



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTIRPES DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM PACIENTES COM TUBERCULOSE
NOS DISTRITOS DE BUZI E MANHIÇA, EM MOÇAMBIQUE**

Custódia Lina Sofar Mucavele

Constituição do júri:

Presidente: Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins

Vogais: Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Elizabete Abrantes Nunes

Doutora Margarida Correia Neves

Orientador: Doutora Elizabete Abrantes Nunes

Co-orientador: Doutora Yolanda Maria Vaz

2008

LISBOA

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTIRPES DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM PACIENTES COM TUBERCULOSE
NOS DISTRITOS DE BUZI E MANHIÇA, EM MOÇAMBIQUE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA

Custódia Lina Sofar Mucavele

Constituição do juri:

Presidente: Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins

Vogais: Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Elizabete Abrantes Nunes

Doutora Margarida Correia Neves

Orientador: Doutora Elizabete Abrantes Nunes

Co-orientador: Doutora Yolanda Maria Vaz

2008
LISBOA

RESUMO

Em Moçambique, a tuberculose bovina constitui um dos problemas sérios de saúde animal. Não existe um programa efectivo de controlo da doença. Por outro lado, a incidência de casos de tuberculose humana tem sido crescente, verificando-se, simultaneamente, um aumento dos casos de Tuberculose multirresistente aos medicamentos e dos casos de co-infecção TB-HIV.

A convivência directa entre as famílias criadoras e o gado constitui uma ampla oportunidade para a transmissão zoonótica da infecção. Não se sabe até ao momento qual o impacto da tuberculose bovina (TB) na doença nos humanos, em Moçambique.

As técnicas moleculares de diagnóstico, constituem actualmente, uma ferramenta útil no diagnóstico, nas investigações epidemiológicas e no desenvolvimento de programas de prevenção de doenças.

Para avaliar o envolvimento do *Mycobacterium bovis* em humanos e fazer a caracterização genética das estirpes do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) circulantes no país, 123 amostras (culturas de *Mycobacterium* e espectoração) com baciloscopia positiva (BK+), foram submetidas à extracção do ADN, amplificação por PCR e posterior tipificação pela técnica *Spoligotyping*. Os padrões de spoligotipo encontrados foram analisados usando a base de dados internacional SpolDB4. Em 65% (79/123) das amostras extraiu-se com sucesso o ADN. Observou-se que o ADN proveniente de amostras clínicas era de baixa qualidade comparado ao extraído a partir de colónias.

Não foi isolado o *M. bovis* entre as amostras submetidas a genotipagem. A caracterização molecular revelou que mais de metade dos isolados pertencia a 4 famílias predominantes de *M. tuberculosis*, T1 (16,5%), LAM (16,5%), S (12,5%), e MANU1 (7,5%), havendo uma grande diversidade genotípica. Algumas estirpes analisadas também foram identificadas nos países vizinhos. Os dados obtidos levam-nos a afirmar que as migrações e o HIV são apontados como factores de disseminação da TB em Moçambique.

São discutidos os factores que possam comprometer o sucesso da técnica de spoligotipagem, e outros aspectos de diagnóstico.

Palavras-chave: Zoonose; *M. bovis*; *M. tuberculosis*; Estirpes; *Spoligotyping*; Moçambique.

ABSTRACT

In Mozambique bovine tuberculosis is a serious animal health problem but an effective control program of the disease does not yet exist. On the other hand, the incidence of Human tuberculosis, as well the multidrug resistant cases and the cases of co-infection with HIV are rising.

The direct contact between families and the livestock in rural areas represent a wide opportunity for the zoonotic transmission of the disease. The real impact of bovine tuberculosis (BT) in the Human disease in Mozambique is unknown.

The use of molecular techniques in diagnosis represents, at present, a useful tool for accurate epidemiological investigations and the development of preventive programs.

To assess the involvement of *Mycobacterium bovis* in Human cases of pulmonary BT and to make a genetic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTC) strains circulating in Mozambique, 123 BK+ patient isolates (cultures of *Mycobacterium* in agar and sputum) were submitted to DNA extraction, amplification by PCR and genotyping using *Spoligotyping*. The *Spoligotyping* data were further analysed using an international database SpolDB4.

DNA extraction was successful on 65% (79/123) of isolates. The DNA extracted from clinical samples was poorer in quality than those acquired from colonies.

M. bovis cases were not observed in the isolates typed. Genotyping characterization showed a high diversity of strains, where 4 families of *M. tuberculosis* were most prevalent: T1 (16.5%), LAM (16.5%), S (12.5%) and MANU1 (7.5%). A significant number of spoligotypes were identical to profiles found in the region.

The data reported showed that migration and HIV might be factors of dissemination of TB in Humans in Mozambique.

Factors that can compromise the performance of *Spoligotyping* technique and other diagnosis aspects are discussed.

Keywords: Zoonosis; *M. bovis*; *M. tuberculosis*; Strains, *Spoligotyping*; Mozambique.

AGRADECIMENTOS

Reconhecendo que este trabalho é fruto de apoio incondicional prestado por várias pessoas e instituições, a estas exprimo o meu profundo sentimento de gratidão. Mesmo com o risco de não mencionar todos, passo a mencionar alguns:

À minha família, meu marido Cristiano, ao Stélio e Ico, pelo estímulo nos momentos de desânimo e pelo carinho na hora certa.

Às minhas supervisoras, Prof. Dra Elisabete Nunes e Prof. Dra Yolanda Vaz, por terem orientado com sabedoria e paciência este trabalho.

À minha colega, Adelina Machado, que sempre será para mim uma professora, vai o meu muito obrigado.

Ao senhor Salomão e à dona Mercedes, técnicos do Laboratório de Referência de Tuberculose em Moçambique, aos Drs. Luís Morais e Mateu Espansa do Centro de Investigação em Saúde da Manhica, pelo apoio que deram no fornecimento e tratamento dos dados das amostras.

Aos colegas, Ivone Muocha, Olívia Pedro e Belisário Moiane, do Centro de Biotecnologia da UEM, pelo apoio na minimização das dificuldades enfrentadas no trabalho de tipificação molecular, o meu muito obrigado.

Não me esquecerei dos meus amigos e colegas do curso de mestrado que me deram o apoio moral quando a família não estava por perto e continuaram sempre que precisei. Obrigada Ana Rita, Giovana de Castro, Helena Pontes, Rui Lima, João de Sousa e outros que não foram aqui mencionados.

A bolsa de Mestrado foi atribuída pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

Este estudo foi suportado pelo fundo aberto de investigação - UEM.

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Lista de siglas e abreviaturas	vii
1. INTRODUÇÃO	<u>1</u>
1.1. Justificação do estudo.....	<u>2</u>
1.2. Objectivos.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	50
2.1. A história da tuberculose	50
2.2. Etiologia	7
2.3. Sobrevivência.....	8
2.4. Transmissão	10
2.5. Patogenia e patologia	11
2.6. Epidemiologia da tuberculose humana.....	13
2.7. A tuberculose bovina como zoonose.....	15
2.8. Factores de risco da tuberculose zoonótica.....	19
2.9. Micobactérias e HIV	21
2.10. Manifestação clínica da tuberculose.....	22
2.11. Diagnóstico	23
2.11.1. Tuberculinização.....	23
2.11.2. Exame radiológico	24
2.11.3. Diagnóstico laboratorial	24
2.11.4. O custo das diferentes técnicas de diagnóstico das micobactérias.....	35
2.12. Variantes genéticas do <i>M. tuberculosis</i>	35
2.13. Transmissão recente do <i>M. tuberculosis</i>	39
2.14. Tratamento e medidas de controlo	40
2.14.1. Terapêutica da tuberculose humana	40
2.14.2. Controlo da tuberculose na população Humana	41
2.14.3. Controlo da tuberculose nas populações de bovinos.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1. Área de estudo (localização e dados gerais)	46
3.1.1. Distrito de Búzi.....	46

3.1.2. Distrito da Manhiça.....	47
3.2. Tipo de estudo e amostragem	48
3.3. Amostras.....	48
3.4. Processamento das amostras e técnicas laboratoriais.....	49
3.4.1. Extracção do ADN genómico bacteriano	49
3.4.2. Amplificação do ADN	49
3.4.3. Tipificação.....	49
3.5. Dados epidemiológicos	50
3.6. Análise de dados	50
3.7. Considerações éticas	50
4. RESULTADOS	51
4.1. Perfil demográfico da população em estudo.....	51
4.2. Tipificação de estirpes.....	54
5. DISCUSSÃO	59
5.1. Extracção do ADN.....	59
5.2. Estirpes de <i>Mycobacterium</i> isoladas	62
5.2.1. A ausência de <i>M. bovis</i> em doentes com TB	62
5.2.2. A variedade de estirpes de <i>M. tuberculosis</i> isoladas.....	65
5.3. Limitações do estudo com base na Sploligotipagem.....	67
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	68
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS	
ANEXO I. Conceitos básicos aplicáveis em micobacteriologia molecular.....	86
ANEXO II. Dados bioinformáticos dos 50 padrões de CMT mais frequentes a nível internacional.....	87
ANEXO III. Mapa de Moçambique e as regiões estudadas.....	88
ANEXO IV. Ficha de recolha de dados dos doentes.....	89
ANEXO V. Imagem de padrões de hibridização usando duas matrizes diferentes como fonte de ADN.....	90
ANEXO VI. Dendograma do perfil dos spoligotipos identificados.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS E GRÁFICOS

Figura 1 - Incidência estimada da tuberculose Humana a nível mundial	18
Figura 2 - Ocorrência de TB Humana causada por <i>M. bovis</i> no mundo	21
Figura 3 - Ciclo de transmissão do <i>M. bovis</i> entre humanos e bovinos	21
Figura 4 - Princípio do método <i>Spoligotyping</i> - representação esquemática	34
Figura 5 - Distribuição geográfica das estirpes de <i>M. tuberculosis</i>	37
Figura 6 - Obtenção dos isolados para tipificação molecular	54
Tabela 1 - Tuberculose em Moçambique - Indicadores.....	14
Tabela 2 - Custo estimado de diferentes técnicas de diagnóstico de micobactérias.....	35
Tabela 3 - Prevalência estimada da tuberculose bovina nos distritos de Buzi e Manhiça ...	49
Tabela 4 - Tipo de tratamento dado ao leite consumido pela população em estudo	53
Tabela 5 - Diversidade genética dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> estudados ..	55
Tabela 6 - Frequência de estirpes comuns de <i>M. tuberculosis</i> nos distritos de Buzi e Manhiça.....	<u>58</u>
Gráfico 1 - Origem das amostras	51
Gráfico 2 - Padrão do movimento populacional da população estudada	52
Gráfico 3 - Relação da população estudada com a criação de diferentes animais	98
Gráfico 4 - Famílias de <i>M. tuberculosis</i> isoladas e sua frequência na população	56
Gráfico 5 - Diversidade genética de <i>M. tuberculosis</i> no distrito de Buzi	<u>57</u>
Gráfico 6 - Diversidade genética de <i>M. tuberculosis</i> no distrito de Manhiça	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
BK	Bacilo de Kock
CMT	Complexo Mycobacterium tuberculosis
CISM	Centro de Investigação em Saúde da Manhiça
DINAP	Direcção Nacional de Pecuária
DOT	Tratamento Intensivo Directamente Observado
DR	“Direct repeat” região de repetição directa no Mycobacterium
EAI	Eastern African and Indian
ECL	Enhanced chemiluminescent Liquid (Líquido de detecção)
GATV	Gabinete de Atendimento e Testagem Voluntária
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida/VIH
LAM	Latin American and Mediterranean
MAE	Ministério da Administração Estatal
MAT	Medicamentos antituberculose
MISAU	Ministério de Saúde
MOOT	Micobactérias Não Tuberculosas, “Mycobacteria Other Than TB”
OIE	Organização Internacional de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde/WHO
PNCT	Programa Nacional de Controlo da Tuberculose
PNPCEBT	Prog. Nac. Prevenção, Controlo e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
<i>Spoligotyping</i>	Spacer Oligonucleotide Typing
ST	Biotipo compartilhado- Shared Type
T1	Genofamília “T”/ ill defined T1 superfamily
TB	Tuberculose humana
TBb	Tuberculose bovina
TB-MR	Tuberculose multi-resistente
UEM	Universidade Eduardo Mondlane
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
ZN	Ziehl-Neelsen

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é um grande problema de saúde pública e a maior parte dos casos ocorre em países em desenvolvimento (Cosivi, 1998; WHO, 2006).

Esta doença é contagiosa e é causada por bactérias álcool-ácido resistentes, pertencentes ao género *Mycobacterium*. A doença é progressiva e, geralmente, de curso crónico, afectando animais e seres humanos. Os agentes envolvidos pertencem ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e incluem: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* (Abrahão, 1999), *Mycobacterium pinnipedii* (Brosch *et al.*, 2002) e ainda o *Mycobacterium canetti* (Pelczar *et al.*, 1993; Abalos e Retarnal, 2004), destas espécies, as mais patogénicas para o homem são o *M. tuberculosis* e o *M. bovis*.

Todas as espécies indicadas caracterizam-se pela sua grande proximidade genética, devido à qual as técnicas de diferenciação bioquímica não são muitas vezes capazes de estabelecer distinção clara entre elas (Amanfu, 2006).

Os isolados de *M. tuberculosis* apresentam uma grande variedade genética evidenciada, nos últimos anos em estudos baseados em biologia molecular, que tem tido um papel importante na caracterização dos genótipos bem como no entendimento da sua distribuição geográfica.

O surgimento de estirpes multirresistentes aos medicamentos anti-tuberculose, em humanos, o surgimento de novos casos de tuberculose em zonas declaradas livres da doença, como é o caso da França, que foi declarada livre em 2001 (Haddad *et al.*, 2004), a necessidade de distinguir um caso novo de um caso recorrente, bem como o relacionamento entre surtos, e a transmissão zoonótica, colocam a comunidade científica perante um crescente desafio de associar a epidemiologia clássica à epidemiologia molecular, de modo a permitir a implementação de medidas de controlo mais eficazes.

Entre as técnicas de diagnóstico actualmente empregues, com base na biologia molecular, destaca-se a Spoligotipagem (*Spoligotyping*). Esta é uma técnica é muito útil para se obter uma compreensão geral da epidemia da tuberculose e os seus resultados são fáceis de interpretar, podendo ser partilhados em bases de dados internacionais.

1.1. Justificação do estudo

Em Moçambique, a tuberculose é ainda hoje uma das principais causas de morbilidade e mortalidade Humana. Este país apresenta um programa estruturado de combate à tuberculose Humana desde 1977. O programa adopta, desde 1994, a estratégia DOTS (tratamento intensivo directamente observado), contudo, a tuberculose continua a ser um enorme flagelo de Saúde Pública (OMS, 2005). Segundo Nunes (2005), a tuberculose surge agora com uma forma mais agressiva. O programa de controlo da tuberculose Humana (TB), não faz menção aos animais como possível fonte da doença.

A tuberculose bovina (TBb) é uma doença prevalente no país, não existindo nenhuma área livre desta doença, e tem sido causa de grandes perdas, por rejeição de carcaças, no matadouro. Em muitos países, a TBb é controlada através de programas sistemáticos de teste e abate. Em Moçambique, o programa de controlo da TBb tem como princípio a tuberculinização e abate dos reactivos positivos, todavia, tal método não é aplicado de forma consistente e sistemática. Adicionalmente não são tomadas medidas eficazes de prevenção da transmissão da zoonose.

Os programas de controlo são levados a cabo isoladamente sem que haja uma “ponte” entre os programas da TB e TBb.

A existência de condições que favorecem a transmissão desta infecção ao ser humano, pode fazer com que a TBb se torne um problema sério de saúde pública, se não forem tomadas medidas adequadas. A real magnitude deste problema é desconhecida entre nós.

Segundo Abalos e Retamai (2004), as regiões mais pobres, e onde se mantém um contacto estreito entre os animais de consumo e as comunidades humanas, são as que apresentam maior risco de experimentar uma emergência da TB zoonótica.

Em Moçambique, nenhum estudo foi ainda feito sobre a relação entre a TB e a TBb, o que leva as autoridades médicas a não considerarem, nos programas de controlo da TB, o risco potencial para a saúde humana que o gado pode constituir.

Acredita-se que, uma vez que sejam apresentados dados que evidenciem o envolvimento do *M. bovis* nos casos de tuberculose humana no país, mais ênfase pode ser dada aos programas de controlo da tuberculose bovina, tornando-se este como um assunto prioritário para as autoridades sanitárias nacionais. Há que destacar que estes casos não são diagnosticados devido à incapacidade dos laboratórios locais realizarem a tipificação das bactérias e por apresentarem quadros clínicos e radiológicos semelhantes aos infecção por de *M. tuberculosis* (Nunes, 2005).

Os factores de risco da tuberculose zoonótica já foram estudados em países industrializados, que se localizam maioritariamente em zonas temperadas e apresentam como um dos principais factores de contágio o consumo de leite bovino não pasteurizado. No caso de Moçambique, o cenário é diferente: há regiões com um contacto mais próximo entre os criadores de gado e sua família com os animais e, muitas vezes, com pessoas em condição imuno-comprometida, seja por deficiente nutrição, seja ainda pela associação à infecção pelo Vírus da Inimodeficiência Adquirida (HIV). A epidemia do SIDA é reconhecida como um factor de destaque que modifica dramaticamente a epidemiologia da tuberculose no Homem (Abrahão, 1999).

A prevalência crescente de seropositividade ao HIV que se regista no país, pode constituir um factor agravante na epidemiologia da zoonose. Moçambique apresenta prevalências de HIV+ na ordem dos 16%, apresentando a província de Sofala o índice mais elevado do país, 26,5% (MISAU-DNS, 2005).

Com o presente trabalho, pretende-se contribuir para o conhecimento da verdadeira dimensão do problema da tuberculose pulmonar por *M. bovis* na comunidade, em geral, e do grupo de seropositivos, em particular, e a importância da fonte animal na epidemiologia da doença.

Durante a última década, os métodos de epidemiologia molecular, têm sido desenvolvidos com o propósito de revelar factos epidemiológicos da doença, estudar a sua disseminação, e identificar factores de risco associados com a disseminação de estirpes de micobactérias multirresistentes aos medicamentos (Brudey *et al.*, 2004). Estes métodos de epidemiologia molecular tornam-se assim importantes ferramentas para o desenvolvimento de programas de controlo. No caso da tuberculose encontram-se em franco desenvolvimento as técnicas de genotipagem para a investigação epidemiológica dos isolados, uma vez que o *M. tuberculosis* e o *M. bovis* apresentam grande similaridade genética. Segundo Collins (2001), mais de 97% dos genes são idênticos entre as duas espécies. Abalos e Retamai (2004) afirmam que a homologia nucleotídica das duas espécies é de 99,95%. As técnicas baseadas em biologia molecular, que têm vindo a ser desenvolvidas nos últimos 15 anos, dão um grande contributo no estudo genético, ajudando a fazer a distinção entre as duas espécies.

A tipificação molecular dos isolados tem contribuído para a mudança de dogmas e tem sido usada para investigar importantes propriedades biológicas das estirpes. Segundo Mistra *et al.* (2005), a tipificação das estirpes é importante para a determinação da cadeia de transmissão, identificação de reservatórios da infecção e estudos da TB-MR

(tuberculose multirresistente aos medicamentos) o que pode contribuir para a formulação de terapias e estratégias no âmbito de saúde pública. Segundo Brudey *et al.* (2006), a estrutura genética da população de *M. tuberculosis* está fortemente ligada à escala geográfica, o que reforça a importância de esforço localizado no controlo da TB.

A identificação do *M. bovis* em casos de TB humana e o conhecimento dos factores de risco associados a sua ocorrência, em Moçambique, poderá ser útil na revisão de políticas de controlo, podendo indicar a necessidade de introdução de acções conjuntas entre a medicina humana e a medicina veterinária no desenvolvimento de novas estratégias de controlo da tuberculose.

1.2. Objectivos

Devido à situação vivida em Moçambique, os objectivos gerais deste trabalho foram delineados como:

- Verificar a possível envolvimento do *M. bovis* nos casos de tuberculose na população rural de dois distritos de Moçambique (Búzi e Manhiça)
- Identificar as principais variantes de micobactérias envolvidas nos casos de tuberculose nos dois distritos em estudo.

Como objectivos específicos definiram-se:

- A realização de uma revisão bibliográfica que enquadre as características e importância das micobactérias, em especial do *M. bovis*, como agente zoonóticos;
- Realizar a caracterização genética das espécies e diferenciação de estirpes de micobactérias envolvidas em casos de tuberculose humana nos distritos de Buzi e Manhiça;
- Identificar prováveis factores (socio-económicos e culturais) que possam influenciar a epidemiologia da doença em Moçambique.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A história da tuberculose

A história da tuberculose é tão antiga quanto a da própria civilização, havendo documentação de casos desta doença datados de 3900 AC. No entanto, a comprovação da sua contagiosidade e a descoberta da sua causa datam apenas do final do século XIX. O uso da radiologia para diagnóstico de rotina e de medicamentos eficazes para o seu tratamento curativo só foram conseguidos no final da primeira metade do século XX (de Almeida, 1994; Hiijar, 2005).

Segundo Koivula (2004), através de técnicas de biologia molecular, tem-se demonstrado que algumas múmias Egípcias dos anos 2050 AC padeciam da infecção por tuberculose (TB). Em 1994, Salo e colaboradores (citado por Koivula, 2004) recuperaram o ADN de uma múmia Peruviana de 1000 anos de idade.

Em animais, a evidência genética mais antiga da tuberculose foi encontrada numa espécie extinta de bisonte e é datada de há cerca de 17.000 anos (Rothschild *et al.*, 2001).

Devido aos seus variados sintomas, a tuberculose não era identificada como uma única doença, até à segunda década do século XIX, e só foi denominada tuberculose em 1839, por Schoenlein. Algumas formas da doença eram, provavelmente, conhecidas desde a Grécia Antiga, senão antes, considerando-se que a doença se originou a partir do primeiro gado domesticado, no qual também teve origem a varíola humana (Young, 2004; Abalos e Retamal, 2004).

Acompanhante da evolução das sociedades humanas, a tuberculose conheceu ao longo dos milénios diversas explicações obscurantistas e sobrenaturais e, como consequência, os tratamentos variavam entre ritos exorcizantes ou respostas a castigos divinos.

A tuberculose causou enorme preocupação em saúde pública, no século XIX e no início do século XX, como doença endémica entre as classes pobres das cidades. Na Inglaterra de 1815, uma entre quatro mortes eram devido à então tísica pulmonar; por volta de 1918, uma de seis mortes em França era ainda causada pela tuberculose (Hiijar, 2005).

Desde Hipócrates até Robert Koch, no início do século XX, a tuberculose ocupou uma posição de enorme destaque na medicina. Acredita-se que esta é a doença que mais suscitou estudos para o estabelecimento de padrões de tratamento, validados através de um grande número de pesquisas clínicas, realizadas nas últimas cinco décadas. Mas, mesmo

com as descobertas até agora conseguidas, continua sendo a principal causa de morte por doença infecto-contagiosa em todo o mundo (WHO, 2006).

Com a descoberta do bacilo causador da tuberculose, o *M. tuberculosis*, em Março de 1882, por Robert Koch (Coetzer *et al.*, 1994), as pesquisas avançaram mais rapidamente, chegando-se, finalmente, na metade do século XX, à descoberta de fármacos eficazes para a cura da doença. Koch, que pelo facto recebeu o prémio Nóbél da Medicina, não acreditava que a tuberculose bovina e a humana fossem similares (Neto e Bernardi, 2003). A falta de crença de Kock, impediu, na altura, o reconhecimento do leite de vaca como uma fonte de infecção para o homem.

O primeiro sucesso genuíno de vacinação contra a tuberculose foi desenvolvido a partir de linhagens atenuadas da tuberculose bovina e criado por Albert Calmette e Camille Guerin em 1906. Era a vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guerin). Ela foi usada pela primeira vez em humanos em Julho de 1921, em França e depois, noutros países da Europa, mesmo com algum receio. Esta vacina, continua até hoje em uso nos programas de prevenção em vários países.

Somente após 1946, com o desenvolvimento da estreptomicina, é que o tratamento se tornou possível, aliando-se à prevenção. Antes disso, somente a intervenção cirúrgica permitia o tratamento, e os doentes eram colocados em isolamento em sanatórios. Contudo, as esperanças de erradicação da doença foram frustradas desde o surgimento de estirpes de bacilos resistentes aos antibióticos nos anos 80 (Young, 2003; Nunes, 2005).

Em face aos recursos investidos, era de esperar que agora, no século XXI, a doença estivesse controlada, considerando que os recursos de diagnósticos são relativamente simples e de grande eficácia, e que os esquemas terapêuticos são altamente eficazes. No entanto, o número de casos novos mantém-se elevado e a mortalidade ainda é alarmante, particularmente nas regiões mais pobres, África, Mediterrâneo oriental e Ásia (WHO, 2007).

O ressurgimento da tuberculose resultou na declaração de uma emergência médica global pela Organização Mundial da Saúde em 1993 (WHO, 1994). Outra preocupação da OMS, em 1993, foi a considerável e contínua importância em saúde pública da infecção pelo *M. bovis* no ser humano e em animais.

2.2. Etiologia

De acordo com a “National Center For Biotechnology Information Taxonomy Browser” (www.ncbi.nlm.nih.gov) o gênero *Mycobacterium* contém mais de 140 espécies identificadas. As micobactérias que causam doença nos mamíferos podem-se subdividir em dois complexos: o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) e o Complexo *Mycobacterium avium* (CMA) (Huard *et al.*, 2003; Koivula, 2004). Este último, também conhecido como MOTT (Mycobacteria Other Than TB), ou ainda, como micobactérias atípicas, reúne mais de 50 espécies, sendo a maioria delas não patogênicas para o homem (Wyplosz *et al.*, 1997). Vários estudos têm reportado que a infecção disseminada por MAC, tem sido pouco comum em África (Nunes, 2005; Okello *et al.*, 1990).

O Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O CMT, é composto por 6 espécies similares, nomeadamente: *M. tuberculosis*, *M. africanum* (subtipos I e II), *M. bovis* (incluindo o Bacilo Calmete-Guérin do *M. bovis* (BCG)), *M. pinnipedii* (Brosch *et al.*, 2002), *M. microti* e *M. canetti* (Huard *et al.*, 2003; Ayele *et al.*, 2004; Koivula, 2004). A tuberculose bovina (TBb) é causada por *M. bovis*. Apesar de o gado ser considerado hospedeiro primário do agente, o microorganismo possui vários mamíferos como hospedeiros, incluindo o Homem. As micobactérias do CMT são, geralmente, tratadas como sub-espécies e apresentam uma similaridade genética de até 99,9% (Berg *et al.*, 2007). Contudo, entre as subespécies, as diferenças fenotípicas são distintas e não menos os seus hospedeiros e a patogenicidade (Ayele *et al.*, 2004).

O *M. africanum* causa tuberculose humana com as mesmas características do *M. tuberculosis*, mas apresenta uma distribuição geográfica mais limitada. Foi descrito recentemente e é isolado, predominantemente, em várias regiões de África, fundamentalmente, na África Subsariana. Neste continente, pesquisas recentes mostram uma grande variabilidade da prevalência deste microorganismo. Ele é encontrado em 5% dos doentes com tuberculose na Costa do Marfim, em 60% dos doentes na Guiné Bissau (Koivula, 2004) e em 67% de doentes com TB, no Uganda (Niemann *et al.*, 2002). Do ponto de vista de características fenotípicas, ele apresenta heterogenicidade entre o *M. bovis* e o *M. tuberculosis*. Esta característica particular levou a pensar que o *M. africanum* representaria um contínuo estado evolutivo entre o *M. bovis* e o *M. tuberculosis*. O *M. africanum* ainda se pode dividir em 2 subtipos, de acordo com diferenças biogeográficas: o

Tipo I, predominante na África ocidental (mais próximo do *M. bovis*), e o tipo II na África oriental (mais próximo do *M. tuberculosis*) (Niemann *et al.*, 2002).

O *M. canetti* foi descrito pela primeira vez como uma sub-espécie dentro do CMT, em 1997, num paciente jovem da Somália (Van Soolingen, 2001). Parece possível que certas regiões da África do Este sejam o centro geográfico deste microrganismo.

As duas espécies mais importantes do CMT são o *M. bovis* e o *M. tuberculosis* (Coetzer *et al.*, 1994). O *M. bovis* é geneticamente muito próximo ao *M. tuberculosis*. Estas duas espécies não se podem distinguir apenas com base em características biológicas e físico-químicas e uma distinção precisa entre as duas espécies pode ser estabelecida através de técnicas bioquímicas e de biologia molecular.

As micobactérias são aeróbias, não móveis, não formadoras de esporos, rectas ou ligeiramente curvas, com 1,5 a 4,0 µm de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de largura. A sua parede celular é rica em conteúdo lipídico, o que contribui para a sua resistência a ácidos, à dissecação e a muitos desinfetantes e, também, para o seu crescimento lento e para a hidrofobicidade em meio fluido (Coetzer *et al.*, 1994).

Todos os membros do CMT são de crescimento lento e não pigmentados. O seu crescimento é inibido à temperatura ambiente (25 °C). São sensíveis aos antibióticos anti-tuberculose, com excepção das estirpes que apresentam alterações genéticas que lhes confere resistência a um ou mais destes princípios (TB-MR). As micobactérias são susceptíveis aos raios solares e à irradiação ultra-violeta.

M. bovis é microaerófilo, produz nianicina, é negativo ao teste de redução de nitratos e resistente à pirazinamida (Z) (Coetzer *et al.*, 1994).

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, nos últimos dez anos, tem permitido a diferenciação das micobactérias do CMT em espécies e ainda em estirpes da mesma espécie (as famílias genótípicas). O Anexo I apresenta os conceitos básicos utilizados no estudo molecular das micobactérias (CDC, 2007).

2.3. Sobrevivência

Os bacilos causadores da tuberculose resistem a ambientes secos, sobrevivem por mais de 2 anos em material congelado e durante 6 meses no solo (Carter *et al.*, 1994; Coetzer *et al.*, 1994; Hirsh e Zee, 1999). Contudo a exposição à luz solar (durante 5 minutos) e à radiação ultravioleta, e uma temperatura acima de 60 °C (durante 15 a 20 minutos) causam uma destruição rápida das micobactérias (Coetzer *et al.*, 1994; MISAU-PNCT, 2003).

Desinfetantes como o hipoclorito de sódio a 1%, 3-8% de formalina, 5% de fenol e 3% de iodóforo, destroem as micobactérias quando aplicados sobre instrumentos contaminados, durante 15-20 minutos (Coetzer *et al.*, 1994).

O *M. tuberculosis* tem a capacidade de sobreviver e multiplicar-se no interior dos macrófagos e, uma vez infectado, o indivíduo pode permanecer como portador durante meses, anos e inclusive pelo resto da sua vida (Cousins, 2001; Koivula, 2004).

O *M. bovis* é um patógeno robusto e pode sobreviver fora do hospedeiro animal, no ambiente, edifícios, nos veículos de transporte e na pastagem. O organismo já foi reportado como sendo capaz de sobreviver nas fezes de bovino por períodos que variam de 2 a 5 meses, no Verão e Inverno, respectivamente, e ainda no solo por 2 anos sob condições favoráveis (Ayele *et al.*, 2004). A fertilização de solos com fezes de bovino é prática comum nas zonas rurais de Moçambique.

O *M. bovis* é resistente a diversos desinfetantes químicos, com excepção dos produtos que desnaturam proteínas como o fenol, formol, cresol e álcool. A desinfecção do equipamento contaminado por contacto com carnes contaminadas com *M. bovis* é efectiva mediante a utilização de um desinfetante à base de fenol a 2%, seguido de vapor de formaldeído (Coetzer, 1994; Gracey, 1999). Estes desinfetantes são muito tóxicos e a tendência é de entrar em desuso.

O *M. bovis* apresenta uma resistência intrínseca à pirazinamida, que é uma das principais MAT este facto, pode constituir uma limitante na eficácia do tratamento da tuberculose causada por este agente (Cosivi *et al.*, 1998).

Numa carcaça congelada, as micobactérias mantêm-se vivas por mais de 2 anos e podem sobreviver por períodos consideráveis no queijo e manteiga armazenados a 9 °C. O *M. bovis* é destruído em produtos cárnicos a temperaturas de 6-7 °C, que são mais baixas em relação àquela necessária para a destruição das micobactérias do CMA (Merkal e Whipple, 1980 citados por Coetzer, 1994).

Segundo Gracey (1999), uma vez a carne tratada pelo calor (cozedura, fervura ou assada em pequenos pedaços) o bacilo da tuberculose presente na carne será, com certeza, destruído. Temperaturas acima de 60 °C por 10 minutos, destroem estes agentes (Merkal e Whipple, 1980 citados por Coetzer, 1994).

A temperatura de pasteurização, fornece uma margem ampla de segurança em relação ao leite (Gracey, 1999).

A decomposição não tem efeito sobre a viabilidade das micobactérias. Bacilos viáveis já foram encontrados em pulmão deteriorado de bovino passados 167 dias. Em carcaças pútridas, as micobactérias podem resistir por 27 meses (Gracey, 1999).

2.4. Transmissão

O gado bovino é o principal hospedeiro do *M. bovis*, mas há um grande risco de transmissão deste agente ao homem (Amanfu, 2006). O homem é na maioria dos casos afectado pelo *M. tuberculosis*, porém qualquer das espécies pode ser transmitida de animal para homem e vice-versa (Amanfu, 2006; Collins, 2006).

As vias respiratória e alimentar são as principais vias de transmissão do *Mycobacterium* spp., através de aerossóis contaminados, fezes, urina, descargas genitais, leite obtido duma glândula mamária infectada, alimentos e água contaminados (Coetzer *et al.*, 1994; Carter *et al.*, 1994; Cosivi *et al.*, 1998; Hirsh e Zee, 1999; Solvig *et al.*, 2000; MISAU-PNCT, 2003).

A infecção por *M. tuberculosis* transmite-se ao homem é essencialmente por via aerógena, através de gotículas de aerossóis contendo bacilos, produzidos por um doente com tuberculose activa e que não esteja em tratamento, durante a tosse ou espirro (MISAU-PNCT, 2003; Koivula, 2004). As partículas de aerossóis podem ficar suspensas no ar durante várias horas, sobretudo em locais mal ventilados e escuros, podendo ser inaladas por outros indivíduos susceptíveis, infectando-os.

Em cerca de 80% dos casos de TB, a infecção localiza-se nos pulmões, o que se torna importante sob ponto de vista da saúde pública, devido à transmissão por via aerógena.

O *M. bovis* possui uma das maiores variedades de hospedeiros entre os agentes patogénicos existentes, com um padrão epidemiológico que envolve interacções da infecção entre seres humanos, animais domésticos e fauna selvática.

A tuberculose pulmonar devida ao *M. bovis* é transmissível do gado para os humanos, directamente, pela via aerógena, por inalação (acessos de tosse) e, indirectamente, pelo consumo de leite e produtos lácteos não fervidos ou pasteurizados (Abrahão, 1999; Ayale *et al.*, 2004; Abalos e Retamal, 2004).

Os agricultores podem adquirir a doença por inalação de partículas de aerossóis que são expelidas quando um animal infectado tosse. Desenvolvem assim uma TB pulmonar típica (Cosivi *et al.*, 1998). Uma vez infectados, podem transmitir o agente para o gado.

A propagação homem-homem do *M. bovis*, é considerada um evento raro em indivíduos imunocompetentes (Gutierrez *et al.*, 1997; Cosivi *et al.*, 1998), contudo, estudos recentes realizados na Austrália, Suécia, Holanda e Inglaterra, mostram casos de transmissão aerógena inter-humana deste agente. Além disso, a transmissão inter-humana da tuberculose, envolvendo estirpes TB-MR de *M. bovis*, em pessoas HIV-positivas foi confirmada em surtos hospitalares em França (Dupon, 1992). Do homem para o bovino, a transmissão é directa, pela via aerógena respiratória ou, indirectamente, via cama de palha ou feno contaminado com urina de humanos com tuberculose a nível uro-genital (Abrahão, 1999).

Os animais selvagens podem ser reservatório de tuberculose, o que é um risco potencial para a infecção de animais domésticos nas zonas onde estes têm a possibilidade de entrar em contacto com os mesmos, e constitui um entrave sério nos programas de controlo e erradicação da doença (Cosivi *et al.*, 1998).

Por outro lado, a população em risco pode ser a dos animais selvagens de alto valor económico, como é o caso da África do Sul onde o búfalo africano (*Syncerus caffer*) é o reservatório mais importante nos parques nacionais (cerca de 90% da população de búfalos infectada), colocando em risco carnívoros tais como o leão (*Panthera leo*), a chita (*Acynonix jubatus*) e o leopardo (*Panthera pardus*) (Delahay *et al.*, 2002).

2.5. Patogenia e patologia

A tuberculose bovina é uma enfermidade de evolução crónica, caracterizada pela formação de lesões do tipo granulomatoso, de aspecto nodular, denominadas granulomas. Sendo a porta principal de entrada do bacilo da tuberculose em bovinos o alvéolo pulmonar, encontra-se uma predominância de lesões em gânglios brônquicos e/ou mediastínicos. Uma vez atingido o alvéolo, o bacilo é capturado por macrófagos e o seu destino será determinado pelos seguintes factores: virulência do microrganismo, carga infectante e resistência do hospedeiro. Em animais debilitados, os bacilos proliferam apresentando lesão do tipo exsudativo, com edema, acumulação inicial de polimorfonucleares e, posteriormente, monócitos. Estas lesões raramente evoluem para um tipo produtivo de carácter crónico, com formação de tubérculos caracterizados por formações nodulares tendendo a generalizar-se. A lesão caseosa pode sofrer um processo de amolecimento, disseminando-se por contiguidade ou pelas vias linfáticas e sanguínea, formando lesões micro ou macroscópicas em diversos órgãos (Carter *et al.*, 1994).

No centro da lesão, desenvolve-se necrose caseosa, que pode prosseguir para a calcificação ou liquefacção (Carter *et al.*, 1994; Reischl, 1994) e na periferia da lesão, localizam-se macrófagos inalterados misturados com linfócitos. De seguida, ocorre a proliferação de fibroцитos e uma camada fibrosa que envolve a lesão, formando um tubérculo (Corner, 1993; Kobzik, 1999).

Os tubérculos podem aumentar de tamanho, coalescerem e ocuparem porções consideráveis do órgão. Tais tubérculos, na maioria dos casos, consistem de material caseoso (Carter *et al.*, 1994; Coetzer *et al.*, 1994; Hirsh e Zee, 1999). O processo descrito é típico de tuberculose humana e bovina causada pelos bacilos tuberculosos. É um processo crónico (lesão produtiva ou proliferativa). Ocasionalmente pode ocorrer um processo agudo exsudativo, marcado predominantemente por reacção neutrofílica e efusão de fluidos.

Pode-se encontrar situações em que bovinos tuberculino-positivos não apresentem lesões visíveis à necrópsia, quer pelos animais estarem em estágios iniciais da doença, o que dificulta a localização das lesões, ou porque as lesões estão localizadas nas partes do corpo que não são examinadas durante o trabalho de inspecção de carnes, ou ainda porque animais que tenham tido contacto com outras micobactérias que não o *M. bovis*, normalmente, mostram lesões discretas ou não tenham lesões (Coetzer, 1994).

Não existem grandes diferenças na patogenia da infecção, quer por *M. bovis* como por *M. tuberculosis*, entre o homem e os bovinos (Wedlock *et al.*, 2002; Cosma *et al.*, 2003).

O *M. bovis* é tão patogénico para o Homem quanto o *M. tuberculosis*, determinando as mesmas formas clínicas e lesões patológicas (Abrahão, 1999).

A doença resultar da reactivação de focos dormentes (Hirsh e Zee, 1999).

A tuberculose extra pulmonar pode localizar-se na pleura, gânglios linfáticos, sistema genito-urinário, sistema nervoso central, intestinos, peritoneu, ossos, pericárdio e outros órgãos (MISAU-PNCT, 2003). As lesões que estas espécies micobacterianas produzem nos seres humanos e animais não podem ser diferenciadas mediante a observação morfológica ou histológica, pelo que o diagnóstico diferencial deve recorrer ao cultivo e aos métodos moleculares (Grange *et al.*, 1996; Collins, 2000; Montali *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004).

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, afectando linfonodos pré-auriculares, tonsilares e supraclaviculares, com

posterior envolvimento da pele sobrejacente. Tais lesões, são comumente conhecidas como "scrofulodermia" ou "lupus vulgaris" (Feldman *et al.*, 1999).

A localização óssea e articular também é comum nos casos extra-pulmonares, provocando lesões ósseas localizadas e artrite. Em crianças, é comum o envolvimento intestinal.

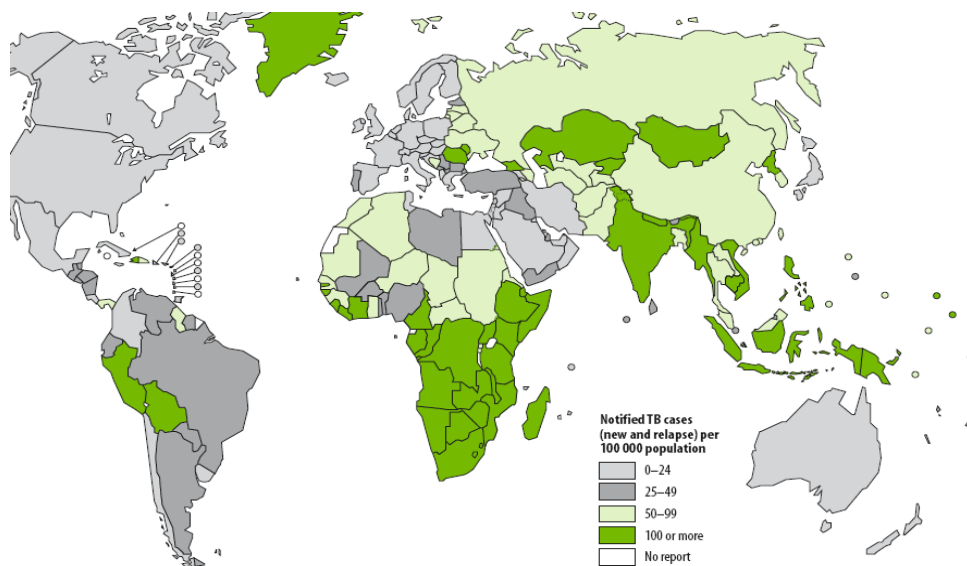
2.6. Epidemiologia da tuberculose humana

Com o desenvolvimento de cidades com elevada densidade de habitantes e muita pobreza, nos meados do século XVII, ocorreram epidemias de tuberculose na Europa do Leste e América do Norte, para onde os bacilos foram levados pelos emigrantes (Nunes, 2005).

Em África, a tuberculose chegou à zona costeira no início do século XIX, mas só penetrou no seu interior perto de 1910. Os africanos foram expostos à doença com a chegada dos europeus infectados por tuberculose e com doença activa, procurando a cura da sua doença nesta região com um clima mais ameno. Foi mais tarde, somente no início do século XX, que a epidemia começou neste continente.

A tuberculose constitui um grande problema de saúde Mundial com a maioria dos casos reportados nos países em desenvolvimento. Segundo o relatório da OMS de 2007, em 2005 foram registados cerca de 8.800.000 casos novos de TB e aproximadamente a 1.600.000 pessoas morreram entre elas 195.000 infectados por HIV. O número de casos de TB estabilizou ou decresceu em 5 das 6 regiões da OMS, porém cresceu em África onde a epidemia de TB é ainda favorecida pela disseminação do HIV.

Figura 1 - Incidência estimada da tuberculose Humana a nível mundial



Fonte: WHO, 2007

Mais de 80% dos doentes de TB do Mundo vivem na Africa subsahariana e na Ásia (WHO, 2006).

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectado por espécies do género *Mycobacterium* e que cerca de sessenta novas infecções ocorram em cada minuto, com a maioria das infecções ocorrendo na África a Sul do Sahara.

Segundo a OMS (2007), morrem em África cerca de 1500 pessoas por tuberculose todos os dias. Moçambique, apresenta incidência de 460/100.000 hab, muitas vezes superior aos 50/100.000 hab registados na Europa (WHO, 2006), e faz parte da lista dos 22 países denominados “High Burden Countries - HBC’s”. Estes países detêm cerca de 80% do número de novos casos estimados de tuberculose e são declarados prioritários por essa organização, para o combate a esta doença.

Tuberculose em Moçambique - Indicadores

População	19.424.000 habitantes
Incidência TB	447/100.000 habitantes
Prevalência anual	597/100.000 habitantes
Mortalidade anual	124/100.000 habitantes
Incidência HIV em pacientes TB adultos (15-49 anos)	50,0%
Casos previamente tratados com Resistencia aos MAT	3,4%

Fonte: WHO, 2007

A tuberculose tem sido muito relacionada com a pobreza, um factor que aumenta o risco de desenvolvimento de doença, e é ainda associada ao vírus do Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida - SIDA.

A SIDA é o factor de risco mais signficante para a progressão da tuberculose activa. Em Moçambique a prevalência de HIV, em casos incidentes de TB, é de 50%. Os países vizinhos também apresentam índices elevados de seroprevalência em doentes de TB: 60 e 68% na África do Sul e Zimbabwe respectivamente (WHO, 2006).

Segundo MISAU-PNCT (2003), cerca de 90% dos casos infectados por TB nunca desenvolvem doença a não ser que a imunidade esteja alterada como acontece com os doentes com HIV/SIDA.

2.7. A tuberculose bovina como zoonose

O *M. bovis* representa provavelmente o agente zoonótico mais importante na história da humanidade (Moda *et al.*, 1996; Abalos e Retamal, 2004).

A tuberculose bovina é uma zoonose clássica de evolução crónica e efeito debilitante causada pelo *M. bovis* cujo hospedeiro primário é o bovino. Entretanto, diversas espécies de mamíferos, incluindo o Homem, são também susceptíveis ao bacilo bovino (Gutiérrez *et al.*, 1997). Esta doença tem implicações quer na saúde pública quer sócio-económicas, uma vez que afecta o comércio internacional dos animais e seus produtos (Ayele *et al.*, 2004).

Antes de se adoptarem medidas efectivas de controlo, a tuberculose era uma das principais doenças do homem e dos animais domésticos (Coetzer *et al.*, 1994). Esta doença em humanos, continua uma das mais importantes doenças infecciosas notificáveis nos países em desenvolvimento.

Os casos de tuberculose em humanos são normalmente devidos ao *M. tuberculosis*, mas um número desconhecido de casos de TB deve-se ao *M. bovis*. Isto surge, principalmente, nos países com TBb endémica nos animais, onde ainda não existe um bom programa de eliminação da tuberculose animal, e nos quais a pasteurização do leite é raramente realizada. Actualmente muitos países africanos já aplicam medidas de controlo da TBb. Segundo a OIE (2007), 22 países africanos (incluindo Moçambique) fizeram prospecções da tuberculose bovina. Em 20 deles foi reportada a doença e outros dois a presença da infecção, embora sem sinais clínicos. Apenas cinco países não fizeram prospecção no último ano. Há 10 anos, apenas sete países africanos consideravam a tuberculose bovina como doença de notificação obrigatória (Cosivi *et al.*, 1998).

Abalos e Ratamal (2004), afirmam que a tuberculose pode ser considerada uma zoonose re-emergente dependendo das condições epidemiológicas de cada país, sendo que as regiões mais pobres, e onde se mantém um contacto estreito com os animais de consumo, são as que estão em risco de experimentar uma re-emergência.

Os *M. bovis* e *M. avium* afectam vários vertebrados abarcando animais domésticos e selvagens. Ocasionalmente, estes agentes zoonóticos são transmitidos aos seres humanos por consumo de produtos de origem animal, geralmente leite, não devidamente tratados (Pelczar *et al.*, 1993). A transmissão pode também ocorrer por contacto directo frequente com material animal contaminado (trabalhadores de matadouros e casas de matança).

Nos países em desenvolvimento, pouco é sabido sobre a frequência relativa com que o *M. bovis* causa tuberculose extra pulmonar no homem, devido às limitadas capacidades

laboratoriais para a cultura e tipificação do bacilo. Nas regiões em que a tuberculose bovina foi eliminada em grande escala, verificam-se somente alguns casos residuais de TB em idosos, como resultado de reactivação de lesões em dormência. Estes constituem menos de 1% de todos os casos de TB (Cosivi *et al.*, 1998).

Na maioria dos casos, a ocorrência frequente da transmissão entre os bovinos (e outros ruminantes) é o contacto entre o homem e estes animais que contribui para a disseminação e persistência do *M. bovis*.

A informação sobre a tuberculose humana causada por *M. bovis* é escassa, contudo, esta já foi reportada em alguns países.

A doença humana causada por *M. bovis* já foi confirmada em vários países de África, em França (Robert *et al.*, 1999), na Austrália e Inglaterra (Cousins *et al.*, 1999), na América Latina e Caraíbas.

No caso de África, numa investigação feita em dois centros de saúde no Egipto, as proporções de pacientes com baciloscopia TB-positiva infectados por *M. bovis* registados em 3 observações, foram de 0,4%, 6,4% e 5,4% (Elsabbon *et al.*, 1992). Num outro estudo no Egipto, de 20 pacientes com peritonite tuberculosa, seleccionados aleatoriamente, nove estavam infectados com *M. bovis* (Nafeh *et al.*, 1992).

No Zaire, o *M. bovis*, foi isolado de secreções gástricas em 2 de 5 pacientes com tuberculose extra-pulmonar. No mesmo estudo, a prevalência da doença no gado local era de aproximadamente 8% (Mposhy *et al.*, 1983, citados por Cosivi *et al.*, 1998)

Na Tanzânia, com base em provas bioquímicas, Kazwala *et al.* (2001) reportaram uma prevalência de 16% de casos de *M. bovis* em tratadores de gado. Num outro estudo, desenvolvido no mesmo país, 7 de 19 biopsias de gânglios linfáticos provenientes de pacientes com suspeita de tuberculose extra pulmonar estavam infectados por *M. tuberculosis* e 4 por *M. bovis*. Nos restantes casos, não houve crescimento em cultura. Embora o tamanho da amostra seja pequeno, a proporção elevada de *M. bovis* (36%) era um problema sério. Dois dos 4 pacientes com *M. bovis*, eram pastores de gado e um era agricultor.

Num estudo epidemiológico feito na Zâmbia, foi evidenciada a existência de associação entre gado reagente à tuberculina e a ocorrência de tuberculose humana. Famílias que reportaram 1 caso de TB nos 12 meses anteriores eram aproximadamente 7 vezes mais propensas a serem proprietárias de manadas tuberculina-positivas (odds ratio=7,6). Segundo Cosivi *et al.* (1998), apesar do facto se poder explicar pela transmissão zoonótica, outros factores como a sensibilidade cruzada à tuberculina no gado expostos a doentes de

TB assim como a coincidência de factores ambientais que favorecem tanto a doença clínica no Homem como a sensibilidade à tuberculina bovina devem ser tomados em consideração.

Cadmus *et al.* (2005), pelo método *Spoligotyping* reportaram na Nigéria o índice de 5,5% (3/55) de *M. bovis* em casos de TB humana. Num estudo desenvolvido entre os EUA e México, Weldlock e colaboradores (2004) reportaram 30% de casos de *M. bovis* em crianças com TB.

No Reino Unido, Guibson e colaboradores (2004), encontraram 1% (50/4800) de casos de TB causada por *M. bovis*.

Na Nova Zelândia, Baker e Collins (1999), encontraram 2,7% (54/1997) dos casos de TB de origem animal.

Na Argentina, dados de Latini *et al.* (1990), citados por Zumarraga *et al.* (1999), indicam que 2,4% dos casos de TB eram devidos a *M. bovis* sendo 64% dos casos referentes a magarefes e agricultores. O referido estudo foi feito com base na diferenciação bioquímica. Na Índia, país de alta incidência de TB, Mishra *et al.* (2005), com base em técnicas de PCR, concluíram que 16% (36/212) dos casos eram devidos ao *M. bovis*.

No geral, os índices de TB por *M. bovis* nas populações humanas são reduzidos, contudo, em grupos específicos como agricultores e magarefes e crianças, a proporção de casos de TB zoonótica é elevada.

Segundo Cosivi *et al.* (1998), existe uma correlação directa entre infecção por *M. bovis* no gado e ocorrência da doença na população humana.

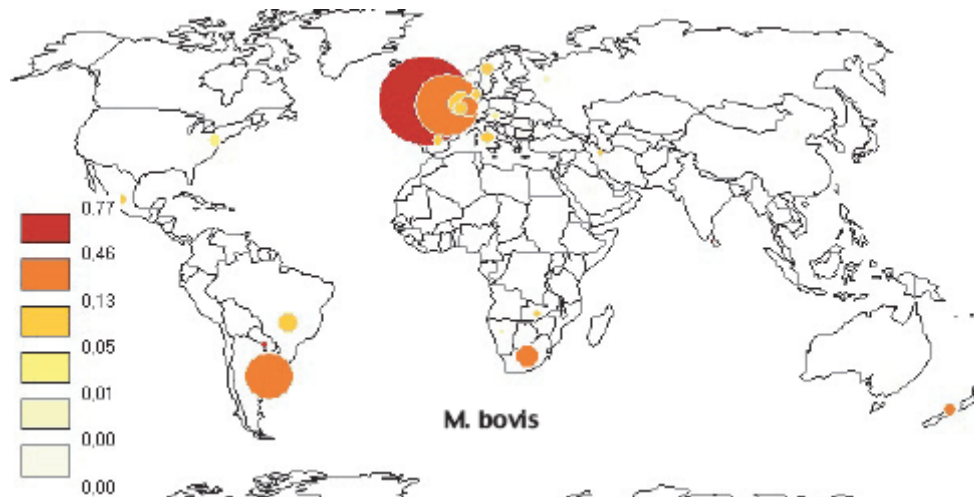
Segundo Haddad *et al.* (2004), o *M. bovis* é responsável por 5-10% de casos de tuberculose no homem, valores estes aproximados aos de Cosivi *et al.* (1998) para América latina, em que, 2 a 8% dos casos de TB Humana (pulmonar e extrapulmonar respectivamente) eram devidos ao *M. bovis*.

A transmissão de *M. tuberculosis* de Homem para o gado foi reportada por Ocepek *et al.* (2005), num estudo no qual, através de tipificação molecular dos isolados pela técnica IS6110-RFLP, se constatou que os isolados obtidos do gado tuberculoso e do trabalhador da fazenda afectada por tuberculose bovina no ano anterior, pertenciam à mesma estirpe.

O primeiro caso comprovado de transmissão homem-homem do *M. bovis* foi apresentado no Reino Unido por Smith *et al.* (1990), citados por Guibson *et al.* (2004) onde um indivíduo que teve contacto com animais, subsequentemente, transmitiu o bacilo à sua irmã sem história de contacto com gado. É importante referir que esta era diabética e em estado de gravidez, portanto, com certo grau de imunocomprometimento.

A nível da União Europeia, poucos são os países cujos sistemas de notificação discriminam a TB causada por *M. tuberculosis* e a causada por *M. bovis*. No ano de 2003, por exemplo, foram registados apenas 57 casos de TB por *M. bovis* em 10 Estados Membros (SANCO, 2005). Em Portugal, num estudo com doentes de TB, verificou que o *M. bovis* estava implicado em 3,7% dos casos (David *et al.*, 2005).

Figura 1 - Ocorrência de TB Humana causada por *M. bovis* no mundo



Fonte: Brudey *et al.* (2006)

A Figura 2 representa a distribuição geográfica de isolados de *M. bovis* em humanos. Contrariamente ao esperado, não estão representados muitos casos de *M. bovis* em África, zona que devido a aspectos culturais, é mais propensa a TB zoonótica pois o cenário foi desenhado com base em dados de estudos de Spoligotipagem. Em África, os muitos estudos feitos foram com base em provas bioquímicas ou outras abordagens de biologia molecular. Segundo Brudey *et al.* (2006) a superepresentação do *M. bovis* na Europa e América do sul na base de dados internacional, limita a interpretação global da epidemia mas também reflecte a importância da doença no gado na América do sul (Argentina e Brasil) e Europa.

Em muitos países desenvolvidos, foram tomadas medidas drásticas de controlo, permitindo a erradicação ou a diminuição da prevalência a níveis muito baixos *M. bovis* em ruminantes domésticos. Porém, em algumas dessas nações, a transmissão do agente para animais selvagens, tais como o texugo (*Meles meles*) no Reino Unido (Delahay *et al.*, 2002), e os marsupiais na Nova Zelândia (Morris *et al.*, 1994), induziu o surgimento de novos reservatórios selvagens, os quais representam um alto risco de transmissão do *M.*

bovis aos animais domésticos. Este fenómeno dificultou os esforços empreendidos, por estes países, durante anos, para o controlo de tuberculose.

O aumento da prevalência de *M. bovis* nos veados (*Cervus elaphus*) no Michigan, Estados Unidos da América (O'Brien *et al.*, 2002), e em javalis (*Sus scrofa*) em Espanha (Aranaz *et al.*, 1996; Serraino *et al.*, 1999), tornou-se uma grande ameaça para o gado bovino, nestas regiões. A França, que já tinha sido declarada “livre de tuberculose” pela Comissão Europeia, em 2001, reportou recentemente casos de tuberculose em veados, sendo ainda desconhecido o impacto epidemiológico da infecção (Boschioli, 2002).

Segundo Cosivi *et al.* (1998), em áreas onde coexistem a tuberculose humana e a bovina e são endémicas, é importante discriminar os casos de *M. bovis* dos casos de *M. tuberculosis* para a monitorização da disseminação do *M. bovis* para os humanos. Adicionalmente esta distinção tem impacto no tratamento da doença, uma vez que o *M. bovis* é naturalmente resistente à pirazinamida (Z). Assim, pessoas com TB causada por *M. bovis* não devem ser tratadas com este princípio activo.

2.8. Factores de risco da tuberculose zoonótica

Os factores de risco podem ser tratados em dois grupos: Os relacionados com a população humana e os relativos à população animal.

Na população humana

O contacto físico próximo entre humanos e animais potencialmente infectados que se verifica em algumas comunidades, especialmente nos países em desenvolvimento, é tido como um factor de risco de infecção para a população humana (Cosivi *et al.*, 1998). Em muitas comunidades rurais em Moçambique, o gado é parte integral da vida social das famílias.

Aproximadamente a 85% da população bovina e 82% da população humana de África vivem em áreas onde a tuberculose bovina não está efectivamente controlada (Cosivi *et al.*, 2001). Isto cria um grande problema de saúde pública, onde o risco de transmissão da doença é muito alto, e, por outro lado, produz grandes perdas económicas e desvalorização dos produtos de origem animal provenientes destes países no mercado interno e, sobretudo, internacional (Zumarraga *et al.*, 2000).

As práticas de higiene de alimentos, constituem factores importantes de risco. O consumo de leite contaminado por *M. bovis* é tido, desde há muitos anos, como o principal modo de transmissão da TB dos animais para o Homem. Em regiões onde a tuberculose bovina é comum e não controlada, a infecção via leite constitui a principal causa de linfadenopatia (scrofula) e outras formas de TB não pulmonar, tais como a abdominal. A adopção de práticas apropriadas de higiene dos alimentos pode constituir a acção principal no controlo desta forma de TB. Tais práticas são muitas vezes difíceis de implementar nos países em desenvolvimento (Cosivi *et al.*, 1998). O mesmo autor, fundamentando-se em dados de estudos sobre micobacterias no leite, em diversos países africanos, afirma que não devem ser subestimadas as implicações na saúde pública que representa o leite contaminado e seus derivados. Indiscutivelmente a ingestão de leite cru contaminado constitui uma das principais formas de infecção humana pelo bacilo bovino.

O risco para a saúde pública de contrair o agente pela ingestão de produtos cárneos contaminados torna-se menor, devido à baixa incidência do agente em tecidos musculares e, no caso de Moçambique, pelo facto de não haver hábito de consumir carne crua. Porém, tal risco não pode ser ignorado, se tivermos em conta que grande parte da carne consumida provém de abates caseiros ou clandestinos, verificando-se uma falta de rigor nos matadouros no tratamento do material biológico rejeitado pela inspecção.

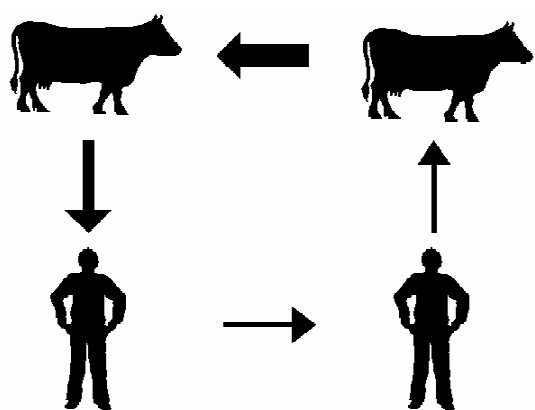
Trabalhos realizados na Nigéria incriminam a ingestão de carne contaminada como responsável por cerca de 45% dos casos de tuberculose causada pelo *M. bovis* em humanos (Cadmus *et al.*, 2006).

Na população animal

Pessoas com baciloscopia positiva (Bk+), com TB pulmonar devido a *M. bovis*, constituem um perigo potencial de transmissão do bacilo para os animais. O trato urogenital do homem é um dos locais de localização da TB extrapulmonar devido ao *M. bovis* (Ayele *et al.*, 2004).

Apesar de a TB urogenital ter pouca importância na epidemiologia da TB humana, constitui uma rota importante de infecção do homem para o animal. Grange e Yates (1994) afirmaram que tratadores de gado e pacientes com TB urinando na pastagem ou feno, podem representar fonte de infecção para os animais. A Figura 3 resume o ciclo de transmissão do *M. bovis* entre humanos e bovinos. A espessura das setas indica a probabilidade de ocorrência.

Figura 2 - Ciclo de transmissão do *M. bovis* entre humanos e bovinos



Adaptado de Grange e Yates (1994)

2.9. Micobactérias e HIV

Segundo Cosivi *et al.* (1998), em muitos países em desenvolvimento, a tuberculose constitui a mais frequente doença oportunista associada com a infecção por HIV, onde seroprevalências superiores a 60% têm sido encontradas em pacientes tuberculosos, em vários países Africanos.

A SIDA é o factor de risco mais significativo para a progressão da tuberculose activa. Em Moçambique, a prevalência de HIV em casos de TB é de 50% (WHO, 2007). Os países vizinhos também apresentam índices elevados: 60 e 68% na África do Sul e Zimbabwe, respectivamente.

A coexistência de TB com o SIDA, interagindo biologicamente de uma forma negativa, cria um duplo problema, aumentando a morbidade e mortalidade por TB e aumentando o risco de transmissão na comunidade.

Os doentes co-infectados TB/HIV morrem de TB, que é uma doença curável com terapêutica adequada em 85 a 95% destes doentes (Nunes, 2005). A infecção por HIV afecta profundamente o sistema imune: uma pessoa duplamente infectada com HIV e TB tem 100 vezes maior probabilidade de desenvolver TB activa do que a que não tem HIV (CDC, 1998).

Segundo Nunes (2005), nos HIV+, a tosse é menos frequente do que nos negativos, provavelmente, devido à diminuição dos sinais inflamatórios locais no parênquima pulmonar, diminuição de cavidades e da irritação endobrônquica. O mesmo se passa em relação às hemoptises, menos frequentes nestes pacientes, pois normalmente elas estão

relacionadas com necrose e lesão das artérias brônquicas dentro das cavidades. Esta situação implica também diminuição do número de bacilos expelidos e diferentes formas de apresentação radiológica, o que coloca problemas de diagnóstico difícil, principalmente em países de baixos recursos, aumentando a probabilidade de ocorrência de falso-negativos e consequentemente possibilitando a disseminação da doença.

A epidemia do HIV nos países em desenvolvimento, particularmente, onde a tuberculose bovina prevalece e as condições ambientais favorecem a transmissão zoonótica da tuberculose, constitui um problema sério de saúde pública (Ayele *et al.*, 2004).

2.10. Manifestação clínica da tuberculose

A tuberculose é uma doença tipicamente debilitante caracterizada por emaciação progressiva, perda de apetite, febre irregular ligeira e, ocasionalmente, sinais localizados, tais como aumento de tamanho do linfonodos, tosse e diarreia (Carter *et al.*, 1994; Coetzer *et al.*, 1994; Hirsh e Zee, 1999).

Em mais de 80% dos casos a TB afecta os pulmões, o que a torna mais importante, sob o ponto de vista de saúde pública, devido à sua transmissão por via aérea. Cerca de 90% dos casos infectados nunca desenvolvem a doença a não ser que a sua imunidade esteja muito debilitada como acontece nos doentes com HIV/SIDA, mal nutridos, diabéticos, alcoólicos, etc. A infecção tuberculosa na maioria dos casos não provoca sintomas e a única forma de saber que se está infectado é através do teste cutâneo de tuberculina (MISAU-PNCT, 2003).

Os bovinos são frequentemente infectados pelo *M. bovis* e a infecção centra-se no tracto respiratório e linfonodos adjacentes, e cavidades serosas. A disseminação hematogena ocorre com o envolvimento do fígado e dos rins. O útero serve de porta para a infecção do feto, uma característica virtualmente desconhecida noutros animais domésticos (Coetzer *et al.*, 1994; Hirsh e Zee, 1999). Os vitelos que sobrevivem desenvolvem lesões hepáticas e esplénicas. Segundo Hirsh e Zee (1999), a infecção do úbere é rara (<2% de casos), mas possui sérias implicações na saúde pública.

A tuberculose bovina é crónica e, muitas vezes, é uma doença sub-clínica. Geralmente, são necessários vários meses para se desenvolverem sinais clínicos. Muitas vezes a doença só é detectada através do teste de tuberculina (Coetzer *et al.*, 1994) ou quando se detecta as lesões características após o abate (Gracey *et al.*, 1999).

2.11. Diagnóstico

A grande variabilidade de sintomas e o carácter crónico da doença, fazem com que o diagnóstico clínico tenha um valor relativo, proporcionando apenas um diagnóstico presuntivo. Os testes para o diagnóstico da TB em vida, baseiam-se na deteção de infecções latentes pelo *Mycobacterium* sp., através de testes alérgicos, ou pela deteção do agente em secreções ou, ainda, em biopsias de tecidos, sendo os dois últimos métodos aplicáveis em humanos.

2.11.1. Tuberculinização

Nos Humanos, é, geralmente, usado o teste cutâneo de tuberculina denominado “Mantoux”. O teste é recomendado pela OMS. Segundo MISAU-PNCT (2003), o teste ajuda no diagnóstico da TB em crianças com idade inferior a cinco anos e que não têm a vacina de BCG. A reacção de tuberculina >10 mm é sugestiva de infecção tuberculosa. Em crianças vacinadas, uma reacção >14 mm pode significar doença activa. Contudo, muitas situações provocam reacção falsa negativa como é o caso de infecção concomitante com HIV, malnutrição, sarampo, varicela, TB miliar ou estado avançado de TB.

Em Moçambique, o teste de tuberculina não é indicado para o diagnóstico de TB em adultos.

Em Moçambique, para o diagnóstico em Humanos é usada a Tuberculina “2 TU PPD RT 23 com Twee 80” a 0,01% (MISAU-PNCT, 2003).

Os testes de tuberculinização têm sido utilizados para o diagnóstico da tuberculose em bovinos há muitos anos. Este teste avalia respostas de hipersensibilidade retardada 72 horas após injeção intradérmica da tuberculina PPD (derivado proteico modificado de *Mycobacterium*).

Actualmente, duas modalidades do teste são usadas: o teste intradérmico simples (que utiliza apenas a tuberculina bovina) e o teste intradérmico comparado (que usa a tuberculina bovina e a aviária). A tuberculinização comparada permite minimizar resultados falso positivos por reacções desencadeadas por micobactérias do complexo CMA, que não são patogénicas para os bovinos. Através deste teste, podem ocorrer reacções falso-negativas em diversas situações, tais como no caso de infecções recentes (até 50 dias de infecção) e até mesmo em casos de anergia decorrente de acometimento geral, no período de 42 a 60 dias entre testes.

A sensibilidade do teste de tuberculina varia de 68 a 85%, podendo ser menor em condições de campo, mesmo assim, o mesmo tem sido a base de diagnóstico em programas de controlo e erradicação da tuberculose bovina em muitos países, incluindo Moçambique.

2.11.2. Exame radiológico

A tuberculose é uma grande dissimuladora de outras doenças oportunistas pulmonares e, portanto, a radiologia é apenas um meio auxiliar de diagnóstico, para os Humanos.

William *et al.* (2004), referem que cerca de 10% a 20% dos casos de tuberculose pulmonar em doentes com HIV podem apresentar-se com radiologia normal, ou com alterações mínimas.

O diagnóstico radiológico é feito por RX do tórax. Em Moçambique, este é reservado para os casos de baciloscopia negativa (MISAU-PNCT, 2003).

2.11.3. Diagnóstico laboratorial

M. tuberculosis, faz parte do grupo de risco III, da classificação de risco da OMS (OMS, 2004), bem como da Directiva Europeia 2000/54/EC. Culturas vivas de *Mycobacterium* devem ser manipuladas sob nível de biossegurança 3 (BSL3). Os laboratórios de microbiologia classificam-se segundo os níveis de biossegurança que vão de 1 a 4, onde 4 corresponde ao mais alto nível de precaução em segurança biológica (OMS, 2004).

As medidas de precaução devem focalizar a prevenção de emissão de partículas de aerossóis, assim como a inoculação e ingestão accidental.

Tem sido prática comum nos trabalhos de biologia molecular, inactivar as micobactérias (através do calor) antes da manipulação do material genético fora de laboratórios BSL3 (Koivula, 2004).

Estudos têm revelado que o risco de adquirir a infecção é maior em trabalhadores de laboratório quando comparado ao da população em geral (Shah *et al.*, 2006). Este facto reforça a necessidade de inactivar completamente as bactérias antes da extração do ADN do microrganismo.

2.11.3.1. Exame directo

O método mais usado a nível de laboratório para o diagnóstico de casos de TB é o exame microscópico directo (Koivula, 2004 e WHO, 2006). Na sua maioria os casos de TB, a nível mundial, são diagnosticados por baciloscopia da expectoração.

O diagnóstico por baciloscopia é rápido, barato e um resultado positivo indica a capacidade de contágio do paciente, sendo por isso importante, pois detecta rapidamente os casos contagiosos para a comunidade (Nunes, 2005). A sensibilidade do método não é alta, uma vez que são necessários 5×10^3 a 10^4 bacilos por ml de expectoração para ser detectado à microscopia (Koivula, 2004). Segundo Siddiqui *et al.* (2003), a sensibilidade para esta técnica é de 50 a 60% nos laboratórios bem equipados, descendo este valor nos países com baixos recursos. Para a OMS, a sensibilidade do exame directo varia de 40 a 80% em diferentes condições de laboratório (WHO, 2006).

Nos casos de a tuberculose estar associada ao HIV, a taxa de detecção é mais baixa, porque grande parte destes casos é paucibacilar (Nunes, 2005).

A técnica de coloração mais usada para a baciloscopia é a de Ziehl-Neelsen.

Nos bovinos, o material é obtido a partir das lesões tecidulares, principalmente dos pulmões, fígado, baço, gânglios linfáticos (Coetzer *et al.*, 1994).

Os fluidos são concentrados por centrifugação em recipientes fortemente fechados. As amostras destinadas à microscopia são somente digeridas e desinfetadas com hipoclorito (clorox). Lâminas de sedimentos ou tecidos são coradas por uma coloração álcool-ácido resistente, auramina-rodamina onde a microscopia de fluorescência estiver presente (Hirsh e Zee, 1999). As lâminas podem ser coradas pelo método de Ziehl-Neelsen (Coetzer *et al.*, 1994).

Os resultados positivos devem ser confirmados pela cultura.

Estima-se que 20% dos cerca dos 8.000.000 de casos reportados anuais de TB no mundo sejam identificados como positivos à baciloscopia. As metas de 70% de taxa de detecção de casos e 85% de sucesso ao tratamento tornam-se difíceis de ser alcançadas só com o diagnóstico por microscopia (WHO, 2006). Para além disto, algumas vezes o método requer o exame de duas ou três amostras do mesmo paciente.

2.11.3.2. Isolamento e cultura

A identificação do *Mycobacterium* spp. é feita quase exclusivamente “in vitro”.

As micobactérias são aeróbias estritas, apresentam melhor crescimento em meios orgânicos complexos, tais como Lowstein-Jensen; meios contendo ácido oleico e albumina, tais como Middlebrook's 7H10 agar. São também usados para o isolamento, frequentemente em combinação com o meio Lowenstein-Jensen (Hirsh e Zee, 1999). Pode-se obter um rápido crescimento usando meios líquidos como o Middlebrook 7H12 onde o

crescimento do *M. tuberculosis* pode ser detectado dentro de uma ou duas semanas (Koivula, 2004).

Para a cultura de *M. bovis*, os meios de cultura mais usados, segundo Carter *et al.* (1994) são: Agar Lowenstein-Jensen (sem o glicerol, pois este inibe o crescimento de *M. bovis*); Agar Stonebrinks (com piruvato para favorecer o crescimento de *M. bovis*); Agar Middlebrook 7H11.

O glicerol favorece o crescimento de *M. tuberculosis* e *M. avium*, mas inibe o crescimento de *M. bovis* (Carter *et al.*, 1994; Hirsh e Zee, 1999; Koivula, 2004).

O tempo de geração dos bacilos tuberculosos varia de 12 horas em diante, e pode levar 7 a 8 semanas antes do aparecimento de colónias visíveis (Hirsh e Zee, 1999; MISAU-PNCT, 2003).

As espécies *M. bovis* e *M. tuberculosis* crescem a temperaturas que variam entre 33 °C a 39 °C, e o *M. avium* cresce entre 25 °C e 45 °C (Hirsh e Zee, 1999).

Em relação à cultura do *M. tuberculosis* na expectoração, este é o método mais eficaz com sensibilidade de 80%. Este método é mais dispendioso que o exame directo, necessitando de um laboratório melhor equipado e nem sempre disponível, principalmente em países de baixos recursos. Por outro lado, existe uma demora na resposta, que é obtida apenas ao fim de 6 a 8 semanas. Segundo Koivula (2004), em condições de cultura, em meio sólido, o *M. tuberculosis* necessita de 3 semanas para produzir colónias visíveis.

Um exame bacteriológico negativo em pacientes com TB pode ser resultado de casos de TB activa como é caso de tuberculose miliar, em doentes com HIV e na tuberculose primária em crianças e adolescentes (MISAU-PNCT, 2003).

A melhor sensibilidade observada no método de cultura, deve-se à necessidade de apenas 10 a 100 bacilos/ μ L na expectoração para haver crescimento (Siddiqui *et al.*, 2003).

2.11.3.3. Diferenciação fenotípica

A diferenciação das micobactérias do CMT e outras micobactérias pode ser feita por uso de alguns testes convencionais. A velocidade de crescimento pode ser um dos métodos de diferenciação – quando as bactérias mostram colónias visíveis em 7 dias de incubação, são identificadas como “rapid growers”, enquanto as “slow grower” são de crescimento lento e produzem colónias visíveis depois de 21 dias (Carter *et al.*, 1994 e Koivula, 2004).

Através das propriedades de pigmentação, após o crescimento na presença de luz ou no escuro, também se pode ter uma forte indicação se as micobactérias em causa pertencem ao MCT ou não (Koivula, 2004).

2.11.3.4. Provas bioquímicas

A combinação de quatro testes bioquímicos pode ser, adicionalmente, usada para a identificação definitiva do *M. tuberculosis* e diferencia-lo do *M. bovis*:

- Teste de produção de niacina (detecção de *M. tuberculosis*);
- Teste de redução de nitratos (detecção de *M. tuberculosis*);
- Susceptibilidade ao TCH -“Thiophen-2-carboxilic acid hydrazide” (*M. bovis* é inibido e *M. tuberculosis* cresce);
- Teste de produção de pirazinamidase (enzima ausente em *M. bovis*).

Segundo Carter *et al.* (1994), podem ser efectuados ainda os seguintes testes bioquímicos:

- Teste de produção de urease (detecção de *M. bovis* e *M. tuberculosis*);
- Teste de desaminação de pirazinamida a ácido pirazinóico em 4 dias (detecção de *M. tuberculosis* e *M. avium*);
- Crescimento em Agar Mac Conkey sem cristal violeta;
- Teste de tolerância a NaCl (detecção de *M. bovis*);
- Testes de inibição por TCH (detecta *M. bovis*).

O diagnóstico da tuberculose baseia-se em estudos bacteriológicos para detecção da micobactéria e seu isolamento. Simultaneamente, identifica-se o tipo de micobactéria e realizam-se os testes de sensibilidade aos MAT. A hierarquização destes testes depende do estudo que se pretende sobre a tuberculose e das possibilidades e recursos inerentes a cada país.

2.11.3.5. Testes de susceptibilidade aos medicamentos

Para determinar a susceptibilidade das estirpes do *M. tuberculosis* às drogas, as estirpes devem ser isoladas dos pacientes antes do início do tratamento. O resultado dá uma informação de valor para o tratamento do paciente.

Existem três métodos clássicos para a determinação da sensibilidade das micobactérias a drogas: o método de concentração absoluta, o método da razão de resistência (“resistance-ratio”) e o método de proporção em agar (Koivula, 2004). O método de proporção é o mais amplamente usado, este usa meios de cultura (sólidos ou líquidos) onde idênticas quantidades de isolado, em suspensão, são inoculadas num meio de controlo e meios

contendo drogas. Depois da incubação durante 4 semanas, é determinada a susceptibilidade.

Recentemente tem sido usado ainda o método BACTEC 12B, que é uma variante do método de proporção (Diguimbaye *et al.*, 2006) e outras novas técnicas colorimétricas que são técnicas de baixo custo (Koivula, 2004).

A resistência a um determinado medicamento é um processo selectivo por meio do qual os mutantes resistentes se impõem por eliminação das estirpes sensíveis (fenómeno da subida e descida).

A multi-resistência aos medicamentos da Tuberculose (TB-MR) é definida como a resistência a, pelo menos, dois dos principais medicamentos: Rifampicina e Isoniazida. (Nunes, 2005). Segundo Diguimbaye (2006), os testes de resistência a drogas, caracterização molecular e tipificação das micobacterias do CMT, têm-se tornado prática comum em muitos laboratórios de micobacteriologia. Segundo o mesmo autor, apesar do crescente número de casos de TB-MR devido a falhas no tratamento, falta um levantamento de dados sobre a resistência a drogas nos países com o problema, o que torna a monitorização difícil.

2.11.3.6. As técnicas de diferenciação molecular

Apesar de apresentarem algumas diferenças fenotípicas, os membros do CMT possuem um elevado grau de identidade genética. São ricos em sequências repetitivas, um factor que tem sido explorado para a tipificação molecular.

Devido à proximidade filogenética entre o *M. bovis* e o *M. tuberculosis*, o seu diagnóstico diferencial será mais preciso como uso de técnicas de tipificação molecular.

Até muito recentemente nenhuma das técnicas permitia uma diferenciação satisfatória das estirpes do complexo *M. tuberculosis* (Zumarraga *et al.*, 1999; Haddad *et al.*, 2004).

Durante os últimos 10 anos, o desenvolvimento de novas técnicas baseadas em biologia molecular, tem permitido a detenção mais fiável da tuberculose e o aumento da investigação da etiologia bem como da epidemiologia da doença (Borges *et al.*, 2004). O genoma de espécies de *Mycobacterium* patogénicas tem sido amplamente estudado, e as análises filogenéticas têm demonstrado que todas (excepto *M. avium*) pertencem a uma única espécie genética, o complexo *M. tuberculosis* (Haddad *et al.*, 2004).

O aumento no conhecimento sobre o genoma das micobactérias induziu à descoberta de marcadores moleculares que permitem a diferenciação de estirpes de *Mycobacterium* spp.

Segundo Haddad *et al.* (2004), com alta proximidade filogenética das estirpes, mesmo que a maioria dos marcadores tenha sido descoberta no *M. tuberculosis*, estes podem ser adaptados com sucesso para as outras micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, especialmente o *M. bovis*.

Diferenças nos locus DR (Direct Repeat) que são exploradas pela técnica *Spoligotyping*, e tipificação do ADN, tem sido aplicada também na diferenciação entre os membros do CMT. A principal característica do *M. bovis* é a ausência dos “*spacers*” 39 a 43 no perfil de Spoligotipagem (Kremer *et al.*, 1998).

Os marcadores mais usados, segundo Kamerbeek *et al.* (1997) e Haddad *et al.* (2004) são a sequência de inserção IS6110 da região DR, as sequências poli-GC (ricas em resíduos de guanina e citosina) e o número variável de repetições em tandem (VNTR).

Se os marcadores moleculares oferecem uma ampla perspectiva no campo da investigação, o polimorfismo e a estabilidade são características que devem ser tomadas em consideração para a escolha do marcador a usar num determinado estudo.

As técnicas moleculares auxiliam na determinação da origem de surtos (focos de doença), permitem compreender a relação entre diferentes surtos, mostram a relação entre os animais domésticos e selvagens na disseminação de agentes patogênicos (ex: *M. bovis*), e permitem identificar a(s) fonte(s) de infecção para o homem.

Por outro lado, técnicas moleculares permitem uma compreensão sobre a distribuição da doença nas populações, quando integradas com a epidemiologia convencional, no que se define, segundo Skuce e Neill (2001), como “epidemiologia molecular”. Estas técnicas têm sido usadas para a confirmação da transmissão suspeita por um estudo epidemiológico, detecção de uma transmissão que não tenha sido suspeita num estudo epidemiológico, identificação de factores de risco no ambiente onde ocorre a transmissão, detecção de erros laboratoriais e monitoria da eficácia dos programas de controlo da tuberculose.

Até recentemente, não era possível ainda traçar as rotas de transmissão da tuberculose dentro das populações (Murray e Nardell, 2002). A partir dos anos 90, com o aparecimento da tipificação molecular, muitas questões sobre a epidemiologia da tuberculose mantinham-se não resolvidas. Elas incluíam a contribuição relativa da reactivação e de doença primária em áreas de alta ou baixa prevalência, estudo dos factores de risco e ocorrência e frequência da reinfeção exógena. Os enfoques mais recentes incluem o impacto da co-infecção com HIV na transmissão, a infecciosidade da tuberculose com baciloscopia negativa e a transmissibilidade relativa de diferentes estirpes, bem como o potencial zoonótico da doença.

Para o *M. bovis* e tuberculose bovina, a epidemiologia molecular desempenha um papel chave no fornecimento de uma base de dados mais precisa em aspectos relacionados com a transmissão entre os bovinos e o papel dos reservatórios selvagens na manutenção e transmissão da doença. Por outro lado, as estirpes de *M. bovis* podem diferir nas propriedades biológicas tais como, virulência, transmissibilidade, estabilidade e variação antigénica, o que pode ajudar a explicar observações de campo (Skuce e Neill, 2001).

Os sistemas de tipificação, usando as técnicas moleculares, são geralmente usados na análise da dinâmica populacional, genética da população, evolução e patogénese, bem como no fornecimento um “valor adicional” para os estudos epidemiológicos e investigação de surtos.

Nicol *et al.* (2005), verificaram, com base em modelos animais, que a variante W-Beijing dos isolados era mais virulenta. Tal virulência tem sido atribuída a habilidade desta estirpe de produzir um glicolípido fenólico capaz de interferir com a imunidade do hospedeiro.

Segundo Borges *et al.* (2004), uma combinação apropriada da epidemiologia convencional e a genotipagem do *M. tuberculosis*, contribui para melhorar a compreensão da dinâmica da transmissão da doença.

Nos últimos 10 anos, muitas técnicas foram desenvolvidas ou adaptadas para a tipificação de isolados do complexo *M. tuberculosis*. Para a maioria delas está envolvida uma região genética específica e polimórfica (Haddad *et al.*, 2004).

O genoma das micobactérias é rico em sequências guanina-citocina (GC≈65%), e o seu polimorfismo é muito limitado comparado com o tamanho do seu genoma (4,4 Mb). Porém, algumas regiões são altamente polimórficas, quer pela variação em número e/ou posição e por uma variação na estrutura primária.

Estas áreas de grande polimorfismo correspondem aos segmentos de genes que codificam proteínas, onde a variabilidade fornece uma vantagem selectiva à bactéria, como, por exemplo, a resistência aos antibióticos, a produção de antígenos envolvidos na inibição da resposta imunitária, ou a síntese de sequências não codificadas envolvidas na indução de variações nas sequências adjacentes, tais como sequências de inserção ou sequências repetidas.

Várias técnicas para a diferenciação genética das micobactérias têm sido descritas nomeadamente:

a) IS6110- RFLP (Insertion Sequence – Restriction Fragment Length Analysis)

É a técnica usada para observação do polimorfismo na sequência de inserção IS6110, que é específica para os membros do complexo *M. tuberculosis*.

O que permite a distinção de estirpes, segundo Haddad *et al.* (2004) e Razanamparany *et al.* (2005), é a diferença na localização e no número de cópias desta sequência (IS6110).

Grande parte dos isolados de *M. bovis*, particularmente aqueles de origem em bovinos, possui uma ou poucas cópias de IS6110. Daí o protocolo IS6110-RFLP, geralmente aceite para o *M. tuberculosis* (Van Embden *et al.*, 1993), não é apropriado para o *M. bovis*, pois este apresenta poucas cópias da sequência de inserção IS6110, conseqüentemente, um baixo polimorfismo, daí que, para uma maior discriminação das estirpes, se sugere a utilização de técnicas baseadas na análise de outras regiões genéticas, tais como a região DR.

b) Número variável de repetições em tandem (“Variable Number of Tandem Repeats - VNTR”).

Nas micobactérias, regiões similares aos mini-satélites (locus com sequências curtas de 1-3 pb, altamente repetitivas) foram descritas por vários autores. Segundo Easterbrook *et al.* (2004) e Haddad *et al.* (2004), a maioria de VNTR's corresponde às chamadas unidades repetitivas micobacterianas (MIRU), que são mini-satélites (locus com sequências repetitivas com 10-100 pb) dispersos em 41 regiões ao longo do cromossoma bacteriano.

Os VNTR's devem ser amplificados, para a sua análise, usando diferentes pares de *primers* (um para cada VNTR). Para tal usam-se dois métodos para caracterizar o alelo de VNTR presente numa estirpe:

- O primeiro baseia-se na electroforese do produto amplificado correspondente a cada VNTR, para a determinação do número de repetições em cada locus (baseando-se no tamanho das bandas obtidas);

- O segundo baseia-se no uso dum analisador fluorescente baseado no ADN, acoplado a um computador. Este método permite a análise simultânea de múltiplos PCR's (Haddad *et al.*, 2004).

c) “Spacer oligonucleotide typing” (*Spoligotyping*, Spoligotipagem)

Uma variedade de técnicas de tipificação molecular para os isolados do Complexo *M. tuberculosis*, têm sido desenvolvidas com uso amplo da técnica IS6110, como a “gold standard”. Mais recentemente, o *Spoligotyping* tem mostrado vantagens relativas ao IS6110-RFLP, apresentando melhor relação custo-eficácia, facilidade de execução e dando

a possibilidade de comparação dos resultados obtidos entre laboratórios diferentes. A técnica IS6110-RFLP, necessita de programas informáticos especializados para a interpretação dos resultados, este é recomendado para estudos filogenéticos.

A técnica *Spoligotyping* baseia-se na deteção da presença ou ausência de alguma das 43 sequências espaçadoras (*spacers*) localizadas na região de repetição directa das micobactérias do CMT. Esta técnica é utilizada universalmente como uma ferramenta em investigação epidemiológica e desenvolvimento de programas de prevenção. Este procedimento é vantajoso em relação a outras técnicas moleculares pois permite rastrear e comparar rapidamente o genotipo com os existentes na base de dados internacional. A região DR é específica para as micobactérias do CMT (Van Embden *et al.*, 2000). O método *Spoligotyping* baseia-se no polimorfismo presente num locus cromossomal particular, denominado região "Direct Repeat" (DR), unicamente presente em bactérias do complexo *M. tuberculosis*. Este locus foi descrito pela primeira vez por Hermans (1991) citado por Kremer *et al.* (2002), que sequenciou esta região no *M. bovis* BCG, a estirpe usada universalmente para a produção de vacina contra a tuberculose. Segundo Milián-Suaso *et al.* (2002), a região DR, no *M. bovis* BCG consiste em sequências directamente repetidas de 36 pares de base, intercaladas por sequências de ADN não-repetitivas (*spacers*), cada uma das quais possui 35-41 pares de base (Kremer *et al.*, 2002; Haddad *et al.*, 2004). O número de cópias da sequência DR no *M. bovis* BCG é de 49 (Kremer *et al.*, 2002; Milián-Suaso *et al.*, 2002). Em outras espécies bacterianas do complexo *M. tuberculosis* o número de elementos DR varia significativamente (Kremer *et al.*, 2002). A maioria das estirpes do complexo *M. tuberculosis* contém um ou mais elementos de inserção IS6110 na região DR (Razanamparany *et al.*, 2005).

Ao contrário das sequências DR (nome que segundo Haddad *et al.* (2004), coincide com a designação de toda a região DR, que também incorpora os *spacers*) os diferentes *spacers* normalmente estão presentes apenas uma vez na região DR, embora ocasionalmente possam ser encontrados duas vezes, separados por apenas uma ou várias sequências DR e outros *spacers*. Uma região DR e seus *spacers* adjacentes são denominados "Direct Variant Repeat" (DVR).

Quando as regiões DR de várias estirpes foram comparadas, observou-se que a ordem dos *spacers* era quase a mesma em todas as estirpes, mas deleções e/ou inserções de *spacers* e de sequências DR podem ocorrer (Kremer *et al.*, 2002). O mecanismo pelo qual os *spacers* e as cópias das sequências DR são gerados é desconhecido. Com o método de *Spoligotyping*, pode-se detectar, a presença ou ausência na região DR de 43 *spacers* de

sequência conhecida (Kammerbeek *et al.*, 1997) (Figura 4). A hibridização do produto amplificado do ADN dos *spacers* é feita numa membrana que contém um conjunto de oligonucleótidos imobilizados, representando cada, sequências únicas de ADN de *spacer* (Kamerbeek *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 2002).

Através do método *Spoligotyping* pode-se detectar a presença ou ausência de *spacers* de uma determinada sequência no *M. bovis* e nas outras bactérias do complexo. A primeira etapa no método é a amplificação da região DR de uma dada estirpe através da técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (Serraino *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 2002; Roring *et al.*, 2004; Razanamparany *et al.*, 2005; Kazwala *et al.*, 2006). Os *primers* usados baseiam-se nas sequências de DR, e permitem a amplificação dos *spacers* localizados entre as regiões DR alvos. Uma das vantagens deste método é que necessita apenas de um par de *primers* a e b, específicos às duas extremidades das sequências DR, para amplificar todos os *spacers* presentes (Haddad *et al.*, 2004).

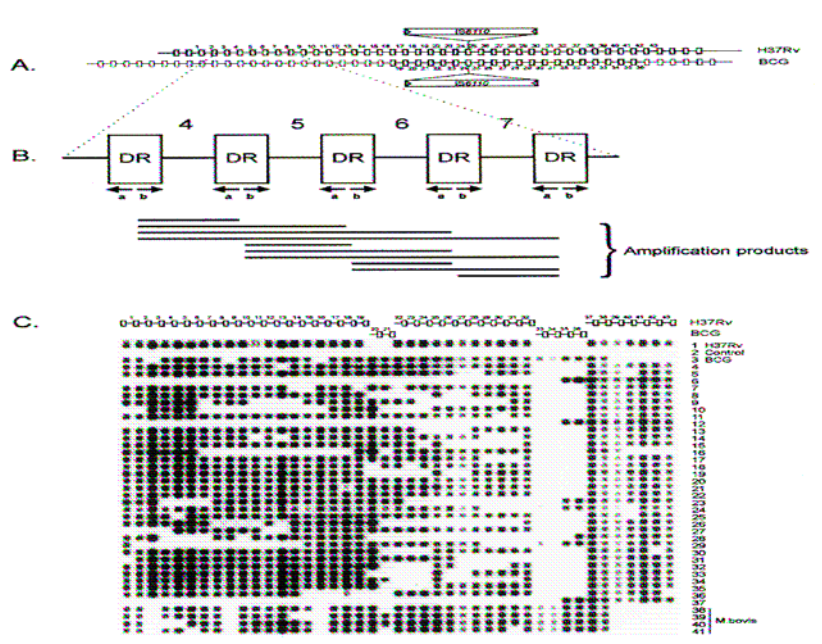
O produto de PCR obtido difere no comprimento por duas razões:

- Primeiro o produto contém vários *spacers* e as sequências DR estão entre estes se os *primers* ligam (por anelamento) as sequências DR não próximas uma da outra;
- Segundo, o produto de PCR por si só pode actuar como um *primer*, e tornar-se alongado com um ou mais DVR’s. Porém, o produto de PCR não fornece uma informação segura sobre a ordem dos *spacers* e sobre o comprimento total da região DR. Um *primer* reverso marcado com biotina é usado, de forma a permitir que todas as cadeias reversas que forem sintetizadas estejam marcadas com biotina (Kremer *et al.*, 2002).

Oligonucleótidos derivados de *spacers* conhecidos na região DR estão covalentemente ligados a uma membrana activada por biotina C em linhas paralelas.

Os produtos de PCR são hibridizados perpendicularmente às linhas onde se encontram os oligonucleótidos. Após a hibridização a membrana é incubada em streptavidina peroxidase, que se liga à biotina nos produtos de PCR. A detecção do sinal de hibridização é feita através do sistema de quimioluminescência (ECL). A peroxidase presente na streptavidina catalisa a reacção que resulta na emissão de luz, que pode ser detectada por autoradigrafia da membrana (Kramer *et al.*, 2002). A este processo denomina-se *reverse-line cross-blot technique* (Kamerbeek *et al.*, 1997).

Figura 3 - Princípio do método *Spoligotyping* - representação esquemática



- A. Sequências DR de duas estirpes de referência (*M. tuberculosis* H37RV e *M. bovis* BCG)
- B. Os números 4, 5, 6 e 7 representam os *spacers* ou espaçamentos entre as sequências DR
- C. Padrão de hibridização (Spoligotipo) de diferentes amostras

Fonte: Kamerbeek *et al.*, 1997

O *M. bovis* caracteriza-se pela ausência de *spacers* 39 a 43 (Kamerbeek *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 2002; Haddad *et al.*, 2004; Razanamparany *et al.*, 2005), e as suas estirpes são diferenciadas com base na localização, ausência (por deleção) e nalguns casos inserção de *spacers* e algumas sequências DR no seu genoma.

O método de *Spoligotyping* é o mais recomendado para estudos epidemiológicos, segundo Skuce e Neill (2001) e Haddad *et al.* (2004) e é a técnica mais usada (Gutierrez *et al.*, 1997). A principal vantagem do método *Spoligotyping* é a sua rapidez tanto na deteção do agente causal como no fornecimento de informação epidemiológica na identificação da estirpe em causa. Assim, o método pode ser útil na vigilância da transmissão da tuberculose e em intervenções de prevenção da disseminação da doença (Gori *et al.*, 2005). Esta técnica é considerada altamente efectiva para diferenciação de estirpes do CMT.

Por ser rápido, barato, altamente reproduzível, simples e com alta concordância. Este método também permite um fácil agrupamento e nomenclatura das estirpes; pode ser usado com baixas concentrações de ADN bacteriano ou com baixa qualidade de ADN; pode-se usar para ADN extraído de células mortas ou amostras patológicas (Haddad *et al.*, 2004). O método fornece ainda a possibilidade de comparar os resultados obtidos com os presentes em bases de dados internacionais (Mancilla *et al.*, 2006).

2.11.4. O custo das diferentes técnicas de diagnóstico das micobactérias

As técnicas de diagnóstico de micobactérias actualmente disponíveis, podem ser avaliadas em termos económicos. O Quadro 2 apresentado a seguir, adaptado de Berg *et al.* (2007) ilustra o custo e o equipamento necessário para cada técnica.

Tabela 1 - Custo estimado de diferentes técnicas de diagnóstico de micobactérias
Adaptado de Berg *et al.*, 2007

Técnica	Equipamento necessário	Custo de implementação	Custo/ amostra	OBS
Cultura e baciloscopia	Facilidades de BSC III Cabine de biosegurança	\$ 20.000	\$ 30	
PCR e tipificação de gene específico	Termociclador de PCR Electroforese em gel de agarose	\$ 5.000	\$ 6	Indica a presença ou ausência de um gene específico do CMT
Tipificação RFLP-IS6110	Termociclador de PCR Electroforese em gel de agarose Southern Blotting	\$ 5.000	\$ 5	Mais trabalhosa Necessita de purificação de grande quantidade de ADN Limitada para estudos de <i>M. bovis</i>
Spoligotyping	Termociclador de PCR Miniblotter Equipamento p/hibridização	\$ 10.000	\$ 4	Não precisa de purificação do ADN
Tipificação VNTR	Termociclador de PCR Electroforese em gel de poliacrilamida Analizador de gel	\$ 5.000	\$ 6/locus	É a mais discriminatória Exige <i>software</i> complexo para interpretação de resultados

2.12. Variantes genéticas do *M. tuberculosis*

A relação entre o perfil genético e a localização geográfica das variantes de *M. tuberculosis* tem sido descrita em vários estudos. A família Cameron (Cameron Family spoligotype) já foi descrita como endémica em Camarões e Nigéria (Cadmus *et al.*, 2006) e a sua existência no Chad (Diguimbaye *et al.*, 2006) não foi surpreendente, já que diariamente há movimentos transfronteiriços entre os habitantes daqueles países.

No Paquistão, Hasan e colaboradores (2006) revelaram que as variantes predominantes nos casos de tuberculose eram a CAS (Central Asian Strain) e o tipo Beijing, que é predominantemente asiático.

Na África do Sul, as variantes predominantes implicadas na tuberculose em crianças hospitalizadas eram as variantes LAM3 (Latin American and Mediterranean) e Beijing (Nicol *et al.*, 2005), enquanto que na Tanzânia, demonstrou-se, pela técnica *Spoligotyping*, que a extensiva epidemia de TB em Dar-es-Salaam, era causada por uma estirpe específica de *M. tuberculosis*, a CAS family (Eldholm *et al.*, 2006).

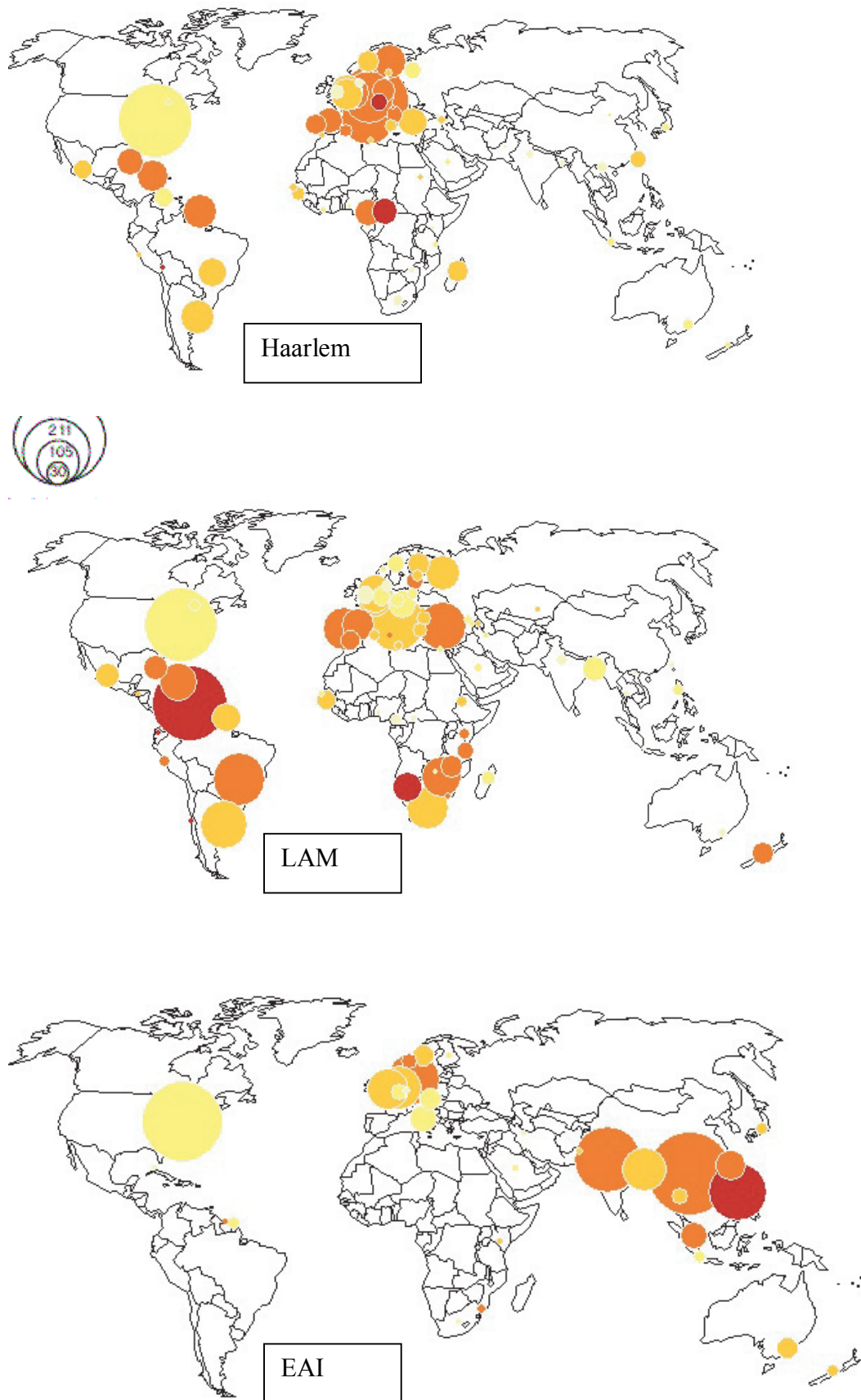
A Nível da Europa, predominam na Suécia as variantes Haarlem family (H), seguida de Beijing, LAM e EIA (East African-Indian). Verificou-se no referido estudo que mais de dois terços da população em estudo era estrangeira ou indivíduos refugiados (Brudey *et al.*, 2004). Na Espanha, os genótipos predominantes são coerentes com os identificados na Suécia e noutros países da europa: LAM, Haarlem family e T1 (De Viedma *et al.*, 2005). Contudo, foram identificadas duas novas famílias a que denominaram Madrid1 e Madrid2 que são específicas da Espanha.

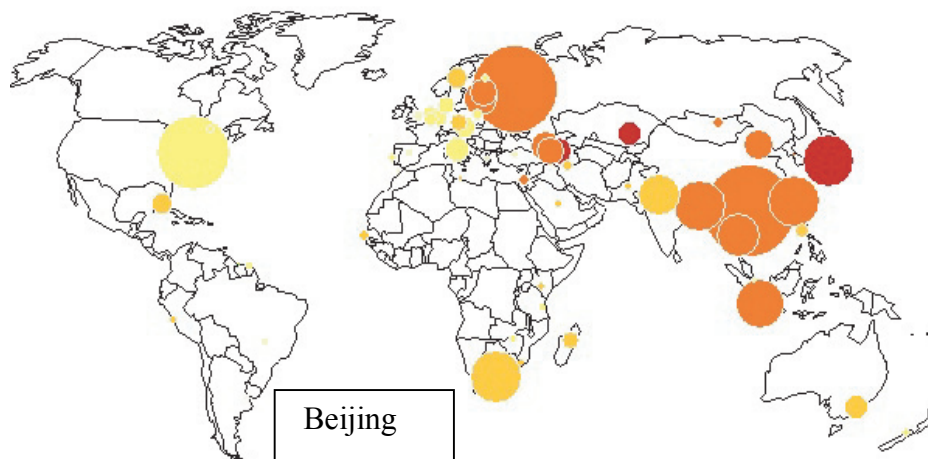
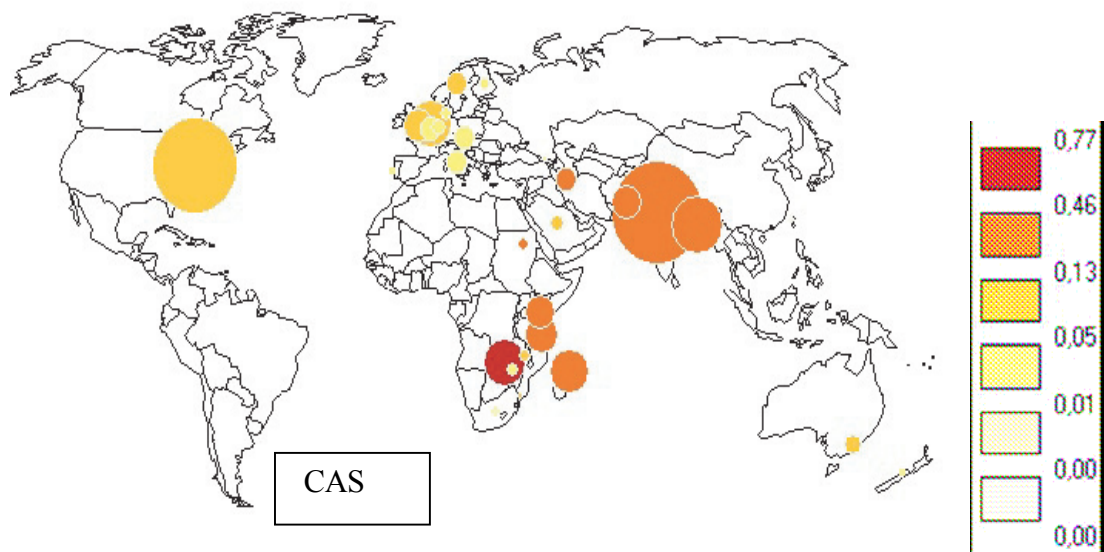
No Chile, os spoligotipos encontrados eram idênticos aos encontrados no Brasil e na Argentina (Mancilla *et al.*, 2006).

Segundo Nicol *et al.* (2005) a dominância de certa estirpe de *Mycobacterium* numa determinada região, pode ser devida a factores epidemiológicos ou históricos ou devido à virulência específica da estirpe na região.

A Figura 5, sintetiza a distribuição das famílias genéticas dentro dos países. O diâmetro absoluto da área está representado pelo diâmetro do círculo. As diferentes cores representam a frequência (em percentagem).

Figura 4 - Distribuição geográfica das estirpes de *M. tuberculosis* (Brudey *et al.*, 2006)





Como os mapas ilustram, nos países limítrofes de Moçambique, as linhas genéticas mais frequentes pertencem às famílias LAM (Latin American and Mediterranean) e CAS (Central Asia). Apesar de pouco frequente, a família Beijing também é encontrada entre os isolados da região. O genótipo Beijing tem um grande impacto na tuberculose epidémica na Ásia (Van Soolingen, 2001; Brudey, 2006). Segundo Puustinen *et al.* (2003), o genótipo Beijing tem uma elevada capacidade de disseminação dentro da comunidade. Este genótipo tem sido associado a surtos de TB em várias partes do mundo e é extremamente virulenta. Recentemente, esta família tem sido associada a vários surtos de TB nos Estados Unidos da América, Alemanha, África do Sul, Ilhas Canárias, Rússia e Estónia, e constitui o spoligotipo mais prevalente no mundo (Sola *et al.*, 2001).

O grau de polimorfismo genético numa população de isolados pode dar uma indicação sobre a ocorrência de transmissão *versus* reactivação da infecção (Skuce e Neil, 2001). No geral, polimorfismo limitado sugere transmissão em curso, enquanto que diversidade de estirpes sugere infecções latentes reactivadas.

Segundo Van Soolingen (2001), em áreas de baixa incidência como a Dinamarca, Noruega, Holanda e Nova Iorque, os padrões genéticos dos isolados de *M. tuberculosis* são altamente polimórficos. Este factor é influenciado por dois factores:

- a) Há uma reactivação endógena do bacilo e consequente reflexo dos genótipos presentes na população por longo período de tempo;
- b) Uma elevada proporção de casos, nestas áreas, corresponde a população não nativa, originária de diferentes zonas geográficas o que induz a introdução de estirpes “exóticas”, não conhecidas nessas áreas.

Por outro lado, em áreas de alta incidência da TB, como é o caso de África e Ásia, os padrões genéticos são geralmente pouco variáveis. Na Tunísia, por exemplo, 62% dos isolados de *M. tuberculosis* pertencem a 3 genótipos principais.

Em contraste ao defendido por Van Soolingen (2001), Nicol *et al.* (2005), encontraram grande diversidade de estirpes de *M. tuberculosis* em doentes de uma comunidade da Cidade do Cabo (África do Sul) onde a incidência de TB é alta.

2.13. Transmissão recente do *M. tuberculosis*

O uso da epidemiologia molecular para estudar a transmissão do *M. tuberculosis* é baseado no facto de estirpes derivadas de um ancestral comum exibirem o mesmo padrão de tipificação de ADN (Van Soolingen, 2001).

A epidemiologia molecular, através da tipificação do ADN, pode determinar a proporção de casos devido a infecção em curso e a relativa a reactivação de infecção endógena (Narayam, 2004; Brudey, 2004). No geral, transmissão recente é definida como propagação da infecção por micobactérias num intervalo de dois anos.

O termo “cluster” é usado para indicar isolados com idêntico ou com grande similaridade do padrão genético, e também os seus respectivos pacientes dos quais as estirpes comuns foram isoladas.

Uma importante ferramenta para o estudo da epidemiologia da tuberculose é base de dados internacional relativa a distribuição global dos spoligotipos, a SpolDB3 (Filliol *et al.*, 2002). Esta base de dados contém cerca de 12.000 padrões de vários isolados clínicos,

originários de mais de 90 países. A Base de Dados SpolDB3 está disponível para consulta no site <http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spoldb3>.

Recentemente, foi criada uma base dados, cuja última actualização foi feita em Setembro de 2005, a SpolDB4 (Brudey *et al.*, 2006), com registo de mais de 39.000 isolados registados de 122 países. Assim, é possível ter uma imagem clara da diversidade genómica e a relação entre as variantes. A base de dados SpolDB4 faz a discriminação até ao nível de sublinhagem que a estirpe pertence. Esta base de dados está disponível para consulta em: <http://pasteur-guadeloupe.fr/tb/spoldb4>.

A Figura 6 (Anexo II), mostra os dados bioinformáticos dos 50 padrões de MCT mais frequentes a nível mundial.

2.14. Tratamento e medidas de controlo

2.14.1. Terapêutica da tuberculose humana

A terapêutica de tuberculose em Moçambique é realizada, segundo previsto no Plano Nacional de Controlo da Tuberculose (PNCT), ao nível dos Centros de Saúde e é supervisionada directamente por pessoal treinado, de acordo com a estratégia DOTS. Os medicamentos são disponibilizados pelo Sistema Nacional de Saúde, que distribui também para o sector privado, não sendo permitido a sua venda em farmácias.

Segundo MISAU-PNCT (2003) e Gibson *et al.* (2004), os medicamentos anti-Tuberculose (MAT) são essencialmente uma combinação de 4 fármacos: Etambutol (E), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z) e Rifampicina (R).

Em Moçambique, a terapêutica de tuberculose em doentes seropositivos é idêntica à dos doentes com serologia negativa para o HIV: 2(RH)ZE/6(EH) nos casos novos, e nas recaídas, ou falências terapêuticas, 2S(RH)ZE/1(RH)ZE/5(RH)3E3. O tempo total de tratamento é de oito meses. Os pacientes que apresentam confirmação bacteriológica fazem o seu tratamento no respectivo Centro de Saúde do local de residência ou de trabalho. No controlo da eficácia do tratamento são solicitadas baciloscopias ao 2º ou 3º, 5º e 7º mês de tratamento. No caso de baciloscopias positivas ao terceiro e quinto mês de tratamento, havendo suspeita de resistência aos medicamentos da tuberculose, são solicitados os testes de sensibilidade para estes fármacos que são realizados no Laboratório Nacional de Referência de TB situado na região sul. As regiões norte e centro enviam as amostras por via aérea em condições de biosegurança (Nunes, 2005).

Enquanto que isolados pertencentes ao MCT, geralmente, são sensíveis a pirazinamida, o *M. bovis* é tipicamente resistente a este antibiótico (Koivula, 2004).

O tratamento da TB-MR é iniciado após os resultados dos testes de sensibilidade ou no caso de suspeita pela clínica ou baciloscopia.

Em Moçambique, é proibida a prescrição de regimes terapêuticos que não estejam contidos no PNCT e os medicamentos anti-TB são gratuitos (MISAU-PNCT, 2003).

A TB-MR cresce, paralelamente, ao desenvolvimento da pandemia do HIV/SIDA no mundo. A sua monitorização é um importante indicador da eficácia de um programa de controlo da tuberculose.

2.14.2. Controlo da tuberculose na população Humana

A Estratégia DOTS continua a ser a abordagem central no âmbito da TB em saúde pública (WHO, 2006). As medidas de controlo estão inseridas no plano global de controlo da tuberculose da OMS, seguido pelos países membros.

A identificação dos casos infecciosos é o primeiro passo é crucial para os programas de controlo da tuberculose universalmente. A deteção de tais casos é realizada pela deteção de baciloscopia positiva ao exame microscópico da expectoração. Esta continua a base de diagnóstico laboratorial desde a sua introdução no passado século, continuando a registarem-se muitos casos subdiagnosticados.

Segundo a OMS (2006), a estratégia global de controlo da TB-DOTS, é um pacote de cinco medidas que encerram o princípio chave de incrementar o uso dos regimes de tratamento standardizados, dispensados num ambiente de apoio assistencial amigável e atractivo para os doentes, com toma observada directamente, para maximizar a adesão e reduzir a resistência.

A efectiva implantação da estratégia DOTS está dependente de certos pilares estruturais e de difusão da chamada cultura DOTS entre os profissionais da saúde.

Os principais componentes técnicos da DOTS são: microscopia, tratamento curto, tratamento sob observação diária (TOD) e monitorização dos resultados. Segundo o relatório da OMS de 2002, Moçambique tem implementado estas componentes em todo o território. Porém, a pandemia de SIDA implica, por outro lado, que em alguns países de África, incluindo Moçambique, além da implementação da DOTS se proceda ao redesenho dos regimes de tratamento curativo e preventivo, assim como a criação de condições básicas para o desenvolvimento de investigação, pelo menos a operacional, baseada na análise do processo e resultados.

Segundo a OMS, para o controlo da TB num meio com alta prevalência de HIV, a estratégia DOTS deve ser complementada com actividades colaborativas TB/HIV, focalizando a redução da incidência da TB em pessoas que vivem com HIV/SIDA (WHO 2006-b). Como uma estratégia específica nos países em situação grave, a par da expansão da DOTS, é imperativo desenvolver esforços para enfrentar prioritariamente alguns desafios específicos, para os quais os conhecimentos da epidemiologia clássica não dão respostas claras, pressupondo a criação de condições logísticas para a investigação operacional, em exercício da assistência, e para estudos controlados e de epidemiologia molecular, para a investigação da recorrência e resistência. Os desafios específicos referidos são:

- a) Redução da elevada mortalidade por TB/SIDA;
- b) Redução das taxas de casos recorrentes da TB;
- c) Protecção das pessoas HIV+ pelo risco acrescido de desenvolver TB activa;
- d) Criação de formas inovadoras para a descentralização dos cuidados à TB.

Em Moçambique os grupos prioritários (considerados de alto risco) para os quais se deve estar sensibilizado para o despiste precoce da TB, segundo o MISAU-PNCT (2003) são:

- Clientes do GATV que sejam HIV+;
- Portadores de ITS (Infecções de Transmissão Sexual);
- Mineiros;
- Refugiados;
- Contactos de doentes com BK+ em especial crianças com menos de 5 anos de idade.

Constituem condicionalismos ao sucesso do PNCT e a influência da estratégia da OMS:

- O elevado crescimento anual da população (como é o caso da população de Moçambique);
- A concentração populacional nos subúrbios das grandes cidades;
- Deficiências nos meios de telecomunicação básicos;
- O fraco compromisso dos governos em relação à saúde (em Moçambique, a despesa de saúde é 2,8% do PIB).

Estão bem documentadas as relações entre a pobreza e a TB: maior risco de infecção; maior risco de desenvolvimento de TB activa; menor oportunidade de diagnóstico e tratamento oportunos. A fome, a guerra, o crescimento populacional e as deslocações em massa de refugiados são factores de insucesso da luta contra a tuberculose que atingem

várias áreas do globo, afectando drasticamente o acesso ao tratamento completo, ao diagnóstico radiológico e bacteriológico (WHO, 2000).

Até 2020, se a luta contra a tuberculose não for reforçada, haverá cerca de 1.000 milhões de novas infecções, 150 milhões de casos novos, com 36 milhões de mortes. Setenta por cento destes casos surgirão nos grupos etários entre 15 e 59 anos, que são os economicamente mais produtivos (WHO, 2006).

Actualmente, o programa de controlo da TB não considera a possibilidade de transmissão zoonótica da doença.

2.14.3. Controlo da tuberculose nas populações de bovinos

Desde o princípio do século XX, conhecendo a dimensão do problema e sua importância para a saúde pública, vários países iniciaram programas de controlo da tuberculose, beneficiando enormemente os consumidores de produtos de origem animal, programas esses alicerçados na introdução de rotinas de inspecção de carnes, pasteurização do leite e medidas de controlo da doença nas populações animais. A tuberculinização e o sacrifício dos reactivos positivos têm sido a base para os programas de controlo ou erradicação da doença nos bovinos, uma vez que a tuberculose nos animais não deve ser alvo de tratamento.

Em Moçambique, a situação da TBb é pouco clara, já que não existe uma estratégia clara de controlo a nível nacional. O teste de tuberculina não é feito de maneira sistemática. A nível de inspecção de carnes, os casos de TBb detectados são rejeitados, o que não é provável acontecer quando o abate é feito fora do circuito legal de comercialização. Situação similar tem-se verificado em muitos países em desenvolvimento (Cosivi, 1998; Cadmus *et al.*, 2006). A baixa sensibilidade da inspecção de rotina na identificação de casos de TBb (29%), já foi demonstrada (Teklo *et al.*, 2004)

Segundo a Direcção Nacional de Pecuária (DINAP), em 2004, apesar dos altos índices de reactivos a tuberculina encontrados (8,7%), apenas uma província se referiu ao abate como destino dos positivos. As restantes províncias não dão a conhecer o destino dos animais positivos DINAP (2005).

Segundo Cosivi *et al.* (1998), nos países em desenvolvimento as medidas de controlo em alguns casos não são aplicadas, noutros são aplicadas de forma esporádica, e a pasteurização é raramente praticada. Os fracassos no controlo da doença podem ser explicados por falhas na eficiência de diagnóstico das provas aplicadas, por existência de

fontes incontroláveis de infecção ou por problemas relacionados com o manejo dos animais infectados.

A nível da União Europeia, alguns países erradicaram a doença nos animais (Dinamarca, Holanda e Luxemburgo), alguns países reduziram a prevalência a níveis extremamente baixos (Alemanha, Bélgica, Inglaterra, França Grécia e Portugal) e noutros, a doença ainda não está suficientemente controlada tais como Itália e Espanha. Um dos pilares para o sucesso daqueles programas foi o empenho que esses países tiveram no saneamento das manadas (Neto e Bernardi, 2003).

É oportuno lembrar que controlo significa limitar a doença de tal forma que sua incidência diminua consideravelmente e haja condições para evitar a sua disseminação caso apareça um novo foco, fazendo com que deixe de representar um risco económico ou de saúde pública. O controlo é indicado para regiões nas quais seria inviável a realização da erradicação como medida inicial, por ser uma doença endémica e altamente disseminada.

Em muitos países desenvolvidos, onde através de medidas drásticas de controlo se conseguiu erradicação a total, ou quase total, de *M. bovis* em ruminantes domésticos, este problema ressurgiu com o aparecimento da fauna selvática como reservatório (Delahay *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 1994).

Actualmente, os programas de controlo da tuberculose são desenvolvidos de forma paralela, sem, no entanto, apresentarem os dois programas (da tuberculose humana e da tuberculose bovina), aspectos em comum.

As operações de saneamento basearam-se no diagnóstico da doença através tuberculinização caudal, ou na tábua do pescoço, sacrifício dos reagentes e indemnização dos criadores. As carcaças dos animais abatidos devem ser examinadas para a confirmação da doença (inspecção sanitária) e nas explorações deve ser feita uma limpeza e uma rigorosa desinfecção.

Um programa eficaz deve ser realista e sustentável ao longo do tempo para evitar ser interrompido por falta de recursos e por ser considerado ineficaz. Muitas vezes, o fracasso é atribuído às altas indemnizações e à não fixação de um prazo para o criador sanear a propriedade.

A experiência de vários países no combate à tuberculose bovina mostra que níveis bastante bons de controlo podem ser alcançados em aproximadamente 20 anos, e os programas poderiam ser divididos em duas fases. Uma fase inicial, com o objectivo de controlo, e na última fase, a erradicação (Neto e Bernardi, 2003).

Factores como existência de serviços veterinários organizados e a disponibilidade de recursos financeiros são alguns dos que facilitam ou dificultam as acções de controlo, não só da tuberculose bovina, mas de várias as doenças importantes nos animais de interesse económico.

Segundo Abalos e Retamai (2004), as estratégias actualmente reconhecidas para o controlo da enfermidade, terão êxito sempre que exista compromisso político dos Governos, dando prioridade ao enfoque integral da doença, com coordenação estreita dos serviços de saúde e de saúde animal. Esforço conjunto dos sistemas de saúde pública e sanidade animal, no melhoramento do diagnóstico e desenvolvimento de vacinas mais eficazes para a prevenção da infecção são estratégias importantes para o controlo da enfermidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo (localização e dados gerais)

O Anexo III apresenta um mapa de Moçambique com as duas áreas de estudo, os distritos de Buzi e da Manhiça.

3.1.1. Distrito de Búzi

O distrito de Búzi está localizado a sudeste da Província de Sofala, sendo limitado a Norte pelos distritos de Nhamatanda e Dondo, a Oeste os distritos de Chibabava e Gondola (Manica) e a Este pelo Oceano Índico.

Dados do MAE (2005) sobre o distrito indicam que:

- Tem uma superfície de 7329 Km² e uma população recenseada em 1997 de 143.123 habitantes estimada à data de 1 de Janeiro de 2005 em cerca de 179.000 habitantes;
- A população é jovem (45%, abaixo dos 15 anos de idade), maioritariamente feminina (taxa de masculinidade 47%) e de matriz rural (taxa de urbanização de 10%);
- O clima é do tipo tropical húmido com savana ao longo da faixa costeira, observando-se duas estações, a chuvosa e a seca;

- A principal actividade económica é a agricultura do tipo familiar. Os principais produtos são o algodão, o gergelim e a cana-de-açúcar;

- O distrito apresenta uma taxa de escolarização baixa, com 3/4 da população analfabeta.

As principais doenças são, a malária, doenças de transmissão sexual, doenças diarreicas, tuberculose e HIV/SIDA;

- O distrito possui um efectivo bovino de 4000 cabeças (ano de 2005), sendo 45% destes pertencentes ao sector familiar. A tuberculose bovina é uma das maiores preocupações neste distrito;

Segundo DINAP (2004), O distrito de Búzi, apresenta tradição de criação de gado, e é tido como um dos mais problemáticos, apresentando a prevalência animal de tuberculose no gado na ordem dos 8%. Dados sobre as tuberculinizações de 2004, naquele distrito, indicam que a doença está presente tanto no sector privado como no familiar, afectando, no primeiro caso, todas as manadas testadas e apresentando o sector familiar mais de 60% de manadas afectadas. A província de Sofala, apresenta igualmente a taxa de 8,6% de prevalência nos animais (DINAP, 2005).

No passado existiu a Companhia do Búzi, uma grande companhia açucareira que também se dedicava a pecuária em grande escala. Segundo Morgado (2004), a antiga Companhia do Buzi, S.A.R.L. (mais tarde empresa Estatal do Buzi), uma das grandes unidades de produção de gado de carne, em Sofala, chegou a ter um efectivo de 12.000 cabeças, onde a prevalência de tuberculose sempre foi elevada. Pensa-se que a tuberculose tenha sido aí introduzida por esta companhia pela importação de gado de Madagascar.

3.1.2. Distrito da Manhiça

O distrito da Manhiça localiza-se na parte norte da província de Maputo, a 80 Km da Cidade de Maputo, a que está ligado pela Estrada Nacional no 1. É limitado a Norte pelo distrito da Macia (Província de Gaza), a Sul pelo distrito de Marracuene, a Oeste pelos distritos de Moamba e de Maputo e a Este é banhado pelo Oceano Índico.

Dados do MAE (2005) sobre a Manhiça indicam que:

- Tem uma superfície de 2373 Km² e uma população de 130.351 habitantes (censo de 1997) e estimada a 1/1/2005 em cerca de 192.638 habitantes;
- A população é jovem (41% abaixo dos 15 anos de idade), maioritariamente feminina (59%) e de matriz rural (taxa de urbanização de 12%);
- O clima é tropical húmido no litoral e tropical seco no interior. Predominam 2 estações: a quente e de elevada pluviosidade - de Outubro a Abril; e a fresca e seca - de Abril a Setembro;
- A principal actividade económica é a agricultura do tipo familiar. Os principais produtos são o amendoim, o feijão, a mandioca e o arroz; o sector privado dedica-se a produção de cana-de-açúcar;
- O distrito apresenta uma taxa de escolarização baixa, com 58% da população analfabeta;
- As principais doenças são, a malária, doenças de transmissão sexual, doenças diarreicas, tuberculose e HIV/SIDA.

Na Manhiça, apesar da tuberculose bovina estar presente, a prevalência é baixa, com índices de 0,7% (DDADRM, 2003; SPP, 2006). São raros os trabalhos feitos neste distrito sobre a TBb.

Tanto no distrito de Buzi, como no de Manhiça, a população, em geral, não tem o hábito de consumir leite nem lacticínios. O movimento migratório para trabalho nas minas de ouro na África do Sul é comum nos dois distritos, sendo mais pronunciado na Manhiça.

A Tabela 3, resume a situação da TBb nos dois distritos em estudo. É notória a diferença na prevalência de animais infectados nos dois distritos.

Tabela 3 -Prevalência estimada da tuberculose bovina nos distritos de Buzi e Manhiça

Distrito	Efectivo (cabeças)	Prevalência TBb (%)
Manhiça	4 000	0,7 ¹
Buzi	12 318	8,5 ²

Fonte:; ¹DDADRM, 2003; ²DINAP, 2005

3.2. Tipo de estudo e amostragem

O estudo desenvolvido foi do tipo observacional e tem como objecto os casos de TB na população Humana em 2 distritos de Moçambique. O distrito de Buzi (na zona centro) e o da Manhiça (no sul).

O estudo envolve isolados obtidos da expectoração de doentes com baciloscopia positiva (BK+) de acordo com o método Ziehl-Nielsen. As amostras foram submetidas a cultura nos meios Lowestein-Jensen e Stonebrinks para posterior tipificação molecular.

Local de estudo foi o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (UEM) e o Centro de Investigação em Saúde da Manhiça (CISM).

3.3. Amostras

As amostras eram constituídas por culturas de micobactérias, provenientes do Buzi, que foram fornecidas de um banco de isolados, cultivados no meio Löwenstein-Jensen, pelo Laboratório Nacional de Referência da Tuberculose. No caso da Manhiça, parte das amostras eram constituídas por culturas (no meio Stonebrinks), e outra parte por amostras clínicas (expectoração) de doentes BK+, previamente colhidas e conservadas a -70 °C. Neste caso, os isolados foram fornecidos pelo CISM.

Foram incluídas no estudo 123 amostras (100 culturas em agar e 23 expectoração) provenientes dos hospitais rurais de Buzi e Manhiça.

Foi extraído com sucesso ADN em 80 e tipificadas com sucesso 79 (38 referentes ao Buzi e 41 da Manhiça) das 123 amostras.

3.4. Processamento das amostras e técnicas laboratoriais

3.4.1. Extração do ADN genómico bacteriano

A extração do ADN de micobactérias realizou-se pelo método CTAB, com base no protocolo descrito anteriormente por Isogen Bioscience B.V. (2006).

De maneira resumida: as bactérias foram inactivadas pelo calor (80 °C em 20 minutos), e lisadas num tampão contendo lisozima, Proteinase K e SDS seguido de uma extração orgânica, precipitação e lavagem com etanol. O precipitado foi ressuscitado no tampão TE (1x) e armazenado a -20 °C. A extração do ADN foi feita no CISM (BSL-3) e as posteriores etapas no Centro de Biotecnologia-UEM. O produto de extração (*pellet*) foi transportado em alicotas bem identificadas e acondicionado em caixas isotérmicas contendo gelo.

3.4.2. Amplificação do ADN

O ADN recuperado foi submetido a PCR para amplificação da região DR do *Mycobacterium*. Para o efeito foram usados 2 “*primers* específicos” dos locus: DRa (que contém biotina) e DRb, segundo o previamente descrito por Kamerbeek *et al.* (1997), Zumaranga *et al.* (1999) e Kremer *et al.* (2002). Como controlo positivo foram usados as estirpes de referência de *M. tuberculosis* H37RV e *M. bovis* BCG P3 (ISOGEN, <http://www.isogen.nl>). Para controlo negativo foi usada água destilada esterilizada. Reacção positiva ao PCR era obtida correndo 5 microlitros do produto de extração em gel de agarose 1,5%.

3.4.3. Tipificação

Segundo as instruções do fornecedor, 10 ng de ADN genómico purificado eram necessários para a Spoligotipagem. Os produtos foram capturados por hibridização em linha reversa sobre a membrana de Nylon. Os produtos de PCR biotinizados, foram hibridizados numa spoligomembrana (Pall Biosupport, Portsmouth, United Kingdom) contendo oligonucleotidos sintéticos das regiões DR do *M. tuberculosis* H37RV e *M. bovis* BCG. Foram covalentemente ligadas usando a streptavidin-peroxidase (Isogen Bioscience) como conjugado. A detenção da hibridização foi feita com o ECL (Enhanced Chemoluminescence Liquid), seguida pela revelação em placa de Raio-X (Hyperfilm ECL, Amersham) num processo fotoquímico tradicional.

3.5. Dados epidemiológicos

Os dados sobre os indivíduos em estudo foram colhidos previamente pelos Laboratórios de Referência, numa ficha que incluía: idade, sexo, a ocupação, hábitos alimentares, dados sobre viagens recentes e resultados do teste de sensibilidade, estatuto HIV (com a concordância do doente) (Anexo IV).

3.6. Análise de dados

Os resultados da Spoligotipagem foram introduzidos numa folha de cálculos (Microsoft Excel) no formato binário e comparados a base de dados internacional SpolDB4 (disponível no sítio <http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spolddb4>).

A análise de dados foi baseada na descrição dos diferentes padrões de banda encontrados e no cálculo das proporções dos diferentes padrões encontrados.

Para o presente estudo, definiu-se como *cluster*, o grupo de estirpes pertencentes à mesma família mãe e com 100% de homologia no perfil de spoligotipo.

A taxa de transmissão recente (rate of recent transmission) foi calculada pela fórmula:

$$[T(c) - N(c)] / T(a),$$

onde T(c) é o número total de isolados agrupados, N(c) é o número de aglomerados, e T(a) o número total de isolados, segundo o preconizado por Small *et al.* (1994), citados por Brudey *et al.* (2004).

3.7. Considerações éticas

Durante a etapa preliminar ao estudo, na parte que envolveu contacto directo com o doente, foram respeitadas as normas éticas recomendadas, nomeadamente: a todos os doentes foi explicado o objectivo do trabalho, que se inseria na rotina de atendimento e tratamento padronizado da tuberculose.

Não houve qualquer alteração nos esquemas de tratamento estabelecidos, não se tratando de estudo do tipo ensaio terapêutico.

Foram realizados exames laboratoriais adicionais à rotina de investigação usual para estes casos, dos quais poderão resultar riscos mínimos de efeitos colaterais. Estes efeitos colaterais foram explicados a cada paciente, ao mesmo tempo que era solicitado o seu consentimento livre e esclarecido, conforme o estabelecido pela Convenção de Helsinque de 2000. Foi respeitada a confidencialidade dos dados dos pacientes.

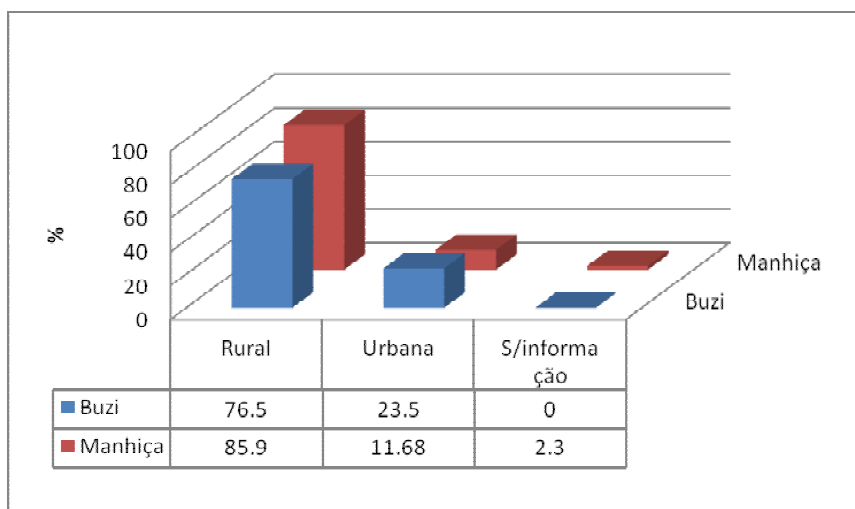
4. RESULTADOS

4.1. Perfil demográfico da população em estudo

O perfil etário dos doentes foi o de uma população adulta variando dos 14 aos 75 anos de idade nas duas regiões.

Em relação à origem das amostras, o Gráfico 1, mostra que mais de 70% dos doentes em estudo provinham de zonas rurais.

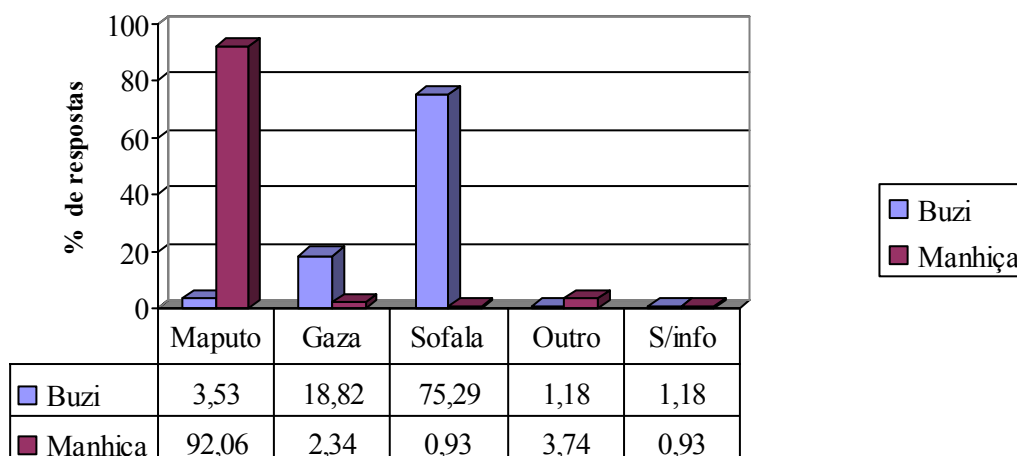
Gráfico 1 - Origem das amostras



O nível educacional desta população é baixo, sendo que no distrito de Buzi, 94% dos doentes era analfabeto ou tinha apenas o nível primário. Na Manhiça 89% não tem o nível secundário.

O movimento populacional apresenta alguma diferença nas duas regiões. Enquanto que na Manhiça, a população tem movimentos quase restritos, a população de Buzi é mais migratória (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Padrão do movimento populacional da população estudada

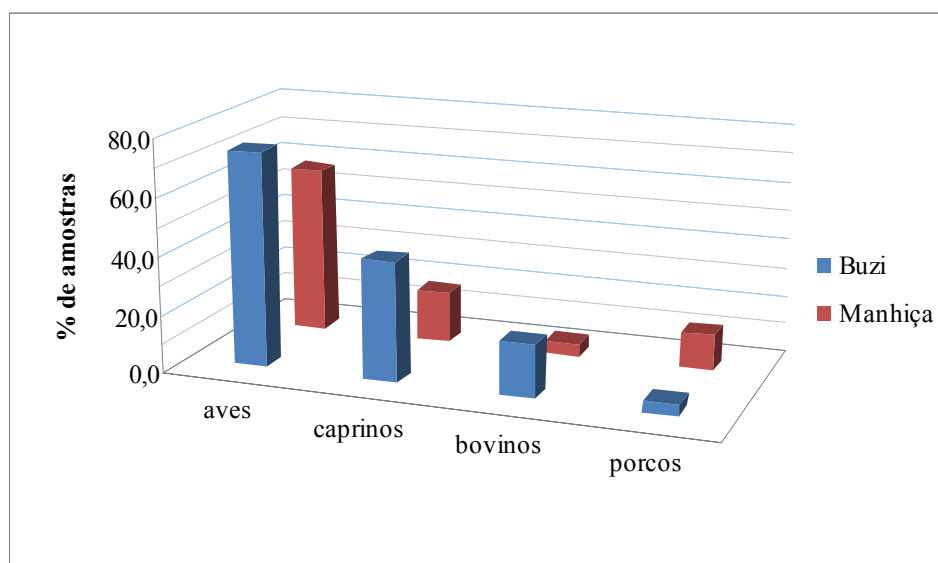


No Gráfico 2, observa-se o padrão de movimentos efectuado pelos entrevistados nos últimos dois anos. Verifica-se que no grupo dos doentes da Manhiça (representados pela cor vermelha) os movimentos eram quase limitados dentro da mesma província. No Buzi, província de Sofala, os movimentos (tanto dentro da mesma província como desta para Maputo, Gaza e outras regiões) eram em maior escala.

Dados sobre viagens recentes para o estrangeiro indicam que no Buzi 4,7% dos entrevistados o fez. Na Manhiça, a ida a países vizinhos foi mais frequente (13%) sendo na totalidade feita por trabalhadores ou ex-trabalhadores das minas na África do Sul.

No distrito de Buzi, 75,3% dos entrevistados cria animais no seu quintal. A percentagem de criadores na Manhiça desce para 61,2%. O Gráfico 3 mostra a distribuição das espécies criadas pelos entrevistados. Poucos são os criadores de gado bovino, dedicando-se esta população a criação de caprinos e aves.

Relação da população estudada com a criação das diferentes espécies animais



No Buzi, grande parte da população consome o leite sem prévio tratamento, enquanto que na Manhiça mais de 90% dos entrevistados bebe o leite comercializado UHT (Tabela 4).

Tipo de tratamento dado ao leite consumido pela população em estudo

Leite consumido	Buzi	Manhiça
Leite pasteurizado / UHT	13,50%	90,65%
Leite fervido	17,65%	5,40%
Leite cru	67,07%	3,5%
Sem informação	1,79%	---

Dos doentes com resultado do teste HIV, 41,18% e 38,4% foram seropositivos nos distritos de Buzi e Manhiça, respectivamente.

40% dos doentes de Buzi, e 38,8% dos de Manhiça declararam ter tido convívio com algum familiar doente de TB recentemente (nos últimos dois anos).

4.2. Tipificação de estirpes

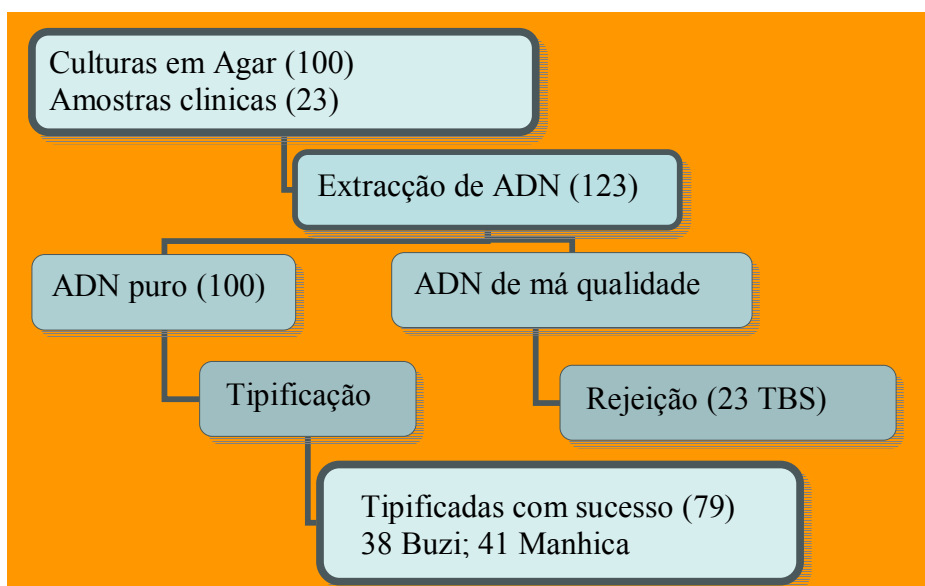
De um total de 123 amostras sendo 100 cultura em agar e 23 amostras clínicas (expectoração) arquivadas, obtidas nos dois centros, foi extraído e tipificado com sucesso o ADN em 79 amostras, o que constitui 64% dos isolados colhidos. No presente estudo, o ADN extraído directamente das 23 amostras clínicas (TBS), segundo o protocolo de Kamerbeek *et al.* (1997), não era de boa qualidade, apresentando grande concentração de impurezas. O padrão de hibridização destes isolados não era muito nítido, facto que levou a exclusão de tais isolados da análise.

As Figuras A e B (Anexo V) ilustram a diferença no padrão de hibridização quando se extraía o ADN de culturas de micobactérias e de amostras clínicas, respectivamente, sendo difícil interpretar os resultados, no segundo caso.

Devido ao longo tempo de conservação das culturas, 11 dos 100 isolados eram colónias mortas (desidratadas). Contudo, de tais isolados, foi recuperado com sucesso o ADN. Assim obteve-se no fim 79 isolados sujeitos a tipificação molecular (Figura 6). Um isolado não mostrou sinal de hibridização.

Dos 79 isolados tipificados com sucesso, 38 eram provenientes do distrito de Buzi e 41 da Manhica.

Figura 6 - Obtenção dos isolados para tipificação molecular

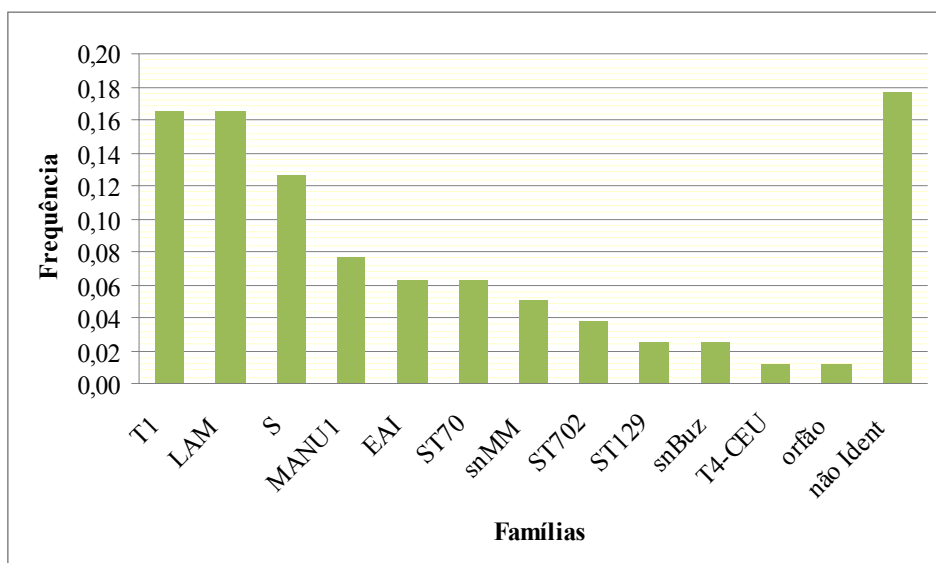


A Tabela 5, ilustra os padrões genéticos identificados, a sua frequência nos isolados em estudo e o peso percentual das Superfamílias nos isolados amostrados.

No Anexo VI, é apresentado num dendograma, o perfil de spoligotipo de todos os isolados submetidos á tipificação molecular.

Foram identificadas 33 estirpes agrupadas em 11 *clusters*. Nas duas regiões estudadas, mais de 18% dos isolados não foram identificados anteriormente nas bases de dados internacionais.

Famílias de *M. tuberculosis* isoladas e sua frequência na população



As famílias snBuz e snMM, foram assim denominadas para identificar grupos de isolados com perfil comum, identificados em Buzi e Manhiça respectivamente (Gráfico 4).

A família denominada snMM apresenta um padrão de spoligotipo caracterizado pela ausência dos *spacers* 30-33 e 35. A família snBuz é caracterizada pela deleção dos *spacers* 2;3-5;21-23; 29-32, 34 e 40.

Verifica-se que na região do Buzi, há uma grande heterogeneidade genética de *M. tuberculosis* enquanto na Manhiça, o padrão não é pouco variável (Gráficos 5 e 6).

Gráfico 3 - Diversidade genética de *M. tuberculosis* no distrito de Buzi

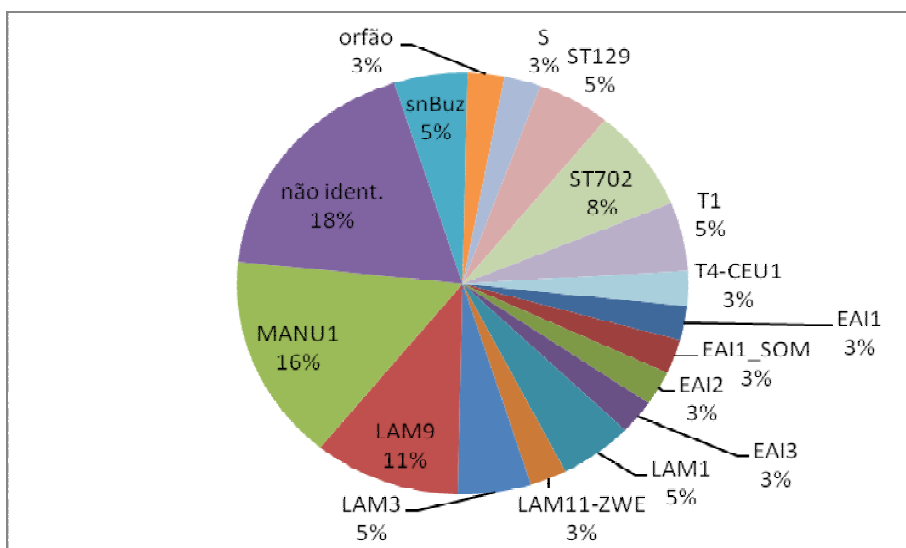
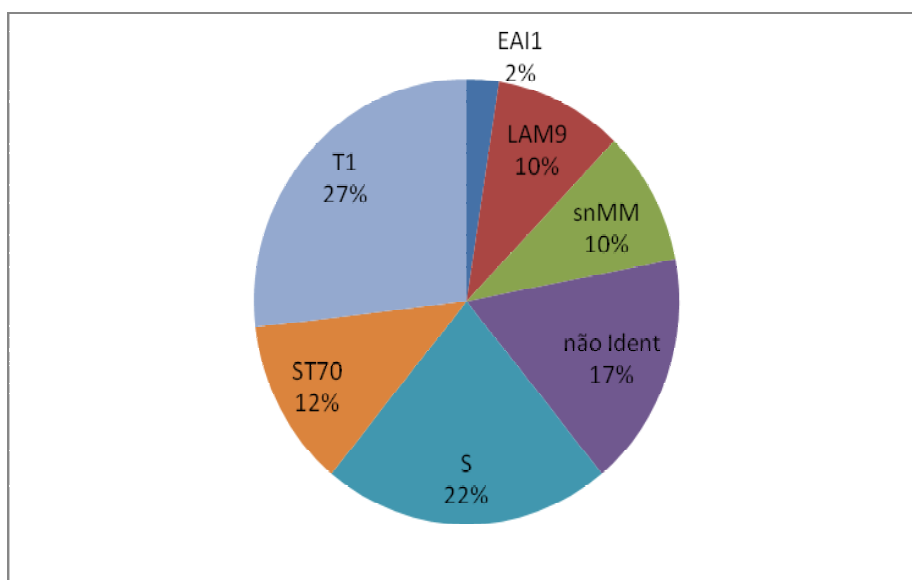


Gráfico 4 - Diversidade genética de *M. tuberculosis* no distrito de Manhiça



A Tabela 6, ilustra as estirpes comuns nas duas regiões e seu peso percentual na população em estudo.

Em quase metade dos casos de TB na Manhiça estão implicadas as estirpes S e T1, enquanto no Buzi, estas estirpes tem pouca expressão. Neste último distrito, 50% dos isolados pertence às famílias LAM, MANU1 e EAI (East African Indian).

Tabela 3 - Frequência de estirpes comuns de *M. tuberculosis* nos distritos de Buzi e Manhiça

Estirpe	Buzi	Manhiça
LAM	24%	10%
EAI	11%	2%
TI	5%	27%
S	3%	22%

Os biotipos MANU1, ST702 e ST129 foram isolados somente no Buzi. E o Biotipo ST70 foi encontrado somente em Manhiça.

O índice de transmissão recente, calculado pela fórmula de Small *et al.* (1994), Citados por Brudey *et al.* (2004), para a região de Buzi foi de 28,2% enquanto para a Manhiça obteve-se 65,8%.

5. DISCUSSÃO

5.1. Extração do ADN

Na extração de ADN a partir de diferentes matrizes, cultura, expectoração e colónias mortas, verificou-se algumas diferenças na qualidade do ADN obtido. Após a extração é imperioso verificar e quantificar o ADN e através da leitura da absorvância da amostra num espectrofotómetro pode-se ter ideia do grau de impurezas presente e rejeitar a amostra.

Em laboratórios com limitações financeiras, é recomendável correr o ADN em gel de agarose (1,5%) após a extração e mesmo após a amplificação (PCR), permitindo a detecção de erros nas etapas iniciais do processo e prevenindo gastos de reagentes tais como Taq Polymerase, *primers*, dNTP's, streptavidina, que são bastante onerosos comparando com a agarose.

No presente estudo, obteve-se extração satisfatória em 80% das culturas, mas a tentativa de extrair o ADN directamente de amostras clínicas resultou inviável. Contrariamente ao constatado por Kamerbeek *et al.* (1997) o ADN apresentava grande quantidade de impurezas, o que fez com que estas fossem eliminadas da análise pois apresentavam um padrão de hibridização não muito nítido (Anexo VI). Com a extração satisfatória do ADN directamente de amostras clínicas, pode-se ter um diagnóstico preciso (até ao nível de estirpe) em 24 horas após a colheita da amostra. Este facto reduz consideravelmente o tempo de diagnóstico, comparando com a cultura em agar seguida de genotipagem. Para além da redução do tempo de diagnóstico, o exame molecular directo reduz consideravelmente os custos de diagnóstico, considerando o custo poupado de 30 USD correspondente à cultura (Berg *et al.*, 2007).

Nos ensaios moleculares, um dos desafios actuais é o desenvolvimento de um método apropriado de extração de ADN para amplificação por PCR, em amostras clínicas (expectoração e tecidos). Segundo Ruggiero *et al.* (2007) a dificuldade de extração do ADN é mais acentuada no caso de tecidos lesionados (no caso de bovinos) do que em amostras clínicas de expectoração de humanos com TB, pois no último caso há geralmente um grande número de bacilos presentes na amostra.

Para Berg (2007), a dificuldade parece consistir na dificuldade de concentrar as micobactérias no *pellet* especialmente devido a flutuação e a tensão superficial. A

dificuldade de concentrar o *pellet* também constituiu um constrangimento no presente estudo.

Apesar de Kamerbeek *et al.* (1997) terem demonstrado que o método podia ser usado simultaneamente para a detenção e tipificação das micobactérias em amostras clínicas como expectoração, lesões tissulares e lavagens bronco-alveolares em menos de 2 dias, mais estudos são necessários para validar este método neste tipo de material.

Diferente do que acontece em cultura de células, em amostras clínicas, espera-se que haja competição do ADN de matéria estranha com os *primers* o que pode resultar em fraca amplificação do ADN do *M. tuberculosis* e as reacções de hibridização também serão afectadas.

Uma prática para obter padrões mais nítidos de spoligotipagem pode ser o aumento de número de ciclos de 30 para 40 durante o PCR (Berg, 2007). Contudo há o risco de ocorrer amplificação de bandas não específicas que irão hibridizar na membrana e levar a interpretação errada dos resultados.

Apesar dos métodos de diagnóstico com base em PCR serem cada vez mais usados para o diagnóstico rápido da TB, não há consenso nos protocolos de extracção de ADN de amostras clínicas.

Num estudo de avaliação da técnica de diagnóstico por PCR do ADN de expectoração feito no Brasil (Suffyst *et al.*, 2001), verificou-se inibição da reacção de PCR em 61% das amostras, demonstrando que o procedimento como originalmente descrito não era recomendado para análise de amostras de expectoração.

Actualmente, com a diversidade de kits de extracção de ADN e o aperfeiçoamento dos procedimentos de amplificação, o diagnóstico de culturas de micobactérias é muito sensível mas quando a reacção é empregue a amostras clínicas, ainda apresenta restrições quanto à sensibilidade

Segundo Roxo *et al.* (2002), vários investigadores tem recorrido a kits comerciais como a solventes orgânicos (fenol-cloroformio) para extrair o ADN de amostras clínicas mas os resultados têm sido muito irregulares. A existência de resultados negativos pode ser devida a presença de inibidores de reacção ou ainda as DNAses, que podem estar presentes quando o método de descontaminação da amostra não é adequado.

O sucesso do PCR, depende em grande parte presença de ADN livre de contaminantes que possam comprometer o processo de amplificação.

Segundo Samakoto e colaboradores (1999), a extracção de ADN de amostras de expectoração passa necessariamente por uma fase preparatória de digestão e

descontaminação da amostra com N-acetyl-cystina-NaOH 2% e posterior conservação a -70 °C em alíquotas de 200 µl.

Embora observado o pré-requisito de biossegurança 3 exigido para trabalho laboratorial em tuberculose, a contaminação ainda é um problema a ser vencido nos laboratórios de biologia molecular virados para o diagnóstico desta doença.

Com o objectivo de minimizar os riscos de contaminação, alguns procedimentos podem ser aplicados como a desintegração do ácido nucleico com ácido clorídrico, e o isolamento de áreas do laboratório para processamento de amostras clínicas e produto amplificado. Devem ainda ser adoptadas precauções na recepção da amostra e na conservação e manipulação em ambiente frio. O emprego de ponteiras com filtro também deve ser observado (Kanduma *et al.*, 2003). Sabe-se que geralmente o material antigo contém ADN degradado. No presente estudo, as amostras permaneceram congelados por mais de seis meses antes da extracção do ADN. A qualidade das amostras pode ter sido afectada ainda por transtornos ocorridos no fornecimento de energia eléctrica.

A dificuldade de extracção do ADN e os elevados custos dos kits comerciais tem sido indicados como os principais factores que impedem o diagnóstico molecular directo pela aplicação do PCR na rotina laboratorial de diagnóstico.

Aldous *et al.* (2005) ao avaliarem seis métodos de extracção de ADN de micobactérias concluíram que o método de Te-buffer, usado no presente estudo, era o menos dispendioso (0,03 USD por amostra) enquanto nos outros métodos o custo por extracção variava de 1,05 a 3 USD. Apesar do baixo custo, o método não é recomendado pela baixa qualidade do ADN que proporciona (Berg, 2007; Aldous *et al.*, 2001). Aldous e colaboradores (2001) recomendam o método IDI Lysis (Infecto Diagnostic Inc. Lysis tubes) como método de eleição (tecnicamente simples e o processo de extracção dura menos de 1 hora). O método TE-buffer não é simples tecnicamente e é moroso (cerca de 20 horas).

Recentemente, foi proposto um novo kit para extracção de ADN de amostras clínicas (Biotools, 2007). O referido kit foi desenvolvido para a rápida obtenção de ADN de alta qualidade a partir de amostras de expectoração, lavagens brônquicas e tecidos. Disponível para 50 e 250 reacções, embora não se conheça o custo do teste, este parece ser promissor para o problema da qualidade do ADN em amostras clínicas, dado que o uso de kits comerciais só é viável em larga escala.

As técnicas de PCR e de outros métodos moleculares ainda não vêm substituir os métodos clássicos de isolamento e identificação do agente, mas têm o objectivo de auxiliar o diagnóstico laboratorial da TB, permitindo uma redução do tempo necessário para confirmação e um diagnóstico diferencial a nível de estirpe, o que ajuda na compreensão da epidemiologia da doença.

A redução de tempo de diagnóstico possibilitaria a tomada de medidas rápidas e adequadas no controlo da doença tanto nos humanos como nos animais, e auxiliaria na identificação de factores de risco.

Surpreendentemente, no presente estudo foi recuperado com sucesso o ADN de colónias mortas. Este facto contribuiu para que, mesmo depois de sucessivas avarias no sistema de frio do Laboratório de Referência para a Tuberculose, parte do material genético (células cultivadas) fosse recuperado. Kamerbeek e colaboradores (1997), extraíram com sucesso o ADN a partir de tecido embebido em parafina durante 40 anos, bem como de preparados de lâminas de microscopia coradas com Ziel-Neelsen ou auramina, revelando que quando há concentração do ADN, no caso de células de micobactérias, o método de extracção é eficiente.

5.2. Estirpes de *Mycobacterium* isoladas

5.2.1. A ausência de *M. bovis* em doentes com TB

Contrariamente ao esperado, não foi isolado o *M. bovis* em casos de TB humana nas duas regiões estudadas, apesar de os factores de risco para a TB zoonótica estarem presentes.

Sessenta e sete por cento (67%) dos doentes do distrito de Búzi, bebe leite de vaca crú e naquele distrito, a prevalência de TBb na população bovina é de 8,5% (DINAP, 2004). Um estudo feito por Mucavele, 2006 (dados não publicados) naquele distrito, com base no teste de tuberculina e confirmação após abate, revelou que no sector familiar a prevalência era de 5,8%, sendo a prevalência no efectivo do sector comercial de 10,7%. A nível das manadas a prevalência era de 28%.

Na Manhiça, os factores de risco estão praticamente ausentes: há pouco contacto com bovinos, a prevalência de TBb é inferior a 1% (DINAP, 2005) e o leite consumido é maioritariamente processado industrialmente, dentro ou fora do país.

Diferente de outros países da região, em muitas áreas de Moçambique, não há o hábito de consumo de leite. O facto pode dever-se à grande redução do efectivo leiteiro que ocorreu

durante o conflito armado assim como à baixa produtividade das raças bovinas locais. No caso de Buzi, é notória a aversão que a população apresenta em relação ao leite de vaca. Aqueles habitantes justificam a aversão ao consumo de leite, indicando-o como tendo sido a causa de linfadenite que ocorreu em crianças daquele distrito, no passado.

Por outro lado, verificou-se que, em ambos os distritos em estudo, a população de doentes era criadora de animais, contudo, os doentes criadores de gado bovino representavam menos de 20%. Grande parte dos doentes, dedicava-se à criação de caprinos e aves.

Em vários estudos que reportaram *M. bovis* como agente causal da tuberculose em humanos, tais casos ocorriam em populações de risco específicas como magarefes e tratadores de gado (Grange e Yates, 1994; Cosive *et al.*, 1998; Kazwala *et al.*, 2001b). Cosive *et al.* (1998) resumizou a informação epidemiológica da tuberculose zoonótica em vários países Africanos e verificou que a proporção de casos de *M. bovis* em TB humana variava de 0,4 a 5,4%.

Estudos recentes de tuberculose zoonótica nos países vizinhos são escassos. Num estudo feito no Kruger National Park na África do Sul, onde a prevalência de tuberculose por *M. bovis* na população de búfalos é superior a 99%, em amostras de expectoração de 206 trabalhadores do parque submetidas a exame bacteriológico para pesquisa de micobactérias, não foi isolado *M. bovis* e foi isolado *M. tuberculosis* em apenas 2 trabalhadores (Weyer *et al.*, 1999).

Na Tanzânia, com base em provas bioquímicas, Kazwala *et al.* (2001) reportaram uma prevalência de 16% de casos de *M. bovis* em tratadores de gado. Mais recentemente foi feito um outro estudo com objectivo de elucidar o perigo de transmissão de TB zoonótica pelo consumo de leite cru (Kazwala *et al.*, 2004). De 805 amostras de leite analisadas, 31 foram positivas a micobactérias mas apenas 2 eram *M. bovis* e as restantes eram micobactérias atípicas, que também constituem motivo de preocupação, principalmente em regiões onde a incidência de HIV é elevada.

A importância do *M. bovis* na epidemia da TB humana em África ainda não é muito clara. São necessários mais estudos, particularmente na região sub-Sahariana, com objectivo de avaliar a importância da TB zoonótica nos diferentes países (Kazwala, 2007).

O facto de o estudo aqui apresentado ter partido de doentes exclusivamente com baciloscopia positiva (Bk+), limitou o estudo aos casos de TB pulmonar, ficando de fora os casos extra pulmonares (TB ganglionar, mesentérica e intestinal). Quando a via de infecção é por ingestão de carne ou leite infectado por *M. bovis*, deve-se ter atenção aos casos de TB extra pulmonares. Segundo a OMS, 15% dos novos casos de TB diagnosticados no âmbito

da estratégia DOTS em Moçambique são extrapulmonares (WHO, 2007). Casos de TB Bk- não constituem prioridade no âmbito da estratégia DOTS, onde o objectivo é identificação rápida dos disseminadores da doença e tratamento imediato.

No estudo realizado por Kazwala e colaboradores (2001), verificou-se uma diferença significativamente alta de casos de *M. bovis* de isolados recuperados em casos de TB extra pulmonar em relação aos casos de TB pulmonar. Os autores observaram raios de isolados de *M. bovis* em casos de TB extra pulmonar em relação aos casos pulmonares de 6:1, ratio similar ao registado em estudos anteriores na Europa (5:1). Contudo, estudos recentes têm mostrado que o agente pode ser muito comum em casos de TB pulmonar (Ayele *et al.*, 2004).

Num estudo realizado no Reino Unido (Gibson *et al.*, 2004), verificaram que 13 dos 22 casos de TB por *M. bovis* haviam tido algum contacto com explorações pecuárias, seja por trabalho extra em mungição de vacas ou vivendo na sua infância, ou mesmo criadores reformados. Entre os doentes que participaram no estudo, o grau de contacto com bovinos era reduzido.

A rotina de diagnóstico estabelecida nos centros de referência para a TB em Moçambique, já é exclusiva: aos doentes BK+ e BK- com sinais clínicos de TB, são colhidas amostras (de expectoração ou biopsia ganglionar) para cultura em agar. Para o cultivo, são usados meios de cultura à base de ovo, enriquecidos com glicerol como fonte de carbono. Contudo, o glicerol inibe até certo ponto o crescimento de *M. bovis* e potencia o crescimento do *M. tuberculosis* (Carter *et al.*, 1990).

Para melhor isolamento do *M. bovis*, Marcondes e colaboradores (2006) recomendam o uso de agar Lj enriquecido com piruvato (Stonebrink) ou outros meios como o Agar Middlebrook 7H11. No agar 7H11, as colónias das espécies *M. tuberculosis* e *M. bovis* mostram crescimento visível 21 dias após a sementeira (Kuivula, 2004; Marcondes *et al.*, 2006) e dão ainda a possibilidade de diferenciar o *M. bovis* do *M. tuberculosis* pelas características morfológicas das colónias (Marcondes *et al.*, 2006). Embora a diferenciação com base nas características morfológicas à observação macroscópica não permita um diagnóstico diferencial preciso, este procedimento pode constituir um passo preliminar antes da genotipagem.

A colecção reduzida da amostra (n=79) pode ter contribuído para a ausência de *M. bovis* entre os isolados submetidos a genotipagem. Contudo, num estudo paralelo, desenvolvido no Brasil envolvendo 232 amostras de doentes de Moçambique co-infectados com TB e

HIV, também não foi encontrado o *M. bovis* (dados não publicados). O estudo envolvia casos de TB pulmonar.

5.2.2. A variedade de estirpes de *M. tuberculosis* isoladas

As estirpes de CMT isoladas no presente estudo compartilham o mesmo padrão com as encontradas nos países lilitíferos. Dinguimbaye *et al.* (2006), isolaram predominantemente as estirpes LAM, w-Beijing, “T” e “S”, num estudo em crianças internadas em Western Cape na África do Sul. Na Tanzânia, os biotipos predominantes são o CAS (Central Asian Family), a LAM e a EAI (Eldholm *et al.*, 2006). As duas últimas foram registadas no presente estudo. As estirpes T1 e LAM9, predominantes na Manhiça, foram também indicadas como predominantes em doentes num hospital de Portugal (David *et al.*, 2004). Os autores, na altura, levantaram a possibilidade de importação da doença da América Latina. Contudo, verifica-se que esta família está mundialmente dispersa. As estirpes T1 e S são conhecidas como sendo cosmopolitas (Brudey *et al.*, 2004; Vitol *et al.*, 2006).

O Biotipo w-Beijing, conhecido como altamente patogénico e associado à ocorrência de surtos em comunidades de várias partes do mundo (Puustinen *et al.*, 2003), não foi encontrado nos isolados em estudo, apesar de estar presente e constituir motivo de preocupação na vizinha África do Sul.

No Buzi, verificou-se a presença da estirpe LAM11ZWE, esta estirpe (ST59), é comum em surtos no vizinho Zimbabwe (Easterbrook *et al.*, 2004) e é exclusivamente Africana. Esta estirpe, caracterizada pela ausência dos *spacers* 21-24, 27-30 e 33-36, representa 47% e 65% dos isolados de *M. tuberculosis* no Zimbabwe e na Zâmbia respectivamente, e foi designada SAF1-Southern Africa (Chihota *et al.*, 2007). A presença desta estirpe na população do Búzi pode ser justificada pela característica migratória da mesma.

A família LAM é a mais frequente na América Latina, Caraíbas e no Mediterrâneo (Brudey *et al.*, 2004). Na Venezuela, a estirpe LAM, é responsável por mais de 60% dos casos de TB (Aristimunõ *et al.*, 2006). Recentemente, esta família foi classificada em 12 “subclasses”. No presente estudo, foram identificadas as subclasses 1, 3 e 9; a família EAI ocorre com maior frequência na África Oriental e na Índia (Filliol *et al.*, 2002; Brudey *et al.*, 2004; Vitol *et al.*, 2006). A estirpe T1 foi a segunda mais predominante no estudo. O facto de as estirpes EAI estarem presentes nos dois distritos não surpreende já que nas duas regiões houve (e ainda há) grande influência de emigrantes indianos comerciantes. A Estirpe MANU, encontrada no distrito de Buzi, é também conhecida como uma variante originária da Índia.

Verificou-se no Búzi, a existência de uma grande diversidade genética das micobactérias. Este facto pode dever-se a factores como movimentos constantes daquela população e a tivação de infecções latentes. O facto mostra, por outro lado, que não há uma relação clara entre casos de TB naquela população. As mesmas observações foram feitas por Vitol *et al.* (2006) que defendem que isolados que não pertençam a estirpes idênticas são indicativos de reactivação de uma infecção latente. Esta situação é estimulada por factores imunodepressivos, tais como a mal nutrição, a infecção por HIV, entre outros factores ambientais. No estudo, constatou-se que o índice de co-infecção na nossa amostra TB/HIV é de 41,1%. A nível nacional a prevalência de HIV, em casos incidentes de TB, é de 50% (WHO, 2007).

Ao contrário do Búzi, para isolados provenientes do distrito da Manhiça verifica-se um domínio claro de certas estirpes (S, T1 e LAM9) que representam 60% dos isolados daquele distrito. As referidas estirpes podem estar implicadas em cadeias de transmissão recente. Esta constatação é partilhada por Vitol *et al.* (2006) que concluiu que isolados com um padrão genético idêntico (pertencentes à mesma estirpe), têm alta probabilidade de estarem envolvidos numa cadeia de transmissão recente. Este facto é fundamentado pelo índice de transmissão recente calculado em 65,8% para Manhiça. Num estudo feito por Brudey (2004) na Suécia, onde a prevalência de TB é muito baixa, verificou-se um índice 14,1% de transmissão em curso. Naquele caso, grande parte dos casos de TB era devido a reactivação de infecções latentes.

Um estudo feito por Malik e Godfrey-Fausset (2005) reporta que um surto numa escola no Reino Unido foi causado por um caso de tuberculose não diagnosticado numa criança da mesma escola. Um outro estudo feito em 2000 pelo mesmo autor, e por ele citado, mostrou que numa comunidade exploradora de minas de ouro, um terço de casos de TB eram disseminados por pacientes que cronicamente transmitiam o agente após falha de tratamento. A associação dos dados genotípicos, clínicos e demográficos pode ajudar a identificar os focos de disseminação da doença, contudo, não constituía objectivo do presente estudo.

Grande parte (73,4%) das estirpes identificadas nos casos de TB humana compartilha o genótipo com o encontrado na base de dados Internacional SpolDB4. Contudo, há ainda alguns genótipos não registados anteriormente nesta base de dados. A base de dados cuja última actualização foi em Setembro de 2005, considera a diversidade de isolados de pacientes de 141 Países (Brudey, 2006). Este facto não deve ser necessariamente interpretado como sendo estirpes locais pois poucos estudos de Spoligotipagem foram

feitos no mundo e, em particular, em África. Eldholm *et al.* (2006), num estudo na Tanzânia, obtiveram 64% de padrões não descritos anteriormente. David e colaboradores (2005), num estudo em doentes de TB em Portugal, verificaram que 21% dos genótipos encontrados não compartilhava o spoligotipo com a base de dados internacional.

Segundo Puustinen *et al.* (2003), a presença de estirpes únicas pode ser explicada pela falta de informação nos outros países (particularmente nos países vizinhos), que possam interferir na cadeia de transmissão das micobactérias.

Este foi o primeiro trabalho feito em Moçambique na área de biologia molecular de bactérias do género *Mycobacterium*. Embora não se tenham evidenciado casos de *M. bovis* em Humanos, a situação epidemiológica do país indica para a existência da TB zoonótica. O trabalho contribuiu para dar uma primeira ideia sobre diversidade genética das microbactérias circulantes em 2 regiões de Moçambique.

5.3. Limitações do estudo com base na Spoligotipagem

A técnica de Spoligotipagem pode reduzir o tempo necessário para o diagnóstico quando a tipificação é feita directamente a partir de amostras clínicas, mas é uma técnica relativamente onerosa e requer pessoal treinado.

Uma das grandes dificuldades no método de Spoligotipagem é a análise de artefactos (hibridizações não específicas), um problema difícil de resolver. Para minimizar este facto, é importante usar duas membranas de hibridização diferentes para as mesmas amostras. Esta tentativa de melhorar a qualidade dos resultados acarreta custos.

No presente estudo, foram colocadas fora de análise as placas que apresentavam diferentes tons de hibridização, facto que contribuiu para a redução do número de isolados tipificados com sucesso.

A segunda limitante do método usado, é que este não tem a capacidade de revelar casos de infecção mista por duas ou mais populações do bacilo. Para tal, seria necessário recorrer a estudos com base em novos marcadores tais como MLVA e SNP's (Brudey *et al.*, 2006). Em zonas de alta prevalência de TB, a existência de infecções mistas pode em certa medida interpretação errada dos resultados.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A metodologia actualmente empregue em Moçambique para o diagnóstico da TB humana, é ineficaz para distinguir o *M. tuberculosis* dos casos associados a *M. bovis*.

A diferenciação de espécies e estirpes do CMT pela técnica de *Spoligotyping* é muito simples, tem boa reprodutibilidade, prática, rápida e fácil de interpretação dos resultados.

As técnicas de PCR e outros métodos moleculares ainda não vem substituir os métodos clássicos de isolamento e identificação do agente mas tem o objectivo de auxiliar o diagnóstico laboratorial da TB e apoiar estudos da epidemiologia da TB. São necessários estudos que contribuam para o estabelecimento de um método eficaz de extracção de ADN de micobactérias presentes em amostras clínicas.

No presente estudo, não houve evidência de transmissão da tuberculose de bovinos para Humanos, uma vez que não foi identificado o *M. bovis* entre os isolados implicados em tuberculose pulmonar no Homem. Contudo, é importante monitorizar a tuberculose bovina em Humanos, especialmente naqueles em risco elevado de infecção primária, como é o caso de agricultores e trabalhadores de matadouros.

As estirpes de *M. tuberculosis* mais abundantes na população em estudo foram as famílias LAM (16,5%), T1 (16,5%) e S (12,7%). Algumas estirpes são compartilhadas entre as duas regiões em estudo, conquanto, com predominância diferente. 25% dos padrões de spoligotipo obtidos não foram registados anteriormente na base de dados internacional. Duas novas famílias (locais) de *M. tuberculosis* foram identificadas e denominadas, no presente estudo de snBuz e snMM. 18% dos isolados apresenta padrão genético único.

Os resultados encontrados levam-nos a concordar com o sugerido por Brudey *et al.* (2006), segundo o qual, a estrutura genética da população de *M. tuberculosis* está fortemente ligada à escala geográfica o que reforça a importância de esforço localizado no controlo da TB.

Existe em Moçambique uma grande diversidade genotípica de *M. tuberculosis*. Esta diversidade foi mais acentuada no distrito de Buzi do que no da Manhiça, neste estudo.

A análise dos padrões genotípicos observados, sugerem que os casos de TB no Buzi estão são devido a reactivação de infecções latentes enquanto na Manhiça há um processo activo de disseminação do *M. tuberculosis*.

O uso da técnica de *Spoligotyping* no diagnóstico da TB em Moçambique é de extrema importância no diagnóstico rápido e específico da TB. Este método torna-se mais útil para

a vigilância dos casos de TB multirresistente aos fármacos e casos de doentes expostos ao bacilo bovino, como é o caso de veterinários, tratadores de gado e magarefes.

No âmbito clínico, o conhecimento das variantes genéticas é útil, pois permite identificar surtos, casos de recaídas e fracassos no tratamento.

A extracção de ADN a partir de expectoração (conservada em congelação) não mostrou ser eficaz neste estudo.

O sucesso da técnica de *Spoligotyping*, depende em grande parte presença de ADN livre de contaminantes que possam comprometer o processo de amplificação.

Com vista a identificar as estirpes envolvidas na tuberculose bovina, um estudo paralelo (cujos resultados ainda não estão disponíveis) está sendo desenvolvido com amostras provenientes dos matadouros dos mesmos distritos.

O presente estudo contribuiu com resultados que fornecem uma visão inicial sobre a biodiversidade genética das estirpes do Complexo *M. tuberculosis* existentes em Moçambique. Porém, o mesmo está longe de ter esgotado o assunto. Deste modo, tecem-se algumas recomendações:

- O prosseguimento de estudos que evidenciem a transmissão zoonótica da tuberculose. Futuros estudos devem ser orientados para população de risco específico (tratadores de gado, trabalhadores de matadouros e veterinários);
- Que os casos diagnosticados de TB extra pulmonar sejam, de maneira rotineira, submetidos a tipificação molecular para melhor compreensão da génese de tais casos;
- A realização de estudos moleculares que permitam esclarecer a relação entre surtos, facilitar a identificação de focos de doença, prevenindo a disseminação a partir dos mesmos;
- A realização de estudos moleculares associados à epidemiologia clássica, por forma a identificar estirpes multirresistentes aos fármacos, para a tomada de medidas adequadas tendentes a reduzir casos de recorrência e multirresistência;
- Para reduzir o grau de impurezas nos produtos de extracção, recomenda-se a realização de extracção de ADN, seguida de amplificação imediata (evitando a conservação em frio), e encurtar o tempo entre a hibridização e a amplificação, uma vez que variações na temperatura afectam a qualidade dos produtos de PCR e, conseqüentemente, o sinal de hibridização;
- Estabelecer uma técnica mais eficiente para a extracção do ADN, a partir de amostras clínicas.

- Para futuros estudos de *M. bovis* em humanos, recomenda-se o procedimento de Marcondes e colaboradores (2006) e Diguimbaye *et al.* (2006): uso de agar Lowestein-Jensen enriquecido com 0,6% de pyruvato de sódio ou agar Middlebrook 7H11, seguida de tipificação molecular. Paralelamente, deverá proceder-se ao cultivo da mesma amostra em agar Lowestein-Jensen enriquecido com 0,75% de Glicerol. As placas devem ser incubadas a 37 °C.

O trabalho contribuiu para o estabelecimento da ligação entre profissionais de saúde humana e de saúde animal em Moçambique. Tal ligação era, até ao momento, limitada a área da cisticercose suína. O laço profissional entre médicos e veterinários é fundamental para o desenvolvimento de acções conjuntas no controlo de zoonoses. Sabe-se que 70% dos casos das doenças emergentes no homem tem origem nos animais.

BIBLIOGRAFIA

- Abalos, P. e Retamal, P. (2004). Tuberculosis: Una Zoonosis re-emergente? Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 23(2): 583-594.
- Abrahão, R.M.C.M. (1999). Tuberculose Humana Causada pelo *M. bovis* : Considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. Arch Vet Sci., 4: 5-15.
- Almeida, R.D.A. (1994). Tuberculose: Doença do passado, presente e do futuro. Prémio BIAL de Medicina Clínica, Porto. www.cienciaportugal.net/
- Amanfu, W. (2006). The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. Tuberculosis, 86: 330-335.
- Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G. e Pavlik, I. (2004). Bovine Tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 8 (8): 924-937.
- Aranaz, A., Liebana, E., Mateos, A., Dominguez, L., Vidal, D., Domingo, M., Gonzolez, O., Rodriguez-Ferri, E.F., Bunschoten, A.E., Van Embden, J.D.A., Cousin, D. (1996). Spacer Oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology, 34: 2734-2740.
- Araújo, L.A.L. (2006). Estudo de casos de Tuberculose em Bovinos abatidos no Matadouro Municipal de Maputo. Trabalho de Culminação de Estudos. Faculdade de Veterinária. UEM. Maputo.
- Aristimuño, L., Armengol, R., Cebollada, A., España, M., Guilarte, A., lafoz, C., Lezcano, M., Revillo, M., Martin, C., Ramirez, C., Rastogi, N., Rojas, J., de salas, A.V., Sola, C. E Samper, S. (2006). Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. BMC Microbiology, 6: 90.
- Baker, M.G., Lopez, L.D., Cannon, C., de Lisle, G. e Collims, M. (1999). Continuing *Mycobacterium bovis* transmission from animals to humans in New Zealand. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 3(8): 715-21
- Berg, S. (2007). Molecular typing of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Communication in Network on Bovine Tuberculosis in Africa Workshop- Arusha, Tanzania.

- Berg, S., Smith, N., Hewinson, G. e Gordon, S. (2007). Molecular Typing of strains from *Mycobacterium tuberculosis* complex. TB Research poster. Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, UK.
- Biotoools (2007). Genomic DNA Extraction-User's Manual. B&M LABS S.A. Consultado em [http:// www.biotoools.net](http://www.biotoools.net); página acedida a 1 de Março de 2008.
- Borges, M., Cafrune, P.I., Possuelo, L.G., Valim, A.R.M., Ribeiro, M.O. e Rossetti, M.L.R. (2004). Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from outpatient clinic in Porto Alegre. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 30(4): 394-397.
- Boschioli, L. (2002). Isolation of *Mycobacterium bovis* from wildlife in France. In: Abstracts of the Veterinary European Network on Mycobacterium (VENOM) Symposium: "DNA fingerprinting of bovine TB strains", Belfast (Northern Ireland), October 24-26.
- Brudey, K., Gordon, M., Mostro, P., Liselot, S., Jonsson, B., Sola, C., Ridell, M., e Nalin, R. (2004). Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7): 3046-51.
- Brudey, K., Driscoll, J.R., Prodinger, W.M., Al-Hajoj, S.A., Allix, C., Aristimuno, L., Arora, J., Baumanis, V., Binder, L., Cafrune, P., Cataldi, A., Cheong, S., Diel, R., Ellermeier, R., Evans, C., Fauville-Dufaux, M., Ferdinand, S., Garcia de Vedma, D., Garzelli, C., Gazzola, L., Gomes, H.M., Gutierrez, M.C., Hawkey, P.M., van Helden, P.D., kadival, G.V., Kreiswirth, B.N., Kremer, K., Kubin, M., Kulmarni, M., Liens, B., Lillebaek, T., Ho, M.L., Martin, C., Mokrousov, I., Narvskaja, O., Ngeow, Y.F., Neumann, L., Niemann, S., Parwati, I., Rahim, Z., Rasolofon-Razanamparany, V., Rasolonalona, T., Rossetti, M.L., Rusch-Gerdes, S., Sajduda, A., van Soolingen, D., Streicher, E.M., Suffys, P.N., Tortoli, E., Tracevska, T., Vicent, V., Victor, T.C., Warren, R.M., Yap, S.F., Zaman, K., Portaels, F., Rastogi, N., Sola, C. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international *Spoligotyping* database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology*, 6: 23-39.
- Cadmus, S., Palmer, S., Okker, M., Dale, J., Gover, K., Smith, N., Jahans, K., Hewinson, R.G. e Gordon, S.V. (2005). Molecular Analysis of Human and Bovine Tubercle Bacilli From a Local Setting in Nigeria. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1): 29-34.

- Carter, G., John, R. e Cole, Jr. (1990). Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology. 5th ed Press, England. pp. 11-39/293.
- Centers for Disease Control & Prevention-CDC (2007). Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis, Prevention and Control. Appendix A: Glossary and Abbreviations. www.cdc.gov/int/tb/ página acedida a 10 de Janeiro de 2007.
- Chihota, V., Apers, L., Mungofa, S., Kasongo, W., Nyoni, I.M., Tembwe, R., Mbulo, G., Tembo, M., Streicher, E.M., Van der Spuy, G.G., Victor, T.C., Van Heerden, P., Warren, R.M. (2007). Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in regions of Southern Africa. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 11(3): 311-318.
- Coetzer, J.A.W, Thomson, G.R., Tustin, R.C. (1994). Infectious Diseases of Livestock- With special Reference to Southern Africa, Vol.II, Oxford University Press, pp. 1419-1424.
- Collins, C. (2000). The bovine tubercle bacillus. *Br. J. Biomed.*, 57: 234-240.
- Collins, D.M. (2001). Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, 81(1/2): 97-102.
- Collins, J.D. (2006). Tuberculosis in cattle: strategic planning for the future. *Vet. Microbiol.*, 112: 369-381.
- Corner, L. (1993). Bovine tuberculosis: pathology and bacteriology. Australian standard diagnostic techniques for animal diseases. CSIRO for the standing committee on Agriculture Resource Management, East Melbourne. pp. 1-8.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C. J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A.F., Huchzermeyer, H., Kantor, I. e Meslin, F. (1998). Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerg. Infect. Dis.*, 4(1): 59-70.
- Cosma, C., Sherman, D., Ramakrishnan, L. (2003). The secret lives of pathogenic Mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57: 641-676.
- Cousins, D., Williams, S., Liébana, E., Aranaz, A., Bunschoten, A., Van Embden, J., Andllis, T. (1998). Evaluation of DNA Typing Techniques in Epidemiological Investigation of Bovine Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(01): 168-178.
- Cousins, D.V., Williams, S.N. e Dawson, D.J. (1999). Tuberculosis due to *M. bovis* in Australian population: DNA typing of isolates. *Int. J. Tuber. Lung Dis.*, 3: 722-731.

- David, S., Portugal, C., Galada, A., Cardoso, A., Barros, V., Sancho, L. e de Sousa, J.G. (2005). *Spoligotyping* e polimorfismo do Gene *pncA*: Um cenário em duas etapas para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em Portugal. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, XI(6) : 533-556.
- Delahay, R.J., de Leeuw, A.N.S., Barlow, A.M., Clifton-Hadley, R.S., Cheeseman, C.L. (2002). The status of *Mycobacterium bovis* in U.K. wild animals: a review. *Vet. Journal*, 164: 90-105.
- Diguimbaye, C., Hilty, M., Ngandolo, R., Mahamat, H.H., Pfiyffer, G.E., Baggi, F., Tanner M., Schelling, E. e Zinssta, J. (2006). Molecular Characterization and Drug Resistance Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Chad. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4): 1575-77.
- DDADR-BUZI (2004). Dados Sobre as Tuberculinizações. Direcção Distrital de Agricultura e Desenvolvimento Rural – Buzi.
- DDADRM (2003). Dados compilados Sobre as Tuberculinizações. Direcção Distrital de Agricultura e Desenvolvimento Rural da Manhiça.
- De Viedma, D.G., Bouza, E., Rastogi, N. e Christophe, S. (2005). Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes in Madrid and Identification of Two New Families Specific to Spain-Related Settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4) 1796-1806.
- DINAP - Direcção Nacional de Pecuária (2004). Relatório Anual de 2003. Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural. Maputo. Moçambique.
- DINAP - Direcção Nacional de Pecuária. (2005). Relatório Anual de 2004. Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural. Maputo. Moçambique.
- Dupon, M., Ragnaud, J.M. (1992). Tuberculosis in patients infected with Human Immunodeficiency virus. A retrospective multicentre study of 123 cases in France. *Quarterly Journal of Medicine (New Series)* 85).
- Easterbrook, P., Gibson, A., Murad, S., Lamprecht, D., Ives, N., Ferguson, A. e Drobniewski, F. (2004). High Rates of Clustering of Strains Causing Tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a Molecular Epidemiological Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10): 4536-544.
- Eldholm, V., Matee, M., Mfinanga, S.G.M., Heun, M. e Dahle, U.R. (2006). A first insight into the generic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Dar es Salaam,

- Tanzania, assessed by *Spoligotyping*. BMC Microbiology, 6(76). Consultado em www.biomedcentral.com/
- Elsabban, M.S, Lofty, O., Awad, W.M., Soufi, H.S., Mikhail, D.G. e Hammam, H.M. (1992). Bovine tuberculosis and its extent of spread as a source of infection to man and animals in Arab Republic of Egypt. Proceedings of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Conference on Animal Tuberculosis in Africa and the Middle East.; Cairo, Egypt: 198-211.
- Feldman, C., Glatthaar, M., Morar, R., Mahomed A.G., Kaka, S., Cassel, M. (1999). Bacterial Pneumococcal Pneumoniae in HIV seropositive and seronegative adults. CHEST, 116: 107-114.
- Filliol, I., Driscoll, J.R., van Soolingen, D., Kreiswirth, B.N., Kremer, K., Valétudie, G., DucAnh, D., Barlow, R., Banerjee, D., Bifani, P.J., Brudey, K., Cataldi, A., Cooksey, R.C., Cousins, D.V., Dale, J.W., Dellagostin, O.A., Drobniewski, F., Engelmann, G., Ferdinand, S., Gascoyne-Binzi, D., Gordon, M., Gutierrez, M.C., Haas, W.H., Heersma, H., Kallenius, G. Kassa-Kelembo, E., Koivula, T., Ly, H.M., Makristathis, A., Mammina, C., Martin, G., Mostrom, P., Mokrouv, I., Narbonne, V., Narvskaya, O., Nastasi, A., Niobe-Eyangoh, S., Pape, J.W., Rasolovo-Razanamparany, V., Ridell, M., Rossetti, M.L., Stauffer, F., Suffys, P.N., Takiff, H., Texier-Maugein, J., Vicent, V., de Waard, H., Christophe, S., Rastogi, N. (2002). Global Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes. Emerging Infectious Diseases, 8(11): 1347-1349.
- Gibson, A.L., Hewinson, G., Goodchild, T., Watt, B., Story, A., Inwald, J. e Drobniewski, F.A. (2004). Molecular Epidemiology of Disease Due to *Mycobacterium bovis* in Humans in the United Kingdom. Journal of Clinical Microbiology, 42 (1): 431-434.
- Gori, A., Bandera, A., Marchetti, G., Esposti, A.D., Caozzi, L., Nardi, G.P., Gazzola, L., Ferrario, Van Embden, J.D., Van Soolingen, D., Moroni, M. e Franzetti, F. (2005) *Spoligotyping* and *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg. Infectious Dis. 11(8). www.cdc.gov/eid.
- Gracey, J., Collinis, D.S. e Huey, R. (1999). Meat Hygiene. 10Th Ed. Harcourt Brace and Company.
- Grange, J.M, Yates, M.D. (1994). Zoonotic Aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Vet. Microbiol., 40:137-51.

- Grange, J.M., Yates, M.D. e Kantor, I.N. (1996). WHO Guidelines for specification within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, 2nd Ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Grange, J.M. (2001). *Mycobacterium bovis* infections in Human beings. Centre for Infectious Diseases and International Health. Royal Free and University College Medical School, London, UK.
- Gutiérrez, M., Samper, S., Jimenez, M.S., Van Emden, J.D.A., Martin, J.F.G. e Martin, C. (1997). Identification by *Spoligotyping* of a Caprine Genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing Human Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12): 3328-3330.
- Haddad, N., Masselot, M., Durand, B. (2004). Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Research in Veterinary Science*, 76: 1-18.
- Hasan, Z., Tanveer, M., Kanji, A. Hasan, Q., Ghebremichael, S. e Hasan, R. (2006). *Spoligotyping* of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Pakistan Reveals Predominance of Central Asian Strain 1 and Beijing Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5): 1763-68.
- Hijjar, M.A. (2005). A História da Tuberculose. SBPT - O portal dos Pneumologistas. www.sbpt.org.pt.
- Hirsh, D.C. e Zee, Y.C. (1999). *Veterinary Microbiology*. Blackwell Science. Callifornia, USA. 250: 285.
- Huard, R.C., Lazzarini, L.C.O., Butler, W.R., Van Soellingen, D. e Ho, J.L. (2003). PCR-Based Method to Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on Basis of Genomic Deletions. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4): 1637-1650.
- Huchzermeyer, H.F.K.A., Bruckner, G. K., Van Heerden, A., Kleeberg, H.H., Van Rensburg, I.B.J., Koen, P. e Loveday, R.K. (1994). *Tuberculosis - in Infectious Diseases of Livestock With special Reference to Southern Africa*. Vol II., Oxford University Press. Cape Town. 1426-1438.
- Isogen Bioscience B.V. (2006). *Spoligotyping manual*. Maarsen, Netherland. Consultado em: www.isogen.isogen-lifescience.com; página acedida a 15 de Janeiro de 2006.

- Kadumba, E., Mchugh, T.D. e Gillespie, S.H. (2003). A review. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* typing: a users guide. *Journal of applied Microbiology*, 94: 785-91.
- Kallenius, G., Koivula, T., Ghebremichael, S., Hoffner, S.E., Norberg, R., Svensson, E., Dias, F., Marklund, B., Svenson, S.B. (1999). Evolution and clonal traits of *Mycobacterium bovis* complex in Guinea-Bissau. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3872-3878.
- Kamerbeek, J., Schouls L., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal Madhu e Van Embden, J. (1997). Simultaneous Detection and Stain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4): 907-914.
- Kazwala, R.R. (2007). *M. bovis* in Africa. Short communication. In Network on Bovine Tuberculosis in Africa Workshop- Arusha, Tanzania, 2007.
- Kazwala, R.R., Darborn, C.J., Kusiluka, L.J.M., Jiwa, S.F.H., Sharp, J.M. e Kambarage, D.M. (2004). Isolation of Mycobacterium species from raw milk of pastoral cattle of the Southern Highlands of Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, 30 (4): 223-39
- Kazwala, R.R., Kambarage, D.M. Darbon, C.J., Nyange, J., Jiwa, S.F.H e Sharp, J.M. (2001). Risk Factors Associated with the Occurrence of Bovine Tuberculosis in Cattle in Southern Highlands of Tanzania. *Veterinary Research Communications*, 25: 609-614.
- Kazwala, R.R., Daborn, C.J., Sharp, J.M., Kambarage, D.M., Jiwa, S.F.H. e Mbembati, N.A. (2001b). Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases of cervical adenitis in Tanzania: a cause for concern? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 5(1): 87-91.
- Koivula, T. (2004). Clinically Important Mycobacteria In Guinea-Bissau, West Africa- phenotypic and genetic diversity. Swedish Institute For Infectious Disease Control, Stockholm.
- Kobzik, L. (1999). The lung. In Robbin's pathologic basis of diseases. 6a ed. W. B. Saunders Co. Filadelfia. pp. 1462-1464.
- Kremer, K., Bunschoten, A., Schouls, L., Van Soolingen, D. e Van Emben, J. (2002). *SPOLIGOTYPING*- a PCR based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria, National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, The Netherlands.

- Lutze-Wallace, C., Turcotte, C., Sabourin, M., Berlie-Surujballi, G., Barbeau, Y., Watchorn, D, e Bell, J. (2004). *Spoligotyping* of *Mycobacterium bovis* isolates found in Manitoba- Short communication. The Canadian Journal of Veterinary Research, 69: 143-145.
- MAE - Ministério de Administração Estatal (2005). Perfis distritais de Moçambique. Edição em CD. Moçambique.
- Malik, A.N.J. e Godfrey-Faussett, P. (2005). Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. Htt://infection.TheLancet.com., 5: 174-183.
- Mancilla, M., Martinez, A., Palavecino, C.B., Rehren S., Lucero, P.L., Leon, G.R., e Zarraga, O.M. (2006). Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la Xa Región de Chile. Rev. Chil. Infect., 23(3): 220-225.
- Marcondes, A.G., Shikama, M.L., Vasconcellos, S.A. e Pinheiro, S.R. (2006). Comparação entre técnicas de cultivo em camada delgada de agar Middlebrook 7H11 e meio Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. Braz. J.Vet. Res. Anim. Sci., 43(3): 362-369.
- Merkal, R.S. e Wipple, D.L. (1980). Inactivation of *Mycobacterium bovis* in meat products. Applied and Environmental Microbiology, 38: 827-835.
- MIGAG-DNE (2006). Trabalho de Inquérito Agrícola de 2005-TIA. Maputo, Moçambique.
- Millian-Suazo, F., Band-Ruiz, V., ramirez-Casillas, C., Arriaga-Diaz, C. (2002). Genotyping of *Mycobacterium bovis* within Mexico. Prev. Vet. Med., 55: 255-264.
- MISAU- PNCT (2003). Manual de Tuberculose. Ministério de Saúde. Moçambique.
- MISAU-DNS (2005). Relatório Sobre a Revisão dos Dados de Vigilância Epidemiológica do HIV-Ronda 2004. Programa Nacional de Controlo das DTS/SIDA. p 23.
- Mishra, A., Singhal, A., Chauhan, D.S., Katoch, V.M., Srivastava, K., Thakral, S.S., Bharadwaj, S., Sreenivas, V. e Prasas, H.K. (2005). Direct Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in Bovine Samples by a Novel Nested PCR Assay: Correlation with Conventional Techniques. Journal of Clinical Microbiology, 43(11): 5670-5678.
- Moda, G., Darbon, G.J., Grange, J.M. e Cosivi, O. (1996). The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. Tuber. Lung. Dis., 77(2): 103-8.

- Montali, R.J., Mikota, S.K., Cheng, L.I. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. In Infecciones micobacterianas en animales domésticos y salvajes. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 20 (1): 291-303.
- Morgado, F.P. (2004). A pecuária no centro de Moçambique, as provincias de Zambézia, Tete, Manica e Sofala. Ed. Nova Vaga Lda.
- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U., Jackson, R. (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection. Vet. Microbiol., 40: 153-177.
- Mostowy, S., Cousins, D., Brinkman, J., Aranaz, A. e Behr, M.A. (2002). Genomic Deletions Suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. The Journal of Infectious Diseases, 186: 74-80.
- Mucavele, C. (2006). Caracterização das estirpes envolvidas em casos de Tuberculose bovina no Distrito de Buzi-Sofala, Relatório-Fase preliminar, Departamento de Para-clínicas, Faculdade de Veterinária-UEM, Moçambique.
- Murray, M. e Nardell, E. (2002). Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. Bull World Health Organ., 80 (6): 477-482.
- Nafeh, M.A., Medhat, A., Abdul-Hameed, A.G., Rashwan, N.M., Strickland, G.T.(1992). Tuberculous peritonitis in Egypt: the value of laparoscopy in diagnosis. Am. J.Trop.Med.Hyg, 47:470-477
- Narayanan, S. (2004). Molecular epidemiology of tuberculosis. Review article. Indian J. Med. Res., 120(1): 233-242.
- Neto, J.S.F. e Bernardi, F. (2003). O controle da tuberculose bovina. Higiene Alimentar 17(109): 25-31. Publicação online www.bichoonline.com.br/artigos
- Nicol, M.P., Sola, C., February, B., Rastogi, N., Steyn, L. e Wilkinson, R.J. (2005). Distribution of Strain Families of *Mycobacterium tuberculosis* Causing Pulmonary and Extra pulmonary Disease in Hospitalized Children in Cape Town, South Africa, Journal of Clinical Microbiology, 43(11): 5779-81.
- Niemann, S., Rusch-Gerdes, S., Joloba, M.L., Whalen, C.C., Guwatudde, D., Ellner, J.J., Eisenach, K., Fumokong, N., Johnson, J.L., Aisu, T., Mugerwa, R.D., Okwera, A., Schawander, S.K. (2002). *Mycobacterium africanum* sotype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda. Journal of Clinical Microbiology, 40: 3398-3405.

- Nunes, E.A. (2005). Tuberculose Pulmonar e Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV): Aspectos epidemiológicos e clínicos em Moçambique. Tese de Doutorado. Fac. de Ciências Médicas, Univ. Estadual de Campinas, Brasil.
- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Fierke, J.S., Hogle, S.A., Winterstein, S.R., Cooley, T.M., Moritz, W.E., Diesel, K.L., Fitzgerald, S.D., Berry, D.E., Kaneene, J.B. (2002). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995-2000. *Prev. Vet. Med.*, 54: 47-63.
- Ocepek, M., Pate, M., Zolnir-Dovc, M. e Poljak, M. (2005). Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from Human to Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7): 3555-3557.
- OIE (2007). WAHID interface - Animal Health Information. Organização Internacional de Saúde Animal. Em www.oie.int/wahid-prod/, página acedida a 11/10/07.
- OMS (2004). Manual de Segurança Biológica em Laboratório. Terceira edição. Organização Mundial de Saúde. Genebra.
- Pelczar, M., Chan, E., Krieg, N. (1993). *Microbiology concepts and applications*. McGraw-Hill, New York, p. 896
- Puustinen, K., Marjamaki, M., Rastogi, N., Sola, C., Filliol, I., Ruutu, P., Holmstrom, P., Viljanen, M.K. e Soini, H. (2003). Characterization of Finnish *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by *Spoligotyping*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4): 1525-28.
- Razanamparany, V.R., Qurin, R., Rapaoliarijaona, A., Rakotoaritahina, H., Vololonirina, E.J., Rasolonavalona, T., Ferdinand, S., Sola, C., Rastogi, N., Ramarokoto, H., Chanteau, S. (2005). Usefulness of Restriction Fragment Length Polymorfism and *Spoligotyping* for epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* in Madagascar: Description of new genotype. *Veterinary Microbiology*, 114 (1,2): 1-8.
- Reischl, U. (1994). *Molecular diagnosis of Infectious Diseases*. Humana Press & Totoni. New Jersey. USA. pp. 143-168.
- Robert, J., Boulahbal, F., Trystram, D., Truffot-Pernot, C., de Benoist, A.C., Vincent, V., Jarlier, V. e Grosset, J. (1999). A national survey of human *M. bovis* infection in France: network of microbiology laboratories in France. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 3: 711-714.
- Roring, S., Scott, A.N., Hewinsen, R.G., Neill, S. e Skuce, R. (2004). Evaluation of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) loci in molecular typing of

- Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Veterinary Microbiology*, 102(1): 65-73.
- Rothschild, B.M., Martin, L.D., Bercovier, H., Bar-Cal, G.K. e Brittain, D. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 305-11.
- Roxo, E., Ikuno, A.A., Ferreira, V.C.A., Harakava, R., Roggiro, A. e Vialta, A. (2002). Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA de *Mycobacterium bovis* a partir de leite. *Arquivos do Instituto Biológico. Suplemento*, São Paulo, 69: 46.
- Sakamoto, S.M., Heinemann, M.B., Telles, M.A., Roxo, E., Richtzenhain, L.J., Vasconcellos, S.A. e Ferreira Neto, J.S. (1999). Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reacção em cadeia de polimerase (PCR). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 66 (2): 44-58.
- Sales, M.P.U., Taylor, G.M., Huglhes, S., Yates, M., Hewinson, G., Young, D.B. e Shaw, R.J. (2001). Genetic Diversity among *Mycobacterium bovis* Isolates: a preliminary Study of Strains from animal and Human sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (12): 4558-62.
- SANCO (2005). Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedstuffs, food and man in European Union and Norway in 2003. European Commission. SANCO/339/2005.
- Scott, A.N., Menzies, D., Tannenbaum, T., Thibert, L., Kozak, R., Joseph, L., Schwartzman, K. e Behr, M.A. (2005) Sensitivities and Specificities of *Spoligotyping* and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable- Number Tandem Repeat Typing Methods for Studying Molecular Epidemiology of Tuberculosis, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1): 89-94.
- Serraino, A., Marchetti, G., Sanguinetti, V., Rossi, M.C., Zanoni, R.G., Catozzi, L., Bandera, A., Dini, W., Mignone, W., Franzetti, F., Gori, A. (1999). Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2766-2771.
- Siddiqui, K., Lambert, M.L. e Walley, J. (2003). Clinical diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence, *The Lancet, Infectious Diseases*, 3: 288-295.

- Shah, N.P., Singhal, A., Jain, A., Kumar, P., Uppal, S.S., Srivatsava, M.V.P. e Prasad, H.K. (2006). Occurrence of Overlooked Zoonotic Tuberculosis: Detection of *Mycobacterium bovis* in Human Cerebrospinal Fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4): 1352-58.
- Skuce, R.A. e Neill, S.D. (2001). Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: exploiting molecular data. *Tuberculosis*, 81(1/2): 169-75.
- Smith, R., Drobniewski, F., Gibson, A., Montague, J., Logan, M., Hunt, D., Hewison, G., Salmon, R., O'Neill, B. (2004). *Mycobacterium bovis* infection, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.*, 10: 539-541.
- Sola, C., Filliol, I., Gutierrez, M.C., Mokrouov, I., Vincent, V. e Rastogi, N. (2001). Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: Biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg. Infect. Dis.*, 7: 390-96.
- Serviços Provinciais de Pecuária-SPP. Maputo (2006). Dados sobre tuberculização de 2005- Província de Maputo.
- Srikantiah, P., Charlebois, E. e Havlir, D.V. (2005). Rapid Increase in Tuberculosis Incidence Soon after Infection with HIV- A New Twist in the Twin Epidemics. *JID*, 191: 147-149.
- Suffys, P., Vanderborght, P.R., dos Santos, P.B., Correia, L.A.P., Bravin, Y. e Kritski, A.L. (2001). Inhibition of the polymerase chain reaction by sputum samples from tuberculosis patients after processing using a silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure. Short communication. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 96(8): 1137-39
- Teklu, A., Asseged, B., Yimer, E., Gebeyehu, M. e Woldesenbet, Z. (2004). Tuberculosis lesions not detected by routine abattoir inspection. The experience of Hossana Municipal Abattoir, Southern Ethiopia. *Rev. Sci. Tech of Int. Epiz.*, 23 (3): 957-64.
- Van den Brande, P., Vanhoenacker, F. e Demedts, M. (2003). Tuberculosis at the beginning of the third millennium: one disease, three epidemics. *Eur. Radiol.*, 13: 1767-1770.
- Van Embden, J.D.A., Cave, D.M., Crawford, J.W., Dale, J.W., Eisenach, B., Gicquel, B., Hermanus, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T.M. e Small, P.M. (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting:

- recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 406-409.
- Van Embden, J.D.A., Van Gorkom, T., Jansen, K., Van der Zeijst e Schouls, L.M. (2000). Genetic variation and evolutionary origin of the Direct Repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 182: 2393-2401.
- Van Soolingen, D. (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine*, 249: 1-26.
- Warren, R.M. (2007). Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in regions of Southern Africa. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 11(3): 311-318.
- Wedlock, D.N., Skinner, M.A., Lisle, G.W. e Buddle, B.M. (2002). Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect.*, 4: 471-480.
- Weyer, K., Fourie, P.B., Durrheim, D., Lancaster, J., Haslov, K. e Bryden, H. (1999). *Mycobacterium bovis* as a zoonosis in Kruger National Park, South Africa. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3(12): 1113-19
- Wyplosz, B., Truffot-Pernot, C., Robert, J., Jarlier, V. e Grosset, J. (1997). Bactériologie de la tuberculose et des infections à mycobactéries non tuberculeuses. *Revue. Mal. Respir*, 14: 33-48.
- WHO (1994). Zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) memorandum from a WHO meeting with the participation of FAO. *Bull World Health Organ.*, 74: 851-7.
- WHO e International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (2000). Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World. Report No2 - Prevalence and Trends. Document WHO/CDC/TB. Geneva, World Health Organization/IUATLD: 278.
- WHO (2005). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report (WHO/HTM/TB/2005.349), Geneva
- WHO (2006). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report (WHO/HTM/TB/2006.362), Geneva.
- WHO (2006-b). TB/HIV Partnership. www.who.int/tb/hiv/en/ acedida a 1-11-2006.

- WHO (2007). WHO Report – Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2007, Geneva.
- World Medical Association. (1997). Declaration of Helsinki. JAMA; 277(11):925-926.
- Young, D.B. (2004). Ten years of research progress and what's to come. Tuberculosis, 83: 77-81.
- Zumáranga, M., Martin, C., Samper, S., Alito, A., Latini, O., Bigi, F., Roxo, E., Cicuta, M.E., Errico, F., Ramos, M.C., Cataldi, A. Van Soolingen, D. e Romano, M.I. (1999). Usefulness of *Spoligotyping* in molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*- Related Infections in South America. Journal of Clinical Microbiology, 37(2): 296-303.

ANEXOS

ANEXO I. CONCEITOS BÁSICOS APLICÁVEIS EM MICOBACTERIOLOGIA MOLECULAR (CDC, 2007)

Genotipo: Designação que resulta de uma ou mais das três técnicas moleculares usadas para o *M. tuberculosis*, nomeadamente: *Spoligotyping*, MIRU analysis e IS6110-RFLP.

“Cluster”: Constitui um *cluster* dois ou mais isolados de *M. tuberculosis* que possuem o genotipo comum. Um *cluster* epidemiológico são dois ou mais indivíduos com TB com relações epidemiológicas conhecidas.

Estirpe endémica: Uma estirpe de *M. tuberculosis* que circula numa população relativamente circunscrita por muitos anos. Indivíduos infectados com a estirpe endémica geralmente não estão envolvidos numa cadeia comum de transmissão recente (nos 2 anos anteriores).

Genotipo único (genotipo não compartilhado): Designação do genotipo que não possui mesmo padrão que nenhum outro isolado de TB na mesma base de dados.

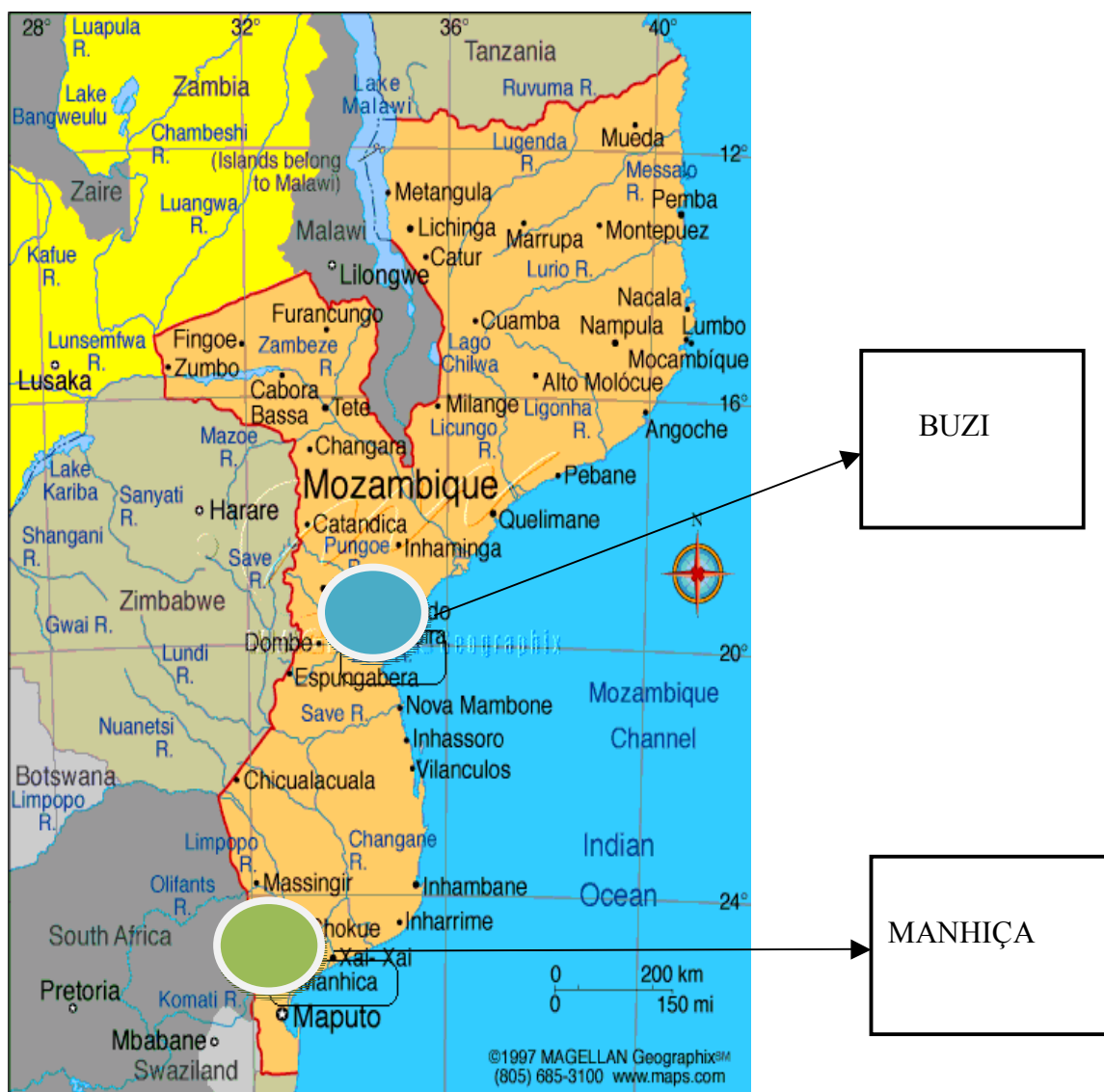
Contacto próximo: Indivíduo que compartilha o mesmo espaço de ar com outro doente.

Cadeia de transmissão recente: Indivíduos com TB que se transmitiram o *M. tuberculosis* recentemente. A genotipificação fornece informação adicional às ligações epidemiológicas tradicionais na definição de cadeias de transmissão recente uma vez que indivíduos envolvidos na mesma cadeia de transmissão quase sempre apresentam isolados de *M. tuberculosis* com genotipos comuns.

Transmissão recente: Transmissão de TB que tenha ocorrido num passado recente ao contrário da reactivação de uma infecção latente. Apesar de o período de tempo que distingue a TB resultante a transmissão “recente” e a resultante da reactivação de infecção não estar bem definido, geralmente é definida como “recente” quando a transmissão é dentro de dois anos.

Reinfecção vs. Relapso: Um caso de relapse de TB, representa o agravamento de uma infecção depois de um período de melhoria e é causada pela mesma estirpe de *M. tuberculosis*. Designa-se reinfecção nos casos de TB causada por uma segunda infecção por uma estirpe diferente da envolvida na infecção inicial. A genotipificação do par de isolados inicial e subsequente pode fazer a distinção das duas possibilidades.

ANEXO III. MAPA DE MOÇAMBIQUE E AS REGIÕES ESTUDADAS



ANEXO IV. FICHA DE RECOLHA DE DADOS DOS DOENTES

Ficha de Colheita de Dados

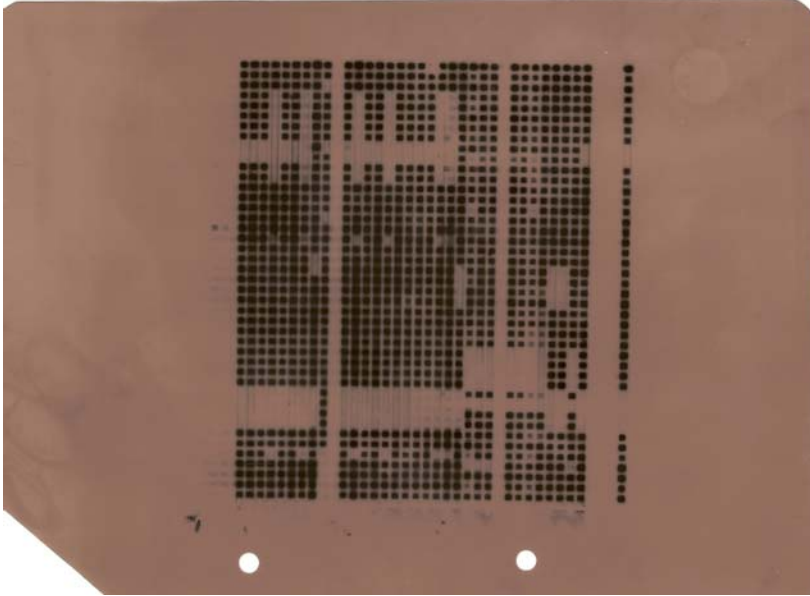
BOVIS

Ficha Número _____

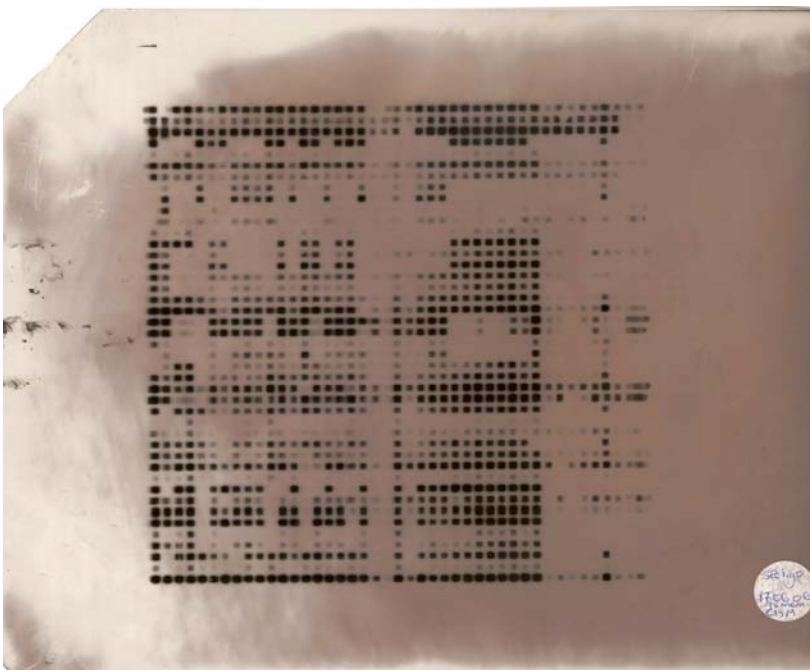
Data / / _____

Identificação	
Nome _____	Idade (em anos)
Sexo _____	1-Masculino; 2-Feminino
Raça _____	1-Negra; 2-Branca; 3-Outras
Educação <input type="checkbox"/>	1-analfabeta 2- primária 3-secundária
Naturalidade _____	1-Maputo 2-Gaza 3-Inhambane 4-Sofala 5-Manica 6-Tete 7-Zambezia 8-Nampula 9-Cabo Delgado 10-Niassa 11-Estrangeira 12-Sem Informação
Residência nos últimos 2 anos Região rural cidade	1-Maputo 2-Gaza 3-Inhambane 4-Sofala 5-Manica 6-Tete 7-Zambezia 8-Nampula 9-Cabo Delgado 10-Niassa 11-Estrangeira 12-Sem Informação
Viagens Recentes Províncias Estrangeiro Ocupação Mineiro	1-Sim 2-Não Se Não salte para a secção seguinte 1-Sim 2-Não 1-Sim 2-Não 1-Sim 2-Não
Antecedentes	
Tratamento anterior de tuberculose	1-Sim 2-Não
Silicose	1-Sim 2-Não
Alimentação	
Bebe leite	1- Sim 2- Não

ANEXO V. IMAGEM DE PADRÕES DE HIBRIDIZAÇÃO USANDO DUAS
MATRIZES DIFERENTES COMO FONTE DE ADN



A - CULTURA EM AGAR



B - AMOSTRAS CLÍNICAS

