD, M.M.; SILCOX, V.A.; JONES, W.D.; BUTLER, W.R.; KILBURN, J.O. Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by using high-performance liquid chromatography of mycolic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.1327-1330, 1992.
- FRIEDEN, T.R.; STERLING, T.R.; MUNSIFF, S.S.; WATT, C.J.; DYE, C. Tuberculosis. *Lancet*, v.362, issue 9387, p.887-899, 2003. Disponível em: <<http://www.thelancet.com>>. Acesso em: 8 ago. 2005.
- GINGERAS, T.R.; GHANDOUR, G.; WANG, E. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Research*, v.8, p.435-438, 1998.
- GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1/2, p.137-152, 1994.
- HAAGSMA, J. Bovine tuberculosis. Geneve: Office International des Épidémiologies, 1995. 11p. (Manual Amendment 2).
- HARDIE, R.M.; WATSON, J.M. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiology & Infection*, v.109, n.1, p.23-33, 1992.
- JONES, S.L.; COX, J.C.; SHEPHERD, J.M.; ROTH, J.S.; WOOD, P.R.; RADFORD, A.J. Removal of false-positive reactions from plasma in an enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma. *Journal of Immunology Methods*, v.155, n.2, p.233-240, 1992.
- JOST, C.; DUNBAR JUNIOR, D.F.; BARTH, S.S.; HEADLEY, V.L.; ELLIOT, L.B. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex directly from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, p.1270-1277, 1995.
- KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILESPIE, S.H. A review. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *Journal of Applied Microbiology*, v.94, p.781-791, 2003.
- KANTOR, I.N. *Bacteriología de la tuberculosis humana y animal*. Martinez: OPAS/OMS, 1988. 63p. (Nota técnica n.11).
- KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1/2, p.5-14, 1994.

- KLASTER, P.R.; KUIJPER, S.; VAN INGEN, C.W.; KOLK, A.H.J. Stabilized, freeze-dried PCR mix for detection of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.6, p.1798-1800, 1998.
- KLEEGER, H.H. Tuberculosis humana de origen bovino y salud pública. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v.3, p.55-76, 1984.
- KOCAGÖZ, T.; YILMAZ, E.; ÖZKARA, S.; KOCAGÖZ, S.; HAYRAN, M.; SACHEDEVA, M.; CHAMBERS, H.F. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using simplified procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.6, p.1435-1438, 1993.
- KREBS, J.R.; ANDERSON, R.; CLUTTON-BROCK, T.; MORRISON, I.; YOUNG, D.; DONNELLY, C. *Bovine Tuberculosis in Cattle and Bandgers. Report to the Rt Hon Dr. Jack Cunningham MP*. London: Maff, 1997. Background, p.11
- LATINI, M.D.S.; LATINI, O.A.; LOPEZ, M.L.; GECCONI, J.O. Tuberculosis bovina en seres humanos. *Revista Argentina del Torax*, v.51, p.13-16, 1990.
- LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; MATEOS, A.; VILAFRANCA, M.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; TERCERO, J.C.; ALEMANY, J.; SJAREZ, G.; DOMÍNGO, M.; DOMÍNGUES, L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.1, p.33-36, 1995.
- MAC FADDEN, J.; KUNZE, Z.; SEECHURN, P. DNA probes for detection and identification In: MAC FADDEN, J (Ed.). *Molecular biology of the mycobacteria*. London: Surrey University Press, 1990. p.14-18.
- MARCONDES, A.G. *Padronização da técnica de cultivo em camada delgada de agar middlebrook 7 H11 para isolamento de Mycobacterium bovis*. 2002. 115p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, v.40, p.111-124, 1994.
- NEILL, S.D.; BILLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v.40, n.1/2, p.41-52, 1994.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. *Situación de la tuberculosis bovina en las Américas*. Washington, D.C., 1995. 6f. (RIMS 9, Informativo 26).
- PAULA, A. Tuberculose: ontem, hoje e amanhã. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v.55, n.1, p.74-98, 1988.
- PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *Journal of Comparative Pathology*, v.99, p.356-397, 1988.
- RIET-CORREA, F.; GARCIA, M. Tuberculose. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. (Org.). *Doenças dos ruminantes e eqüinos*. 2.ed. São Paulo, 2001, v.1, p.351-362.
- RODRIGUEZ, J.G.; MEIJA, A.; DEL PORTILLO, P.; PATARROYO, M.E.; MURILLI, L.A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology*, v.141, p.2131-2136, 1995.
- ROMANO, M.I.; ALITO, A.; HSANOTTI, J.; BGI, F.; KANTOR, I.; CICUTA, M.E.; CATALDI, A. Comparison of different genetic markers for epidemiology of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v.50, p.59-71, 1996.
- RORING, S.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*, v.74, p.227-236, 2000.
- ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.63, n.2, p.91-97, 1996.
- ROXO, E.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A.; HARAKAVA, R.; RUGGIERO, A.P.M.; VIALTA, A. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA de *Mycobacterium bovis* a partir de leite. (Evaluation of different protocols for DNA extraction of *Mycobacterium bovis* from milk). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, p.46, 2002. Suplemento.
- SAKAMOTO, S.M.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, M.A. S.; ROXO, E.; RICHTZENHAIN, L.J.; VASCONCELLOS, S.A.; FERREIRA NETO, J.S. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.66, n.2, p.44-58, 1999.
- TAYLOR, J.M.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.4, p.1272-1278, 2001.
- TAYLOR, T.B.; PATTERSON, C.; HALE, Y.; SAFRANEK, W.W. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.79-85, 1997.
- TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTER, E.C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.2, p.175-178, 1993.
- USABIAGA, J. *Brucelosis y tuberculosis bovina: ¿control o eliminación?* São Paulo: OMS, 2001. (RIMS 12/15).
- VITALE, F.; CAPRA, G.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates and nasal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.4, p.1050-1055, 1998.
- WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; ISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, v.43, p.227-240, 1995.
- WEIL, A.; PLIKAYTIS, B.B.; BUTLER, C.L.; WOODLEY, C.L.; SHINNICK, T.M. The mtp40 gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.9, p.2309-2311, 1996.
- WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; ROTH, J.S.; BALDOCK, C.; JONES, S.L.; COUSINS, D.B.; MCCORMICK, B.S.; FRANCIS, B.R.; CREEPER, J.T.; WEDDLE, N.E. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, v.68, n.9, p.286-290, 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (Mycobacterium bovis) with the participation of FAO*. Geneva, 1993. 27p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) memorandum from a WHO meeting with the participation of FAO. *Bulletin of World Health Organization*, v.72, p.8510-8857, 1994.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Tuberculosis. Fact Sheet No 104*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>>. Acesso em: 21 jan. 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. *Tuberculosis control in the WHO European Region*. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/document/CMA/rc52fstb0702e.pdf>>. Acesso em: 7 nov 2005.
- YEBOAH-MANU, D.; YATES, M.D.; WILSON, S.M. Application of a simple multiplex PCR to aid in routine work of the mycobacterium reference laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.11, p.4166-4168, 2001.
- ZANDEN, A.G.M. *Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis and control of tuberculosis.*, 2002. p.12-45. Tese (Doutorado) - Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen, 2002.
- ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; FIORAVANTI, R.L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A.; SALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.6, p.2809-2813, 2001.

Recebido em 6/6/06

Aceito em 31/8/06