

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**APLICAÇÃO DE UMA mPCR PARA DETECÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS DIRETAMENTE DE
LESÕES BOVINAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE
PROVENIENTES DE MATADOURO-FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO
ESTADUAL NO ESTADO DA BAHIA**

ÉVELIN SANTIAGO VASCONCELOS DOS SANTOS

CRUZ DAS ALMAS- BAHIA

AGOSTO - 2014

**APLICAÇÃO DE UMA mPCR PARA DETECÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS DIRETAMENTE DE
LESÕES BOVINAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE
PROVENIENTES DE MATADOURO-FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO
ESTADUAL NO ESTADO DA BAHIA**

ÉVELIN SANTIAGO VASCONCELOS DOS SANTOS

Médica Veterinária

Universidade Federal da Bahia, 2009

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

Co-orientador: Dr. Robson Bahia Cerqueira

CRUZ DAS ALMAS- BAHIA

AGOSTO – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

S237a Santos, Evelin Santiago Vasconcelos dos
Aplicação mPCR para detecção e identificação de
microbactérias diretamente de lesões bovinas suspeitas de
tuberculose provenientes de matadouro-frigorífico sob inspeção
estadual no Estado da Bahia / Evelin S. V. Santos. - Cruz das
Almas, BA, 2014.
131f.; il.

Orientador: Prof. Drº Alexandre Moraes Pinheiro
Coorientador: Profº Drº Robson Bahia Cerqueira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo
da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas -
CCAAB.

1. Bovino - Doenças. 2. Tuberculose - Bovino. I. Universidade
Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,
Ambientais e Biológicas - CCAAB. II. Título.

CDD: 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

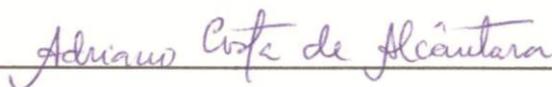
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
ÉVELIN SANTIAGO VASCONCELOS DOS SANTOS



Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

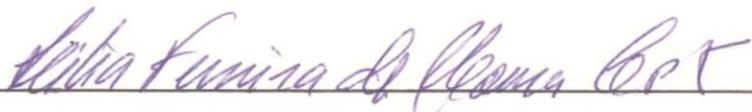
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

(Orientador)



Dr. Adriano Costa de Alcântara

Hospital São Rafael



Profa. Dra. Lília Ferreira Moura Costa

Universidade Federal da Bahia

CRUZ DAS ALMAS- BAHIA

AGOSTO - 2014

*Dedico esta dissertação ao meu filho João Gabriel,
por quem tenho um amor incondicional e que faz cada dia da minha vida
melhor. A minha família, em especial a minha mãe, pelo amor imensurável, um
elo inquebrável e ao meu esposo, simplesmente por existir.*

Amo vocês demais!

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos não me faltam!

Ao Senhor **DEUS**, fonte maior de força, por ter me presenteado com uma vida abençoada, cheia de momentos inesquecíveis e por não ter me deixado cair nos momentos difíceis deste mestrado diante das inúmeras adversidades;

A minha família em especial meus irmãos e minha cunhada pelo carinho e pela torcida, que se pudessem estariam fisicamente ao meu lado em todas as etapas deste caminho;

A minha mãe, pela preocupação constante com a realização do mestrado e dedicação intensa em absolutamente TODOS os momentos da minha vida, você é o meu porto seguro;

Ao meu filho, que ainda dentro do ventre contribuiu dando-me coragem e iluminando meus dias sem nunca, nunca, nunca ter me atrapalhado ainda que tão pequeno. Você filho é a MELHOR coisa do mundo e um verdadeiro presente Deus, obrigada por não me deixar desanimar;

Ao meu esposo, pela paciência e compreensão de muitos momentos ausentes e de outros tantos de desespero. Por todo companheirismo na logística desta pesquisa e também por simplesmente existir na minha vida. Amo você;

Ao orientador Prof. Robson Bahia Cerqueira, pela orientação, oportunidade e paciência, além do fato de sempre ter acreditado neste projeto;

Ao professor Alexandre M. Pinheiro pelo apoio, incentivo, carinho, amizade e exemplo de profissionalismo, pelos conselhos como professor e pesquisador; meus mais sinceros agradecimentos, seu apoio foi muito importante;

Aos professores Jerônimo, Adriana e Ludmilla pela torcida e todo apoio.

À Prof^a Sabrina Gregio a quem muito admiro, por todo embasamento imprescindível na execução e elaboração deste projeto, por todos os ensinamentos, pela amizade, por todo apoio emocional, por ter me apresentado o fascinante mundo da biologia molecular, muito obrigada;

À equipe do LDI, importante cooperação e certeza de novos frutos, pelo grande apoio e amizade;

Ao laboratório de patologia clínica pelos inúmeros empréstimos de material;

Aos importantes aliados Ítala e Adriano, sem vocês o sonho do mestrado seria muito mais difícil. Muito obrigadaaaaaaaaaa mesmo! Vocês foram FUNDAMENTAIS;

À Fernando Alzamora pelo controle positivo utilizado;

À toda inspeção veterinária, nos nomes dos Médicos Veterinários Dr. Leonardo e Dr. Gregório por possibilitarem a realização do projeto;

A toda equipe dos estabelecimentos em questão pela colaboração em cada detalhe das coletas;

Aos membros da Banca Examinadora, pelas sugestões e contribuições apresentadas;

A todos os amigos feitos na UFRB, em especial Marilice, Luciana e Aline por estarem ao meu lado todo o tempo apoiando inclusive no período de gravidez e amamentação;

Aos colegas de mestrado e funcionários da UFRB;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em especial toda a equipe do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal;

À FAPESB, pelo importante auxílio financeiro;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização do presente trabalho. Meu muito obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE QUADROS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	14

RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO DE LITERATURA.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

Capítulo 1

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA <i>Mycobacterium</i> DIRETAMENTE DE AMOSTRAS GRANULOMATOSAS DE BOVINOS APROCEDENTES DE FRIGORÍFICO NA BAHIA.....	64
Introdução.....	65
Materiais e métodos.....	66
Resultados e Discussão.....	67
Referências.....	71

Capítulo 2

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE mPCR DIRETAMENTE DE AMOSTRAS GRANULOMATOSAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE ORIUNDAS DE BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO NA BAHIA	73
Resumo.....	74
Abstract.....	75
Introdução.....	76
Materiais e métodos.....	78
Resultados e Discussão.....	83
Conclusões.....	91
Referências.....	92

Capítulo 3

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE GRANULOMAS SUSPEITOS DE TUBERCULOSE ORIUNDOS DE FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO ESTADUAL NA BAHIA	100
Resumo.....	101
Abstract.....	102
Introdução.....	103
Materiais e métodos.....	105
Resultados e Discussão.....	111
Conclusões.....	121
Referências.....	122

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	131
AGRADECIMENTOS.....	131

LISTA DE FIGURAS

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE mPCR DIRETAMENTE DE AMOSTRAS GRANULOMATOSAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE ORIUNDAS DE BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO NA BAHIA

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose. Perfil de amplificação de amostras colhidas direto do material de granulomas bovinos. Linha M, marcador molecular (100 bp *ladder*); linha 1, controle positivo *M. bovis*; linha 1, controle positivo *M. bovis*; linha 2, amostra positiva; linha 4, controle negativo; linhas 3, 5, 6 e 7, amostras negativas.87

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose. Perfil de amplificação de amostras colhidas direto do material de granulomas bovinos. Linha 1, controle positivo *M. tuberculosis*; linhas 2, controle positivo *M. bovis*; linhas 3 e 4 amostras positivas; linha 5, controle negativo; linha 6, amostra negativa e linha M, marcador molecular (100 bp *ladder*).87

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE GRANULOMAS
SUSPEITOS DE TUBERCULOSE ORIUNDOS DE FRIGORÍFICO SOB
INSPEÇÃO ESTADUAL NA BAHIA

Figura 1. Achado de lesão sugestiva de tuberculose. Linfonodo mesentérico bovino com massa granulomatosa de consistência pastosa e cor amarelada.113

Figura 2. Achado de lesão sugestiva de tuberculose. Linfonodo pré- escapular bovino, com forma arredondada, bem delimitada, cor amarelada e consistência firme.113

Figura 3. Achado de lesão sugestiva de tuberculose. Linfonodo pulmão bovino, com forma arredondada, massa granulomatosa de consistência pastosa e cor amarelada.....113

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose. Perfil de amplificação de amostras colhidas direto do material de abscessos bovinos. Linha M, marcador molecular (100 bp *ladder*); linha 1, controle positivo *M. tuberculosis*; linha 2, controle positivo *M. bovis*; linhas 3 e 4, amostras positivas; linha 5, controle negativo; linhas 7 e 8, amostras negativas.117

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose. Perfil de amplificação de amostras colhidas direto do material de abscessos bovinos. Linha 1, controle positivo *M. bovis*; linhas 2, 3, 5 e 7 amostras negativas; linhas 4 e 6, amostras positivas e linha 8, controle negativo.118

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Lista de *primers* com o tamanho dos produtos de amplificação correspondentes indicando a presença ou ausência da região de diferença em 5 diferentes membros do complexo *Mycobacterium*.
.....82 e 110

LISTA DE TABELAS

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA *Mycobacterium*
DIRETAMENTE DE AMOSTRAS GRANULOMATOSAS DE BOVINOS PROCEDENTES
DE FRIGORÍFICO NA BAHIA

Tabela 1. Resultados da leitura em aparelho nanodrop *Thermo Scientific 2000c*
do DNA extraído direto do granuloma bovino.67

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE mPCR DIRETAMENTE DE AMOSTRAS GRANULOMATOSAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE ORIUNDAS DE BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO NA BAHIA

Tabela 1 - Resultado de isolados identificados como *M. bovis* ou *M. tuberculosis* a partir de granulomas bovinos oriundos de frigorífico da região do Recôncavo da Bahia83

Tabela 2 - Localização da lesão e origem do animal com granulomas bovinos oriundos de frigorífico da Região do Recôncavo da Bahia84

Tabela 3 - Resultado das amostras positivas para *M. bovis* no PCR *multiplex* direto do material caseoso de lesões suspeitas para o diagnóstico da tuberculose bovina de frigorífico da Região do Recôncavo da Bahia86

Tabela 4- Resultado do mPCR e do isolamento de material granulomatoso de lesões suspeitas de tuberculose oriundo de frigorífico da Região do Recôncavo da Bahia..... 89

Tabela 5 - Comparação do isolamento com PCR *multiplex* direto do material granulomatoso de lesões suspeitas para o diagnóstico da tuberculose bovina de frigorífico da Região do Recôncavo da Bahia90

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE GRANULOMAS SUSPEITOS DE TUBERCULOSE ORIUNDOS DE FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO ESTADUAL NA BAHIA

Tabela 01 - Resultado de isolados identificados como *M. bovis* ou *M. tuberculosis* a partir de granulomas bovinos oriundos de frigorífico da região Sudoeste da Bahia111

Tabela 2. Características histopatológicas de granulomas bovinos positivos no exame bacteriológico oriundos de frigorífico da Região Sudoeste da Bahia112

Tabela 3. Características epidemiológicas de abscessos bovinos positivos no exame bacteriológico oriundos de frigorífico da Região Sudoeste da Bahia113

Tabela 4. Resultado do mPCR a partir de material granulomatoso para 5 diferentes espécies analisadas dentre as amostras positivas no exame bacteriológico oriundos de frigorífico da Região Sudoeste da Bahia.....117

Tabela 5. Comparação do PCR *multiplex* direto do granuloma com o isolamento para o diagnóstico da tuberculose bovina de frigorífico da Região Sudoeste da Bahia.....119

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AG85	Antígeno micobacteriano AG85
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
pb	pares de bases
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	dinucleotídeotrfosfatos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)
ESAT-6	“Early Secretory Antigenic Target 6-kDa”
FS	Fortemente sugestiva
GLM	Modelos lineares generalizados
HE	Hematoxilina - eosina
HPC	Cetyridinium chloride monohydrate
IgG	Imunoglobulina G
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LDI	Laboratório de Doenças Infecciosas
LPV	Laboratório de Patologia Veterinária
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPB70	Antígeno micobacteriano MPB70
MPB83	Antígeno micobacteriano MPB83
mPCR Chain	Reação em Cadeia da Polimerase multiplex (“Multiplex Polymerase Reaction”)
MHC Histocompatibility	Complexo Principal de Histocompatibilidade (“Major Histocompatibility Complex”)

MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAOH	Hidróxido de sódio
NK cell	Célula Natural Killer
Ph	Potencial hidrogeniônico
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	“Purified protein derivative”
RD	Região de Diferença
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
TB	Tuberculose
TBE	Tris Borato EDTA
TCC	Teste Cervical Comparativo
TCD4	Receptores envolvidos na restrição de MHC e ativação das células T
TCD8	Receptores envolvidos na restrição de MHC e ativação das células T
USP	Universidade de São Paulo
ZN	Ziehl-Neelsen

APLICAÇÃO DE UMA mPCR PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS DIRETAMENTE DE LESÕES BOVINAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE PROVENIENTES DE MATADOURO-FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO ESTADUAL NO ESTADO DA BAHIA

Autor: Évelin Santiago Vasconcelos dos Santos

Orientador: Dr. Robson Bahia Cerqueira

RESUMO:

Tem sido amplamente estudados ensaios de investigação molecular para diagnóstico da tuberculose bovina. Estes métodos vem possibilitar maior agilidade e possuem alta sensibilidade e alta especificidade além de permitirem realização de diagnóstico diferencial entre doenças e identificação precisa do agente etiológico que é de grande importância para a epidemiologia, tratamento e prognóstico especialmente na saúde pública. O trabalho objetivou associar recurso complementar ao exame *post mortem* em matadouro frigorífico através de PCR *multiplex* realizado a partir diretamente do material caseoso coletado em dois frigoríficos do estado da Bahia sob inspeção estadual. Foram analisadas 74 amostras de bovinos. No Sudoeste foram analisadas 61 linfonodos suspeitos de bovinos abatidos em frigorífico sob inspeção estadual resultando em 4,92% das amostras positivas no isolamento e 18% no mPCR para *M. bovis*. No Recôncavo foram analisadas 13 amostras de bovinos suspeitos resultando em 61,54% de positivas ao isolamento sem diferença estatisticamente significativa para o ensaio molecular que detectou 54% de *M. bovis*. Para ambos os estabelecimentos, o mPCR ser viável atestando expressiva vantagem de divulgar resultado dentro de um período máximo de 48h, capacidade de detectar várias espécies em uma única reação, não depender da cultura bacteriana além de não necessitar do micro-organismo vivo para positivar o diagnóstico. Todo DNA extraído evidenciou boa concentração na extração e adequado grau de pureza. Os resultados indicam que o protocolo mostrou-se eficaz, rápido e bastante promissor na vigilância em matadouro.

Palavras chave: tuberculose, *M. bovis*, mPCR

APPLICATION OF A MPCR FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA DIRECTLY FROM INJURIES OF SUSPECTED BOVINE TUBERCULOSIS FROM SLAUGHTERHOUSE UNDER STATE INSPECTION IN THE STATE OF BAHIA

Author: Évelin Santiago Vasconcelos dos Santos

Advisor: Dr. Robson Cerqueira Bahia

ABSTRACT:

Bovine tuberculosis diagnosis has been widely studied by molecular assays. These methods have enabled greater agility, high sensitivity and specificity. Furthermore allow differential diagnosis between diseases and accurate identification of the etiologic agent which is of great importance to the epidemiology, treatment and prognosis especially in public health. The aim of this study was to associate as additional resource to the *post-mortem* examination in a slaughterhouse, a multiplex PCR performed directly from the cheesy material collected in two slaughterhouses under inspection in Bahia state. Seventy-seven samples of cattle were analyzed. In Southwest sixty-one suspect cattle lymph nodes were analyze, resulting in 4.92% positive samples in isolation and 18% in mPCR for *M. bovis*. In Reconcavo 13 cattle suspected samples were analyze resulting in 61.54% positive isolation with no significant statistical difference in the molecular assay where was detected 54% of *M. bovis*. For both, the mPCR is viable attesting significant advantage to disclose results within a maximum period of 48 hours, ability to detect multiple species in a single reaction, not depend on bacterial culture and does not require the living micro-organism to make positive the diagnosis. DNA showed good concentration on the extraction and appropriate purity. The results indicate that the protocol was effective, fast and very promising in slaughterhouse vigilance.

Keywords: Tuberculosis, *M. bovis*, MPCR

1. INTRODUÇÃO

Doença infecciosa antiga, a tuberculose é uma zoonose de ocorrência mundial. A forma resistente a medicamentos é a maior preocupação, além da epidemia especialmente associada a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), em muitos casos, a resposta dos países a este desafio é inadequada. O relatório mais recente calcula que aproximadamente 450 mil pacientes têm o tipo de tuberculose resistente (WHO, 2013).

Nos bovinos, é uma enfermidade determinada pelo agente *Mycobacterium bovis* que gera importantes prejuízos econômicos (LAGO, 2013) e riscos à saúde da população humana que consome produtos de origem animal (MORATO, 2007; DE LA RUA-DOMENECH, 2006). Quando infectado pelo *M. bovis*, o quadro clínico no homem é indistinguível do quadro causado pelo *Mycobacterium tuberculosis* (POLLOCK e NEILL, 2002; WEDLOCK, 2002; DE LA RUA-DOMENECH, 2006) e a baciloscopia do escarro, metodologia empregada usualmente no Brasil para o diagnóstico da doença nos humanos, é ineficaz nesta distinção entre as duas espécies (KANTOR e RITACCO, 1994; USABIAGA, 2001).

Ribeiro, Lobato e Abreu (2003) e Ávilla et al (2013) ressaltam que o aspecto epidemiológico da enfermidade em bovinos no Brasil demonstra dados escassos e distintos dependendo do local pesquisado em virtude da grande dimensão territorial e características de criação próprias de cada região. Em um levantamento mais recente, a estimativa da prevalência de animais doentes no Brasil foi de 0,83%, sendo que a região Centro-Oeste apresentou a menor

prevalência de 0,37% dentre as regiões brasileiras (ROXO, 2004; KANTOR E RITACCO, 2006).

Lilenbaum (2000), Pacheco et al (2009) descrevem que os métodos mais confiáveis de diagnóstico são os diretos, no entanto, a dificuldade de obtenção de amostras *in vivo* torna pouco viável sua utilização rotineira. Assim, a investigação da infecção em bovinos tende a ser realizada através de métodos indiretos como os testes imunológicos, a exemplo do teste de hipersensibilidade. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2006), a grande inespecificidade dos sinais clínicos, a dificuldade de isolamento do *M. bovis* no animal vivo e o baixo nível de anticorpos durante o período inicial da infecção fazem com que os diagnósticos clínico, bacteriológico e sorológico tenham um valor relativo apesar do teste padrão ser o isolamento. O MAPA preconiza, ainda, que existem técnicas adequadas para o desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, entretanto, não existe um método diagnóstico que tenha uma eficácia absoluta.

Furlanetto et al (2012); Fráguas (2008) e Cosivi (1998) afirmam que para um diagnóstico eficaz da infecção, junto ao método de isolamento do micro-organismo, existe a necessidade do uso de técnicas complementares. Com o advento da biologia molecular, novas técnicas têm sido estabelecidos para colaborar na identificação do agente como a Reação em cadeia da polimerase (PCR) que, conforme Zanini *et al.* (2001) e Cardoso *et al.* (2009) possibilita maior agilidade no diagnóstico, possuindo alta sensibilidade e alta especificidade detectando, ainda, quantidades muito pequenas de bacilos nas amostras coletadas ainda que inviáveis (SAKAMOTO et al., 1999; ZANINI et al., 2001). Alguns testes, como o de Warren et al (2006) utilizando uma PCR *multiplex* para identificação de espécies do gênero *Mycobacterium* se tornam indicados em propostas de inspeção e laboratórios de rotina especialmente quando acontecem diretamente do material caseoso dispensando o trabalhoso exame bacteriológico.

Observa-se que para a comprovação da referida enfermidade é primordial a identificação da micobactéria, sendo relevante a investigação das espécies e suas prevalências, considerando ambientes nos quais a tuberculose humana e bovina

coexistem, podendo-se assim, determinar o risco da infecção e suas implicações zoonóticas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar detecção e identificação de micobactérias em amostras de bovinos a partir de lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose em carcaças inspecionadas em frigorífico sob regime de inspeção estadual localizado na Bahia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Verificar a ocorrência de *Mycobacterium bovis* e *M. tuberculosis* em material coletado de frigorífico em lesões suspeitas através da cultura em matadouros frigoríficos dos municípios de Vitória da Conquista - Ba e Santo Antônio de Jesus - Ba;

✓ Avaliar protocolo de extração e grau de pureza do DNA para utilização no mPCR a partir de material granulomatoso de bovinos em frigorífico sob inspeção estadual;

✓ Identificar espécies do gênero *Mycobacterium* através da Reação em Cadeia da Polimerase *multiplex* (mPCR) realizada diretamente do granuloma, correlacionando com os resultados da cultura e tempo de conservação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AGENTE ETIOLÓGICO DA TUBERCULOSE BOVINA

O gênero *Mycobacterium* é caracterizado por possuir micro-organismos álcool ácido resistentes, aeróbios estritos, imóveis, não formadores de esporos e desprovidos de cápsulas ou flagelos (SOUSA, 2000; PFYFFER, 2007), medindo de 0,5 a 7,0 μm de comprimento por 0,3 μm de largura (BRASIL, 2006). Dentre as principais espécies de importância epidemiológica destacam-se aquelas pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (MTB), que compreende: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii* e *M. microti*, (HUARD et al., 2003; COUSINS et al., 2003; PRODINGER et al., 2005; SKORIC et al., 2007; UEYAMA, 2013) e ainda citado por Alexander (2010) o *M. mungi* e *M. pinnipeddi* (UEYAMA, 2013) sendo o mesmo, responsável pela maioria dos casos de tuberculose humana e animal (MURAKAMI, 2009). A temperatura ótima de crescimento varia consoante a espécie e pode variar entre 30°C e 45°C, e a gama de pH suportada é limitada entre 6 e 8, sendo o pH ótimo de 6,7 a 6,9 (PFYFFER, 2007).

Até 1970, o bacilo bovino foi considerado uma variante do *M. tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. Neste mesmo ano Karlson e Lessel propuseram sua classificação como espécie individual, denominada *M. bovis* (FERREIRA NETO e BERNARDI, 1997). Embora seja primariamente um patógeno animal, ele também pode infectar e causar doença ao homem e, assim, tornar-se uma importante ameaça à saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (PRODINGER et al., 2002; HADDAD, MASSELOT e DURAND, 2004; BIET et al., 2005; BOSE, 2008).

Tratando-se dos aspectos bioquímicos, a parede celular das micobactérias possui composição química e estrutura complexa, particularmente rica em componentes lipídicos exercendo influência na morfologia da bactéria conferindo uma barreira contra a ação dos agentes físicos e químicos do meio ambiente, como também influencia na patogenia das respectivas infecções (HONG e HOPFINGER, 2004; DUCATI, 2004). Os ácidos micólicos são os principais responsáveis pela sua propriedade de álcool-ácido resistência, observada através da coloração Ziehl-Neelsen (ZN) (PFYFFER, 2007), além de dificultar a captação de nutrientes retardando o seu crescimento (COLLINS, 1994; NEILL et al., 2001), ultrapassando 12 semanas para crescer em meio de cultura apropriado (CORNER et al., 2012). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2006) destaca, no entanto, que características, a exemplo da tintorial, superpõem-se nos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium*.

Também são características peculiares ao *M. bovis* um período de geração longo, demandando de 16 a 20 horas dependendo da oferta de oxigênio e de nutrientes. Eles também não são capazes de metabolizar glicerol em piruvato como fazem as outras espécies do MTB. Desse modo, *M. bovis* cresce muito melhor na presença de piruvato como fonte de carbono (JORGE, 2011), como indicado pela análise da sequência genômica dessa espécie confirmando que os genes requeridos para a formação do piruvato não são funcionais. (BARRERA, 2007 e JORGE, 2011)

O bacilo, quanto à constituição gênica, possui, no seu genoma 4.345.492 pares de base de comprimento com 3952 genes capazes de codificar proteínas, sendo menor que o genoma de *M. tuberculosis* (4.411.532 pb para o isolado humano H37Rv) e um conteúdo médio de Guanina somado à Citosina de 65,63%. Possuem estreita relação filogenética cujos genomas, ambos descritos por completo, apresentam mais de 99,95% de similaridade tendo como principais eventos unidirecionais, as deleções (GARNIER et al., 2003; WHELAN, 2010).

Foi identificado em estudos de genômica comparativa entre uma estirpe de *M. tuberculosis* e outra de *M. bovis* mais de 140 genes com presença facultativa e

que estão relacionados com diferenças no fenótipo, hospedeiro preferencial e virulência. Diversos desses genes ocorrem em regiões de diferenciação (RD, do inglês) que foram eliminadas em determinadas espécies (PYM et al., 2002). Na formação dos loci RD estão envolvidas alterações como erros na replicação de DNA, movimento de elementos genéticos móveis, ou recombinação entre fragmentos adjacentes de DNA homólogo, com perda da sequência interveniente (HUARD et al, 2006). No caso da cepa vacinal de *M. bovis* BCG ocorre a deleção da RD1, demonstrando um papel importante desta região na virulência das cepas patogênicas do complexo (PYM et al., 2002).

A bactéria é sensível a agentes desinfetantes como fenólicos, formólicos, álcoois e, em especial ao hipoclorito de sódio, sendo eficientes dependendo da correta utilização. Também são destruídos pela pasteurização, (ARAÚJO, 2005; COSTA, 2008) luz solar direta em ambiente seco, assim como calor úmido a 60°C (ROXO, 1996; DUCATI, 2004). No que diz respeito à resistência, o agente se caracteriza por conseguir sobreviver na presença de ácidos, álcalis e desinfetantes, a exemplo do amônio quaternária e clorexidine (ARAÚJO, 2005; COSTA, 2008), além de resistir bem no ambiente, principalmente em locais úmidos e ao abrigo da luz solar, a exemplo de pastos, estábulos e no esterco por até 2 anos; na água por até 1 ano; e 10 meses nos produtos de origem animal contaminados. Ela também se mostra moderadamente resistente ao calor, à dessecação e a uma das principais drogas antituberculosas, a pirazinamida (ABRAHÃO, 1999; PARSONS, 2002; BELAS, 2011).

3.2 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

São descritas diversas espécies como hospedeiras deste agente, a citar, humanos, bovinos, búfalos e diversos outros animais domésticos e silvestres (MORRIS et al, 1994; O'REILLY e DABORN, 1995, BROUGHAN, 2013), sendo alguns hospedeiros terminais enquanto outros desenvolvem uma doença autolimitante. Em alguns países, como Grã- Bretanha, Irlanda, Nova Zelândia e Zâmbia, animais silvestres participam como reservatórios de *M. bovis* para animais domésticos (O'REILLY e DABORN, 1995), sendo importantes para

epidemiologia onde a tuberculose está erradicada, representando uma ameaça para a reintrodução da doença, uma vez que reservatórios silvestres não são controlados (BIET *et al.*, 2005).

Neill *et al.* (1994) salientam que o bovino uma vez infectado, já é capaz de transmitir a doença a outros, mesmo antes do desenvolvimento de lesões teciduais. A via de eliminação do bacilo é bastante variável, podendo ser eliminado por diversos fluidos corporais como o leite, fezes, urina, secreções vaginais e uterinas, expectoração, corrimento nasal e pelo sêmen (ROXO, 1996). A transmissão aerógena é a via mais comum de infecção no gado totalizando 80 a 90% dos casos (MORRIS, 1994). Abrahão (1999) afirma que a propagação da tuberculose em um rebanho independe da idade, sexo e raça e a principal forma de ser introduzida, é pela aquisição de animais infectados. Os sinais clínicos são bem inespecíficos ou não existem sinais característicos, até mesmo quando muitos órgãos estão afetados e a doença se encontra em fase avançada (SMITH, 2006; BRASIL, 2006).

De acordo com Campos (2008), a enfermidade possui distribuição em todos os continentes já Furlanetto (2012) afirma que é predominante em países que possuem sistema de criação de forma intensiva e, em menor intensidade, onde a criação é extensiva com ações de controle sanitário ainda recentes. O tamanho do rebanho também é importante na transmissão da infecção (ABRAHÃO, 1999). Ainda, vale destacar como variáveis para justificar as diferenças de prevalência: manejo, idade, raça, introdução de animais, presença de animais de corte e leite nos rebanhos entre outros (OMER *et al.*, 2001; PERREZ *et al.*, 2002), além do tipo de teste realizado para detecção da doença (SABEDOT *et al.*, 2009).

Benet (1994) relata que desde as décadas de 50 e 60 a doença vem sendo alvo de intensas campanhas de erradicação e controle em vários países. Algumas regiões do mundo apresentam situação bastante confortável, enquanto em outras a prevalência é alta. Entre o fim do século XIX e início do século XX, países da Europa demonstravam prevalências entre 20 e 40% em bovinos infectados (CORRÊA e CORRÊA, 1992; FERREIRA NETO e BERNARDI, 1997) quadro que foi revertido estando a enfermidade controlada em quase todos os países

membros da Comunidade Européia (BENET, 1994). Países como Dinamarca, Holanda e Luxemburgo possuem a doença erradicada e Alemanha, Bélgica, Inglaterra, França, Grécia e Portugal apresentam índices bastante reduzidos visto que iniciaram precocemente programas de controle e erradicação baseado em ações sanitárias como a tuberculinização e o sacrifício de animais infectados. Na Espanha, onde o programa nacional de erradicação era recente, a infecção atingia 10% do rebanho bovino (CAFFREY, 1994).

Nos países em desenvolvimento, raros estudos têm sido publicados quanto à prevalência da tuberculose animal. No continente americano os índices de bovinos infectados foram estimados em 0,005% no Uruguai e 0,37% na Venezuela. Na Colômbia, a infecção ainda ocorre em áreas geograficamente circunscritas, enquanto que no Suriname não tem sido detectada desde 1985 (KANTOR; RITACCO, 1994). No caso da Argentina, o índice apontado no ano de 2005 foi de 1,1% de carcaças condenadas (KANTOR e RITACCO, 2006).

No Brasil, em Minas Gerais, um estudo realizado em 1999 envolvendo aproximadamente 23.000 animais (70% da população) em 1.600 propriedades, estimou uma prevalência de 0,85% de animais reativos à prova de tuberculinização. Também foram detectadas 5% de propriedades com animais reagentes, sendo que naquelas produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha foi registrado uma prevalência de 15% (BRASIL, 2006). Este fato confirma a proposição de Lilenbaum (2000) que diz ser a tuberculose doença endêmica no país que acomete grande parte das propriedades de rebanho leiteiro de alto valor genético, provavelmente devido ao fato de tais animais estarem na situação de confinamento e elevada demanda metabólica, resultando em maior predisposição ao desenvolvimento da doença.

Em 2001, o MAPA instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) devido a importância da tuberculose bovina no Brasil com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal. Baseado no teste de tuberculinização, um estudo brasileiro no ano de 2004 evidenciou que, a prevalência variou de 0,4% a 3,6% nas regiões Sudeste e Norte, respectivamente (ROXO, 2005; KANTOR e

RITACCO, 2006). Neste contexto cabe citar trabalho envolvendo amostras planejadas que revelaram no estado da Paraíba no período de 2008 a 2009, que 62 (0,57%) das propriedades do estudo possuíam pelo menos um animal positivo ao teste de tuberculização. Em relação aos animais, 54.472 bovinos foram testados para o diagnóstico da tuberculose, dos quais 136 (0,25%) foram positivos (FIGUEIREDO et al., 2010). No estado do Espírito Santo foram examinados 32.052 bovinos de vários municípios e foi demonstrado 163 (0,51%) animais reativos ao agente (LAVAGNOLI et al., 2010). No Mato Grosso, Néspoli (2012) estimou a prevalência de 1,3% de tuberculose nestes rebanhos.

De acordo com Araújo (2005), estudos realizados no país, a partir de exames de carcaças em matadouros-frigoríficos, estimaram uma prevalência de tuberculose bovina de 0,17% em Minas Gerais; 5,16% no Pará e 0,64% no Rio Grande do Sul. Ao referir-se a tal assunto, o autor diz que esta diferença está relacionada ao grau de desenvolvimento regional, principalmente no que se refere ao estabelecimento de medidas sanitárias no rebanho. Existe uma estimativa de ocorrência em torno de 5,7% do rebanho nacional. Destes, 0,14% correspondem ao achado de lesões em matadouros (PUSTIGLIONE NETO, 1997; ROXO, 2000), valendo notar a contribuição de Baptista *et al* (2004), ao afirmarem que os índices encontrados em matadouros são subestimados, pois a prevalência real deve considerar os casos de tuberculose que não apresentam lesões macroscópicas detectáveis no exame *post mortem*.

3.3 IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA

Diversas espécies de mamíferos são susceptíveis ao *M. bovis* que possui ampla cadeia de hospedeiros, sendo uma das maiores entre todos os patógenos conhecidos. O homem pode, portanto, contrair a doença de diferentes animais e igualmente transmitir-lhes a infecção (LILENBAUM, 2000; PINTO, 2003). A doença em pessoas quando causada pelo *M. bovis* é denominada de tuberculose zoonótica. Já o *M. tuberculosis* possui um espectro mais restrito de hospedeiros, além do homem (NEILL et al., 2005), podendo ser o agente ocasional em bovinos que vivem em contato próximo com seres humanos (MURAKAMI, 2009). Existe

ainda casos de co infecção no ser humano pelos dois micro-organismos (LAGO, 2013).

Ravenel em 1902, isolou *M. bovis* em gânglios de uma criança falecida de meningite tuberculosa nos EUA, este isolamento foi registrado como a primeira prova definitiva da transmissão da doença dos bovinos ao homem decorrente da ingestão de alimentos. Os bacilos foram então inoculados em 3 bovinos, os quais em menos de 30 dias vieram a óbito. Os resultados da necropsia foram definitivos em afirmar que a causa da morte foi tuberculose (SOUZA et al., 1999).

No ano de 1993, a TB humana foi causa de 26% das mortes previsíveis e 7% de todas as mortes na Terra, sendo uma das principais preocupações da Organização Mundial de Saúde (OMS) por ter sido naquele período, responsável pelo maior índice de mortalidade humana causada por um único agente infeccioso (WHO, 1994). Já em 2009 a incidência global foi de 9,4 milhões, com mortalidade de 1,3 milhões de pessoas sendo cerca de 85% dos casos na Ásia e África. Dentre este total, 1 a 1,2 milhões estavam coinfectados pelo HIV (11 a 13%). Estes valores correspondem a uma redução significativa, relativamente aos últimos anos. A prevalência na África continua no entanto muito elevada, constituindo 80% do total de todo o mundo. Há países com uma prevalência de coinfecção superior a 5%, mas a maior concentração verifica-se na África Subsaariana e na Moldávia (WHO, 2011). O último relatório da OMS reúne dados de 178 dos 197 Estados-membros da organização e relata que o Brasil, somente em 2012, registrou mais de 71 mil casos de tuberculose (WHO, 2013).

Wedlock et al. (2002) salientam que em torno de 5 a 10% da incidência da doença em humanos são decorrentes da infecção por *M. bovis*. No início do século XX, foi primeiramente descrita este tipo de infecção, onde se estimou que foi causa de 10-18% de todos os casos da doença, existindo uma associação entre o número de casos humanos e a população bovina local. Naquele momento, calculou-se que 70 a 80% do total de tuberculose dos gânglios cervicais em crianças e 20% dos casos de tuberculose renal no homem foram causados pelo *M. bovis* (SAURET et al., 1992; ABRAHÃO, 1999). No Brasil, a primeira publicação na literatura nacional sobre o assunto foi em 1938, momento em que o agente foi

isolado por Torres e Pacheco (SOUZA et al, 1999). Pesquisa realizada em San Diego nos Estados Unidos da América apontou a crescente incidência da doença causada pelo *M. bovis*, com 45% de todos os casos de TB cultura positiva em crianças entre 1994 e 2005 (RODWELL et al, 2008).

Na América Latina, os registros de tuberculose zoonótica são escassos e estimativas indicam 2% dos quadros pulmonares e 8% dos casos extrapulmonares (KANTOR; RITACCO, 1994; LATINI *et al.*, 1990; USABIAGA, 2001). Nos países onde não existe o controle da tuberculose bovina, a infecção pelo *M. bovis* ocorre principalmente em jovens pela ingestão ou manipulação de leite contaminado (HARDIE; WATSON, 1992; NEIL *et al.*, 1992), sendo que na Europa, a reativação endógena de infecções adquiridas na infância ou na juventude representam o fator mais comum deste tipo de doença (HARDIE e WATSON, 1992).

Na maioria dos países, a magnitude da infecção é desconhecida (COSIVI et al., 1998) e de acordo com Romero et al (1999) este desconhecimento advém de diversos fatores, principalmente em decorrência do diagnóstico bacteriológico em humanos geralmente estar limitado à baciloscopia e ao cultivo em meio *Lowenstein-Jensen* que contém glicerol no qual o *M. bovis* apresenta crescimento disgônico porque utiliza preferencialmente o piruvato como uma fonte de carbono (GORMLEY, 2014). Nos países em desenvolvimento, é pertinente esta questão pelo fato de nesses locais existirem poucas informações sobre o problema, necessitando de maiores investimentos nos aspectos relevantes à saúde pública veterinária em relação à infecção humana por *M. bovis*, principalmente com relação aos grupos ocupacionais (WHO, 2009).

Wedlock et al., (2002) entendem que *M. bovis* e *M. tuberculosis* provocam doença indistinguível clínica, radiológica e patologicamente. Um fator agravante é que laboratorialmente, devido a aparente similaridade também no tratamento e prognóstico é muito comum ocorrerem falhas no diagnóstico diferencial entre as micobactérias, principalmente nos países onde se julgava erradicada a tuberculose bovina (ORDÓÑEZ *et al.*, 1999; PINTO, 2003). Essa discriminação se torna possível pelo emprego de meios de cultivo específicos como o *Stonebrink*

isento de glicerol permitindo crescimento do *M. bovis* (KANTOR e RITACCO, 1994; LATINI *et al.*, 1990; USABIAGA, 2001).

Ao referir-se a tal assunto, Abrahão (1999) sustenta que a perda de interesse epidemiológico ocorre devido à queda na incidência da doença em humanos causada pelo *M. bovis* o que justifica a falha no diagnóstico diferencial. O autor afirma que após a obrigatoriedade da pasteurização do leite, abate do gado tuberculina-positivo e a confiança na eficácia da quimioterapia contra todos os tipos de tuberculose, a incidência da doença diminuiu. Ueyama (2013), ainda relata a falta de métodos simples de diferenciação e como relatado por Lago (2013) a falta de disponibilidade de meios com piruvato. Vale lembrar que, entretanto, existem razões para diferenciação dos agentes, a exemplo da resistência do *M. bovis* à pirazinamida (droga antituberculose de 1ª linha) (PARSONS, 2002) e reintrodução da doença por esta espécie em países nos quais ela estava praticamente erradicada. Ainda é importante reforçar que a falha no tratamento favorece o aumento de cepas multidroga resistentes (ABRAHÃO, 1999)

3.4 IMPACTO ECONÔMICO

De início, se faz interessante destacar que se tratando de uma zoonose integrante da lista da OIE (Organização Mundial da Saúde Animal), a tuberculose é responsável pela diminuição da credibilidade e competitividade dos produtos oriundos de regiões contaminadas. Ademais, torna o produto resultante da pecuária vulnerável a barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional. Devido a estes fatores, Garnier *et al.* (2003) salientam que os prejuízos na pecuária mundial giram em torno de três bilhões de dólares por ano.

Além da importância econômica atribuída às questões comerciais, a doença acarreta perdas diretas resultantes da morte de animais, da diminuição no ganho de peso e produção de leite, da necessidade de descarte precoce e eliminação de animais de alto valor zootécnico, além da condenação de carcaças durante o

abate. A estimativa anunciada pelo MAPA em 2006 permeia porcentagens entre 10 e 25% de sua eficiência produtiva. Estudo realizado por Homem (2003) no município de Pirassununga-SP confirmam prejuízos na redução da produção de leite, diminuição da conversão alimentar, redução de nascimentos e mortalidade perinatal de bezerros.

3.5 PATOGÊNESE

A manifestação da doença no hospedeiro depende de fatores diversos valendo destacar, resposta imune, via de infecção e virulência do micro-organismo que determinam ainda a sobrevivência e multiplicação do mesmo no animal (COLLINS, 2001; AYELE et al., 2004). Geralmente a tuberculose bovina possui um período de incubação longo, com quadros pouco uniformes e uma evolução demorada (DUARTE et al., 2007). Ocasionalmente pode assumir um caráter agudo e curso progressivo rápido (RUGGIERO, 2007). Marcondes (2006) comenta que já foi demonstrado em modelos animais que um bacilo em suspensão pode causar a infecção. A inalação de aerossóis contaminados com o micro-organismo é responsável (OLIVEIRA et al., 2008; JÚNIOR e SOUZA, 2008 e LAVAGNOLI, 2010) por aproximadamente 90% das infecções em bovinos e bubalinos (CORREIA e CORREIA, 1992; BEER, 1998, MARQUES, 2008). Com relação à manifestação sistêmica, a enfermidade pode assumir forma miliar, quando ocorre de maneira abrupta e maciça ou protraída, acometendo os diversos tecidos pelas vias linfática ou sanguínea, sendo esta última a mais comum (BRASIL, 2006).

Micro-organismo intracelular facultativo (SKORIC et al., 2007), quando inalado é fagocitado geralmente por macrófagos alveolares onde poderá se multiplicar dando forma a lesões denominadas tubérculos ou poderá ser eliminado (MARCONDES, 2006). Não havendo destruição do bacilo e havendo multiplicação, eles serão atraídos por fatores quimiotáticos liberados pelos próprios bacilos. Essa multiplicação cessa cerca de 2 a 3 semanas após a inalação do agente infeccioso e é caracterizada por resposta imune mediada por células e reação de hipersensibilidade retardada. Neste momento, o hospedeiro

destrói seus próprios tecidos através da necrose de caseificação para conter o crescimento intracelular da bactéria. Com mediação dos linfócitos T ocorre a migração de novas células de defesa, culminando com a formação de granulomas (CORREIA e CORREIA, 1992; BEER, 1998).

O granuloma na doença caracteriza-se por nódulos de diâmetro entre 1,0 a 3,0 cm em média, podendo ser confluentes, aspecto purulento ou caseoso, de cor branca, cinza ou amarelado, de consistência firme e inodoro. Os locais mais comumente encontrados durante a necropsia ou inspeção de carcaças em matadouros frigoríficos são os pulmões e os linfonodos retrofaríngeos, bronquiais e mediastínicos (BRASIL, 2006; OIE, 2009), além de serosas e fígados, contudo, pode causar lesões em todos os órgãos, já havendo sido descrita no sistema nervoso central, articulações, diafragma, subcútis, ovários, útero e genitália masculina. Normalmente são firmes, com centro caseoso e quando calcificados rangem ao corte com faca como se contivessem areia (CORREIA e CORREIA, 1992).

No aspecto da microscopia do granuloma tuberculoso, trata-se de uma estrutura complexa e de composição principalmente celular, consistindo geralmente de um centro necrótico, circundado por densas camadas de células, como os linfócitos (T e B), neutrófilos e fagócitos mononucleares em diversos estágios de desenvolvimento, sendo, por último, circundado por uma firme cápsula de tecido fibroso (COSMA, SHERMAN e RAMAKRISHNAN, 2003; AYELE *et al.*, 2004; HOPE, 2008).

Tratando-se da resposta imune adquirida é essencial a produção do IFN- γ produzido do perfil Th1 estimulado pela apresentação de antígenos às células T CD4+ e CD8+ no aspecto de moléculas MHC II e I, respectivamente valendo destacar função de proteção das células TCD4+ no granuloma (HOGAN *et al.*, 2007). Estas células são produtoras de IFN- γ no granuloma, agindo no controle do crescimento bacteriano intracelular, enquanto os linfócitos T CD8+ agem, principalmente, na lise dos macrófagos infectados (PEPIN *et al.*, 1994; POLLOCK & NEILL, 2002). Outras citocinas estão envolvidas neste cenário. A interleucina 12 (IL-12), também potencializa a produção de IFN- γ , tanto estimulando as células

NK, quanto induzindo a polarização Th1 que eleva a produção desta citocina. Também citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (LAN et al., 1998; HOPE et al., 2008). Na regulação do processo infeccioso, a IL-10 inibe a resposta celular através da subregulação da produção de IL-12 (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; HOPE et al., 2008).

3.6 ACHADOS MACROSCÓPICOS

Os achados macroscópicos de lesões de tuberculose acontecem durante o abate dos animais. No Brasil, a inspeção das carcaças é regulamentada pelo RIISPOA “Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal” da Divisão de Normas Técnicas do Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura segundo decreto de 29 de março de 1952 alterado pelos decretos de 1962, 1994, 1997 e vigente nos dias atuais (BRASIL, 1997). Diante da implantação do programa de controle e erradicação da tuberculose bovina favorecendo importante declínio na frequência da doença, os matadouros-frigoríficos tornam-se importantes no contexto do rastreamento dos focos, através da rotina de inspeção, se tornando importantes “sentinelas epidemiológicos”, colaborando na estratégia de vigilância e erradicação da doença (WEDLOCK et al., 2002, COSTA 2008; LOPES, 2008) já que esta é uma das zoonoses alimentares detectáveis durante o exame *post mortem*. Uma outra questão deveras importante no papel da vigilância destes estabelecimentos é que estes defendem a qualidade higiênico-sanitária do produto final funcionando como barreira de proteção para o consumidor.

Tratando-se do assunto a nível internacional, o procedimento de monitoramento em frigoríficos demonstrou em países como Austrália, Estados Unidos, Canadá e Cuba ser de fundamental importância na erradicação da enfermidade em virtude da eficiência na identificação e na rastreabilidade da origem de animais com lesões compatíveis com tuberculose (RODRIGUEZ, 2005 e COSTA, 2012). Esta informação também se confirma com estudo retrospectivo realizado por Jorge (2011) no Mato Grosso do Sul que conclui que a identificação

de um único bovino com lesão no matadouro contribui para localização de um foco.

Apesar do papel de destaque dessas organizações, Corner (1994) ressalta que para se identificar a real prevalência seria necessário somar também os casos sem lesões aparentes. O autor lembra que, em razão da não visibilidade de algumas lesões, os índices devem ser bem superiores, girando em torno de 53% de impossibilidade de detecção na rotina da inspeção. Neste contexto ainda Baptista et al (2004) reafirmam que os índices encontrados em matadouros são subestimados. Para que se aproxime de uma prevalência mais real Corner (1994) argumenta que fazendas com amostras representativas ou abrangendo a totalidade dos animais pode proporcionar boas estimativas da frequência ou o exame cuidadoso de seis pares de linfonodos do pulmão, da cabeça e do mesentério que pode estabelecer o diagnóstico em 95% dos bovinos com lesões macroscópicas. No caso de infecções recentes não haverá lesões macroscópicas típicas visíveis. Além dos argumentos acima, deve-se estar atento para o fato do exame *post mortem* ser inspetor dependente, isto é, depende do critério da inspeção da carcaça e os sítios observados. O exame deve ser o mais preciso possível.

3.7 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Os métodos para diagnóstico da tuberculose bovina podem ser categorizados em diretos e indiretos. Os primeiros são capazes de identificar a presença da bactéria ou parte dela tendo, neste caso, como exemplos, a bacteriologia e os ensaios moleculares. Os métodos indiretos investigam a resposta ao agente etiológico no hospedeiro, seja ela imunológica humoral ou celular, sendo exemplificados, respectivamente pelos testes imunoenzimáticos e pela tuberculinização (BRASIL, 2006).

No cenário da inspeção sanitária durante o exame *post mortem*, usualmente, as amostras suspeitas encontradas são adequadamente coletadas e rapidamente encaminhadas para exames bacteriológicos e histopatológicos com o objetivo de

comprovação e controle do diagnóstico realizado a campo e para a avaliação da eficácia das provas de tuberculina (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995). Corner (1994), esclarece que em muitos países existe o critério de detecção total das lesões estabelecido por normas rigorosas de fiscalização, a exemplo da Austrália, onde tem-se detectado 95% dos animais com lesões tuberculosas durante a inspeção. Complementando as informações ditas acima, Parra et al (2008) afirmam ser necessário desenvolver sistemas de diagnóstico que são diretamente aplicáveis de amostras biológicas colhidas direto do matadouro.

Ao referir-se ao assunto da importância de qualidade e padronização de meios de diagnóstico, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento atribui em parte este fato à responsabilidade da eficácia de um programa nacional de combate a qualquer doença (BRASIL, 2001), além de ser fundamental uma rede laboratorial que possa disponibilizar o suporte técnico e um diagnóstico rápido, específico e sensível (COSIVI, 1998). Os testes de diagnóstico da tuberculose no Brasil estão em sintonia com os padrões internacionais, porém o MAPA pretende atualizar e melhorar o padrão de diagnóstico à medida que novos testes forem surgindo (BRASIL, 2001).

Apesar do grande avanço da ciência na área de diagnóstico, Ruggiero et al (2007) destacam a inexistência de um exame sensível, reprodutível e rápido para rotina do diagnóstico da tuberculose em bovinos, sendo fundamental o investimento em pesquisas para a solução desse ponto crítico no combate à enfermidade. Eles também consideram que os achados clínicos não devem ser desprezados e sim interpretados conjuntamente com os resultados laboratoriais. Outro aspecto levantado por Cosivi et al (1998) e Roring et al., (2000) é que nenhum dos métodos de diagnóstico pode ser empregado isoladamente, devendo sempre se fazer uso de complementariedade de técnicas, a fim de se obter uma informação eficaz e completa.

A evidência clínica da doença nos bovinos raramente é encontrada, mesmo em casos avançados de infecções crônicas. Os sinais clínicos são bastante variados e, por muitas vezes, não estão presentes (OIE, 2009). Os animais

podem apresentar dispnéia, tosse, mastite, caquexia progressiva, e infertilidade, entre outros (SMITH, 2006; BRASIL, 2006). Pode-se à palpação perceber aumento de linfonodos chegando, até mesmo, a causar obstrução de vias aéreas, trato digestivo ou vasos sanguíneos. O envolvimento do trato digestivo algumas vezes se manifesta por diarreia intermitente intercalada por períodos de constipação. Caquexia importante e dispnéia podem ocorrer durante a fase terminal (OIE, 2009). Alguns ainda apresentam debilidade, anorexia, sinais respiratórios, apetite seletivo e temperatura oscilante (SMITH, 1993; RADOSTITS et al., 2002). Torna-se importante mencionar o papel do exame clínico como diagnóstico complementar nos casos de animais anérgicos ao teste da tuberculina na busca segundo Radostitis et al (2002) e Smith (2006) por tosse seca, curta e repetitiva.

3.7.1 Tuberculinização

O exame preconizado pelo PNCBET para o diagnóstico *in vivo* da tuberculose é a tuberculinização, uma reação de hipersensibilidade tardia, imunologicamente específica, mediada por linfócitos T sensibilizados que possibilita a identificação de animais infectados, estando descrito sua realização e interpretação no regulamento técnico (BRASIL, 2006). Os indivíduos previamente expostos ao bacilo normalmente mostram-se reagentes (MONAGHAN et al, 1994). Embora o teste tuberculínico seja usado para o controle e erradicação da tuberculose bovina, resultados confiáveis não são alcançados em alguns animais infectados (PARDO et al, 2001).

O método consiste na inoculação de um extrato da cultura do agente no animal suspeito (RADOSTITS et al., 2002) com formação de edema mais ou menos pronunciado (NEIL et al, 1994). O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2006) descreve que podem ser feitos três testes: teste da prega caudal, usado somente para triagem em gado de corte; teste cervical simples, utilizado como prova de rotina em gado de leite; e/ou teste cervical comparativo, que pode ser utilizado como prova confirmatória naqueles animais que reagiram

aos outros testes ou como prova única em animais de rebanhos com risco de reações inespecíficas. Os animais positivos aos testes de tuberculina devem ser sacrificados.

O exame indireto pelo uso do PPD (Derivado Protéico Purificado) apresenta algumas limitações podendo levar a interpretações errôneas, a exemplo de falsos positivos para reações inespecíficas pelo contato prévio com outras micobactérias ambientais ou interpretação de falso negativo decorrente de infecção recente, já que a resposta imunológica pode aparecer até 50 dias após o contato, mau estado geral de saúde, imunossupressão pós-parto ou até mesmo anergia (MONOGHAN et al., 1994). As reações cruzadas com outros patógenos não relacionados da-se pelo *Corynebacterium* ou *Nocardia spp.* (ROMERO et al., 1999). Deve-se também estar atento para a dessensibilização que ocorre após a tuberculinização, visto que os animais apresentam sua capacidade de responder a novos testes diminuída, sendo recobrada após um período de 42 a 60 dias. Resultados falso-negativos podem ocorrer ainda por variações inerentes ao próprio teste ou por variações na leitura e interpretação do mesmo (MONOGHAN et al., 1994). É preciso reconhecer que apesar das limitações, ainda não existe um ensaio mais satisfatório *in vivo* que a tuberculinização.

3.7.2 Diagnóstico sorológico

Dentre as possibilidades de diagnósticos sorológicos existe a quantificação da citocina denominada interferon gama (IFN- γ). Este ensaio baseia-se na resposta imune de células em cultura de sangue total estimuladas com antígenos do bacilo através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (WOOD et al. 1990). A ausência de detecção de IFN- γ caracteriza a negatividade do animal para infecção pelo *M. bovis*, uma vez que os linfócitos de bovinos não infectados não produzem esta citocina de forma específica (WOOD e JONES, 2001). Este ensaio tem sido avaliado como um diagnóstico primário em muitos países (WOOD, 2001), inclusive no Brasil. Trata-se de um método sensível que pode detectar a infecção em várias espécies de animais e mais precocemente que os testes

tuberculínicos, possuindo sensibilidade e especificidade de 85% e 93%, respectivamente (WEDLOCK et al, 2002; RUA-DOMENECH et al., 2006).

Como vantagens importantes estão a estimulação de linfócitos *in vitro* que, conseqüentemente, não alteram o estado imunológico do animal, além de não ser necessário esperar 60-90 dias para repetir o teste quando o teste inicial não for conclusivo, uma limitação distinta do testes cutâneos (LILENBAUM, 2000). O teste para a detecção da infecção em bovinos já é disponível comercialmente com a denominação BOVIGAN. Ele utiliza como antígenos o PPD bovino e o aviário, embora outros antígenos, a exemplo da ESAT-6 e do CFP-10 já tenham sido usados (WOOD e JONES, 2001). Por outro lado, o ensaio INF γ tem algumas limitações em relação à infraestrutura de laboratório e técnicos especializados, além do custo dos kits comerciais. Deve-se estar atento também para o intervalo de tempo a partir da colheita da amostra até o processamento do material, podendo, no entanto, ser usado a partir de um ponto de vista estratégico para os programas de controle (LOPES, 2012).

Em geral, a resposta de anticorpos séricos acontecem em estágios mais avançados da doença (POLOCK et al., 2005). Neste sentido, o ensaio de ELISA para diagnóstico da tuberculose, pode ser utilizado como um exame complementar aos demais ensaios, especialmente na identificação de animais anérgicos (WHO, 1994). O método imunoenzimático permite detectar a presença de anticorpos IgG (SANT'ANNA, 2001) contra antígenos micobacterianos no soro de portadores de TB medindo a referida ligação. Os antígenos normalmente utilizados são a PPD isoladas ou associadas a antígenos purificados a partir de *M. bovis* estando os purificados representados pelo complexo AG85 que retrata a maior parte das proteínas secretadas. O fato de anticorpos dirigidos contra os antígenos poderem estar presentes em indivíduos não infectados leva a resultados falso positivos (MEDEIROS et al., 2010). A proteína MPB70 que representa aproximadamente 10% da PPD tem sido identificada como uma célula B alvo em bovinos tuberculosos e também como uma proteína razoavelmente específica. A homóloga da MPB70, a MPB83 também tem sido utilizada (WIKER, 2009).

3.7.3 Diagnóstico histopatológico

O exame histopatológico mostra-se importante como ferramenta complementar aos achados macroscópicos e podem ser aplicados principalmente em regiões de alta prevalência da doença por ser de conclusão mais rápida para um diagnóstico presuntivo (CORNER, 1994). Eles exigem grandes concentrações de bactérias além do fato de outros micro-organismos produzirem lesões semelhantes às ocorridas na tuberculose bovina por *M. bovis* (HAAGSMA, 1995; ZANINI et al., 2001).

De forma preliminar, pode ser realizado coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen (ZN), método microscópico direto do esfregaço de amostras frescas com o objetivo de pesquisar a presença de bacilos álcool-ácidos resistentes. É considerada uma técnica barata, prática, rápida e útil, mas que se apresenta inespecífica e pouco sensível (20-70%), uma vez que é necessário um grande número de organismos na amostra para a positividade do esfregaço (LISLE et al., 2002; AYELE et al., 2004).

Na coloração por hematoxilina-eosina (HE) ocorre acúmulo de macrófagos com formação de células gigantes de Langhans, circundadas por linfócitos, plasmócitos, fibrose periférica e necrose caseosa central, o granuloma (NEILL et al., 1994). Coelho (2002) classifica o granuloma em completo ou incompleto, sendo que o primeiro deve apresentar todos os elementos ditados acima e o incompleto será assim chamado quando não houver necrose caseosa, células gigantes ou macrófagos. Será típico quando existir célula gigante e, atípico, quando essa faltar.

3.7.4 Diagnóstico bacteriológico

É consenso entre os pesquisadores que o método diagnóstico definitivo da tuberculose é o isolamento do agente, chamado também de "padrão-ouro" (ARANAZ et al., 1996; ALMEIDA et al., 2004) que pode ser realizado a partir de

lesões ou secreções de animais suspeitos. É essencial para definir as condições ideais para a cultura, que se leve em conta, a concentração de bacilos na amostra e os riscos de contaminação, uma vez que estes fatores podem influenciar a seleção de procedimentos de descontaminação e a duração da incubação (GORMLEY, 2014).

O cultivo do *M. bovis* deve ser executado em laboratório do grupo de risco nível III (BRASIL, 2006) em estufa a 37°C incubados em meio inclinado com pH entre 6,8 e 7,0. As bactérias do gênero *Mycobacterium* spp. crescem em meios que contém verde malaquita para inibir contaminantes e compostos de ovo e amido enriquecidos com asparagina. O glicerol favorece o crescimento de todos os outros micro-organismos do gênero, porém, dificulta o do *M. bovis*. Em meios de cultura à base de ovo, o crescimento revela colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo-pálida, com borda irregular e superfície granular. As micobactérias também crescem em meios à base de ágar; nestes as colônias são volumosas no centro, brancas, finas, ásperas e planas (CORNER, 1994), a exemplo do Middlebrook 7H11 e B83 (HAAGSMA, 1995). No meio *Stonebrink - Leslie*, as colônias se apresentam brancas e pequenas com bordas irregulares e superfície granular, sendo observadas a partir do 28º dia de incubação, sendo este meio o mais recomendado para o isolamento do *M. bovis* (MOTA et al., 2001). O procedimento chega a requerer entre 3 e 12 semanas de incubação, com um tempo médio de divisão entre 12-24 horas (AYELE et al., 2004) e de acordo com Corner (1994) sem influência da adição de 5% de CO², ele observa ainda que concentrações maiores podem ser até prejudiciais ao crescimento.

Apesar de ser método padrão, o isolamento traz alguns questionamentos, a exemplo da baixa sensibilidade, despesa de muito tempo para finalizar o diagnóstico e necessitar de uma grande quantidade de bacilos viáveis. É interessante verificar ainda que a quantidade e viabilidade dos bacilos, ainda é uma etapa influenciada pelos métodos drásticos de descontaminação do material que, além de destruir os contaminantes, também podem causar a morte de algumas bactérias, o que pode comprometer o isolamento (HAAGSMA, 1995; WARDS et al., 1995; ZANINI et al., 2001). Um dos principais métodos de descontaminação na Medicina Veterinária é o método de Petroff que utiliza NaOH

4%, com posterior neutralização com 1N HCl, a qual é aplicada em fragmentos de amostras refrigeradas ou congeladas (ROSEMBERG, 1990). Mencionado por Ambrosio (2008), outras substâncias também têm sido utilizadas para o mesmo fim: Ácido sulfúrico, ácido oxálico (OA), cloreto de benzalcônio (AC), fosfato trissódico e laurel sulfato de sódio, cloreto de sódio, e o equivalente de cloreto de 1 - hexadecilpiridínio (HPC) ou cloreto de cetilpiridínio (CPC).

Após executada a técnica do isolamento, segue a identificação completa do agente. Almeida et al (2004) relata que o reconhecimento deve ser feito por meio de provas bioquímicas, análise química dos grupos funcionais de ácidos micólicos que se encontram na parede das micobactérias ou técnicas de biologia molecular, os quais segundo Lisle *et al.*, (2002) requerem um tempo adicional para sua total realização. Especificamente para bioquímica, pode-se levar mais quatro semanas na verificação das provas, além do fato da técnica demandar um crescimento abundante de cultura pura e madura, o que não é comum tratando-se de *M. bovis*, (COLLINS *et al.* 1994). Como resultado, espera-se sensibilidade à hidrazida, positividade para atividade de urease, hidrolisar moderadamente o Tween 80 e negatividade nos testes de catalase e arilsulfatase (AYELE *et al.*, 2004). Ainda, o aumento da quantidade de niacina e redução de nitrato a nitrito são observados quando a bactéria cultivada é *M. tuberculosis*, mas não ocorre quando se trata do *M. bovis*, permitindo, uma diferenciação. Também o teste de sensibilidade ao antibiótico pirazinamida contribui para diferenciação entre eles, sendo *M. bovis* resistente a este antimicrobiano (PARSONS 2002; BELAS, 2011).

3.7.5 Diagnóstico molecular por PCR

Tem sido descrito diversos testes de diagnóstico molecular para a tuberculose, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) (FUVERKI, 2008). Tais descrições contemplam métodos comerciais ou não. Em virtude da longa demanda de tempo para isolamento e identificação do agente, os procedimentos moleculares tornam-se cada vez mais promissores. No aspecto da bacteriologia ainda há de se considerar as perdas dos bacilos viáveis nos processos de descontaminação (PINTO, 2002, SALAZAR, 2005; FRAGUÁS,

2008) onde a biologia molecular assume o papel de metodologia diagnóstica auxiliar.

Ruggiero et al (2007) entende que a técnica de PCR surge sem intenção de substituir a clássica investigação bacteriológica, mas tem o objetivo precípua de auxiliar os exames laboratoriais de tuberculose, esclarecendo a natureza das lesões sugestivas, especialmente de carcaças sequestradas em frigoríficos. A redução do tempo de exame dessas lesões colabora para o controle da doença no homem e nos animais auxiliando na identificação dos fatores de risco, que desempenham importante papel na epidemiologia da doença.

O uso da reação em cadeia da polimerase teve início em 1986 por Mullis e Faloona, tendo sido reconhecida como importante avanço científico por permitir inúmeras vezes e em pouco tempo a amplificação *in vitro* de uma sequência alvo de ácido nucleico através do uso da enzima Taq polimerase, tornando possível a identificação do DNA bacteriano (ANDRADE, 1993). Os *primers* agem como iniciadores e garantem a especificidade da reação. Os fragmentos amplificados são evidenciados por eletroforese em gel com uso de corantes ou isótopos radioativos ou fluorescentes e ainda empregando-se métodos enzimáticos ou de quimiluminescência (ABRAHÃO, 1999; ANDRADE, 1993; COLLINS et al., 1994).

A PCR tem demonstrado ser um método auxiliar mais rápido, sensível, específico e que dispensa a grande quantidade e viabilidade dos bacilos, finalizando a sua análise em até 24 horas. Para atingir o objetivo da identificação da micobactéria dois pontos são muito relevantes, a seguir: a escolha correta dos *primers* e a qualidade da técnica de extração do DNA (ZUMÁRRAGA et al., 2001). No que se refere à extração e purificação do DNA cromossomal do bacilo, Acha e Szyfres (2001) acreditam ser uma etapa limitante ao uso da PCR em amostras clínicas devido à complexidade da parede celular. Wards, Collins e Lisle (1995) contribuem no mesmo sentido, afirmando que a lise da parede celular para a liberação do DNA íntegro representa um passo determinante neste procedimento e acrescentam a dificuldade de purificar a bactéria das amostras clínicas, já que este micro-organismo é intracelular. Ainda, dentre as dificuldades na biologia molecular neste contexto, a contaminação merece destaque. Relatos de

contaminação cruzada chegam até 65%, podendo ser reduzidas a menos de 1% em laboratórios bem controlados e fiscalizados (KANDUMA et al., 2003).

Ribeiro (2006) menciona ser fortemente perceptível a anuência de pesquisadores na aplicação de PCR no diagnóstico e tipificação da tuberculose bovina, no entanto, quando se trata de extrair DNA diretamente sobre homogeneizados de tecidos a sensibilidade do método é reduzida e este fato limita sua difusão como método diagnóstico de rotina. A autora salienta neste caso, atenção para protocolos de extração mais eficientes e menos vulneráveis aos fatores inibidores da amplificação. Ainda, nesta mesma linha de considerações, Collins et al., (1994) e Roring et al., (2000) relembram que os primeiros estudos empregando PCR para a detecção direta de *M. bovis* em tecidos bovinos foram realizados em 1995 e comentam a proporcional vantagem na redução do tempo para diagnóstico realizado diretamente do tecido, já que não precisaria aguardar o cultivo.

Quando se deseja ou precisa fazer diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis*, a PCR *multiplex* se mostra uma técnica interessante. Numa única reação são utilizados vários conjuntos de *primers* específicos para determinadas regiões do genoma bacteriano (ARRÁIZ, 2007; CORSET, 2007 KEE, 2009). Hernandez et al., (2003) destacam ainda a economia de tempo e de reagente. Parsons et al (2002) explicam em quais situações deve-se pesquisar tal diferença especialmente entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*: quando é importante fazer a distinção entre as fontes zoonóticas ou fontes humanas da doença e também para fins epidemiológicos e de tratamento. A reação *multiplex* permite inclusive auxiliar na diferenciação de Micobactérias Tuberculosas das não Tuberculosas (POROCA et al., 2009; UHEYAMA, 2013).

Em meio a inúmeros protocolos de amplificação de DNA, Warren (2006) utiliza técnica baseada em regiões de diferença (RD1, RD1mic , RD2seal , RD4 , RD9 e RD12) que foi desenvolvida para a diferenciação de *M. canettii* , *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis* e *M. bovis BCG*. O tamanho da respectiva amplificação dos produtos resultantes da PCR *multiplex* corresponde à presença dos diferentes membros do complexo *M.*

tuberculosis. O autor destaca que este protocolo permite a diferenciação rápida, tornando-o adequado para fins de rotina de vigilância e laboratórios. Ueyama (2013), atenta para as interpretações baseadas nestes estudos. PCR *multiplex* em tempo real também são utilizados baseados nestas RD (HALSE, 2011).

Como opção à PCR simples ou *multiplex* existem diversos ensaios moleculares a exemplo do *nested*-PCR que é mais sensível e baseia-se na re-amplificação de um fragmento amplificado em uma primeira reação com *primers* internos (ZANDEN, 2002). Outra alternativa é o estudo de uma proteína de choque térmico (heat-shock) de 65 KDa com PCR e análise do polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP) (TAYLOR et al., 1997). Ainda pouco disseminada, existe a técnica do microarranjo do DNA (DNA microarray) que imobilizam sequências de DNA (GINGERAS et al., 1998) ou espectrometria de massa (LAGO, 2013) dentre outras.

Apesar de inúmeras possibilidades de diagnóstico para tuberculose bovina, se faz necessária a validação dessas técnicas aplicadas em amostras clínicas e nas condições do país, no qual os mesmos serão empregados (WHO, 1994; WARDS et al., 1995).

3.8 CONTROLE E PREVENÇÃO

No Brasil, o método habitual de controle da TB consiste na realização da prova de tuberculina e no abate sanitário. O PNCEBT também determina a aquisição de animais de propriedades livres da doença, adoção de instalações bem ventiladas com exposição direta à luz solar, incluindo higiene de bebedouros e cochos de alimentação. Também está descrito restrição do consumo do leite de vacas reagentes, controle da saúde dos trabalhadores das propriedades, permanente monitoramento dos rebanhos bovinos através da detecção de lesões tuberculosas pela inspeção sanitária durante o abate dos animais, além do controle de trânsito dos mesmos (BRASIL, 2006).

Corner (1994) ressalta que para o estabelecimento dos programas de controle é importante ser considerado o grau de incidência da doença nos rebanhos, não deixando de ressaltar a possibilidade do diagnóstico errado colaborando com a negligência dos casos. Medidas sanitárias integradas envolvendo os diferentes segmentos da saúde humana e veterinária podem proporcionar uma ampla abordagem da epidemiologia da tuberculose e atenuar a incidência da doença nos animais e no homem (JORGE, 2011).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. L.; PILLAI, S. **Imunologia celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008

ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Archives of Veterinary Science**. v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses e enfermidades transmissíveis comunes al hombre e a los animales**. Washington: Organización Paramericana de la Salud, 2001 398p. (Publicación Científica y Técnica n. 580)

ALMEIDA, R.F.C.A.; SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R. Tuberculose Bovina: Diagnóstico. In: (Ed.). **Brucelose e Tuberculose Bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico**. Brasília: Empraba Informação Tecnológica, 2004. p.61-80

ALEXANDER KA, et al. 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerg. Infect.Dis.** 16 :1296-1299

AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D.; RODRIGUEZ, A. R.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 241-244, 2008.

ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.39, p.175-186, 1993

ARANAZ, A. et al. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 1785-1789, 2003

ARRÁIZ RN, ROMAY BZ, FARIA MN *Multiplex* PCR, which targets many different genes simultaneously, has been used for this goal. **Rev Chilena Infectol.** 2007 Abr; 24 (2) :99-105

ARAUJO, C.P., C.Q.F. LEITE, K.A. PRINCE, K.S.G. JORGE, AND A.L.R. OSORIO, 2005: *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 100, 749–752.

AYELE, W. Y. et al. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.** v. 8, n. 8, p. 924–937, 2004

ÁVILA, L.N.; BAHIANSE. L.C.; PEREZ, A.M.; GONÇALVES. V.S.P.; BAVIA, M.E.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F.; TELLES, E.; DIAS. R.; AMAKU, M. Prevalência e análise espacial da tuberculose bovina no estado da Bahia. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, p.66, 2012. Supl. 2.

BAPTISTA, F.; MOREIRA, E.C.; SANTOS, W.L.M.; NAVEDA, L.A.B. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.5, p. 577-580, 2004

BARRERA L. The basis of clinical bacteriology. In: PALOMINO, J.C., LEÃO, S.C., RITACCO, V. Tuberculosis, 2007. p. 93-112. Disponível em: <http://www.tuberculosistextbook.com/tuberculosis2007.pdf>

BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos.** São Paulo: Roca, 1998.p.178-183.

BELAS, A. E.; BOLIN, C. A.; GARDINER, J. C.; KANEENE J. B. A study on the persistence of *Mycobacterium bovis* in the environment under natural climatic conditions in Michigan, **USA Vet Inter Med** (2011) 765 430
<http://dx.doi.org.ez278.periodicos.capes.gov.br/10.4061/2011/76543> Article

BENET, J. J. Epidémiologie de la tuberculose bovine em France: état dês connaissances et perspectives. **Le Point Veterinaire**. v. 26, p. 13-26, 1994.

BIET, F. et al. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). **Veterinary Research**. v. 36, p. 411–436, 2005.

BOSE, M. Natural reservoir, zoonotic tuberculosis & interface with human tuberculosis: An unsolved question. Commentary. **Indian Journal of Medical Research**. v. 128, p. 4-6, 2008

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 1997.

_____. Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. Institui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Diário Oficial da União, Brasília: 11 de janeiro de 2001.

_____. Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília, 2006. 188 p

BROUGHAN, J.M., SH DOWNS, TR CRAWSHAW, PA UPTON, J. BREWER, RS CLIFTON-HADLEY *Mycobacterium bovis* infections in mammalian species than bovine domesticados. *Parte 1: Review of epidemiology and laboratory presentations in Britain 2004-2010* **Veterinary Journal**, 198 (2013), pp 339-345

CAFFREY J. P. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in **Europe**. **Vet Microbiol**. 1994; 40 (1-2):1-4

CAMPOS S.S. 2008. Prevalência da tuberculose bovina. *Revta Eletrônica do CESVA* 1:245

CARDOSO, M.A.; CARDOSO, R.F.; HIRATA, R.D.C. et al. Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. **Zoonoses Publ. Health**, v.56, p.465-470, 200

COELHO, H.E. **Patologia Veterinária**. Barueri: Manole, 2002, 234p

COLLINS, D.M.; R ADFORD, A.J.; D E LISLE, G.W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.83-94, 1994.

COLLINS, J. D. Tuberculosis in cattle: new perspectives. **Tuberculosis Journal**, v. 81, n. 1/2, p. 17-21, 2001

CORNER L. A, GORMLEY E, PFEIFFER DU (2012) the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions to maximize the number of positive cultures. *Vet Microbiol* 156: 162-171. doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.016
PubMed: 22074859 [PubMed]

CORNER, L.A. *Post-mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p.53-63, 1994.

CORREIA, M.; CORREIA, N.M. Tuberculose Bovina. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. Editora: MEDSI, 1992, p.317-337.

CORSETTI A, L SETTANNI, VALMORRI S, MASTRANGELO M, SUZZI G. Identification of lactic acid bacteria with natural yeast subdominant and its evolution during fermentation in laboratory scale. **Food Microbiol** 2007; 24:592-600.

COSTA, A. C. F. **Tuberculose bovina: diagnóstico anatomo-histopatológico, bacteriológico e molecular em animais abatidos na Região Metropolitana de Salvador, Bahia**. Dissertação de Mestrado. Salvador, Bahia, 46 p. 2008

COSTA, L.B. **Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia. 2012**, 121f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. 304 Salvador

COSIVI, J.M.; GRANGE, C.J.; DABORN, M.C.; RAVIGLIONE, T.; FUJIKURA, D.; COUSINS, R.A.; ROBINSON, H.F.A.K.; HUCHZERMEYER, I.; DE KANTOR I., MESLIN, F.X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases** v. 4, n. 1, p. 59- 69, 1998.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**. v. 57, p. 641-676, 2003.

COUSINS, D.V.; BATISTA R, CATALDI A, QUSE V, DOWN S, DUIGNAN P, MURRAY A, DUPONT C, AHMED N, COLLINS DM, BUTLER WR, DAWSON D, RODRIGUEZ D, LOUREIRO J, ROMANO MI, ALITO A, ZUMARRAGA M, BERANRDELLI A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1305-1314, 2003

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, n. 2, p. 77–109, 2006.

DUARTE, E. L.; DOMINGOS, M.; ALBUQUERQUE, T.; AMADO, A.; BOTELHO, A. Transmissão da tuberculose bovina entre espécies domésticas e silvestres em Portugal: primeiras evidências moleculares em isolados de *Mycobacterium bovis* de uma exploração no Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 299-303, 2007.

DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. Micobactérias. In: TRABULSI, R.L.; ATERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap.56.

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina.

Revista Higiene Alimentar. v. 11, p. 9-13, 1997.

FRÁGUAS, S. A. Márcia Souza Cunha-Abreu,** Ana Maria dos Reis Ferreira,**
Carla Dray Marassi,*** Walter Oelemann,*** Leila de Souza Fonseca,*** Rachel
Ferreira,* Walter Lilenbaum* Estudo comparativo de métodos complementares
para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à
tuberculinização **R. bras. Ci. Vet.**, v. 15, n. 3, p. 117-121, set./dez. 2008

FIGUEIREDO E.E.S., CARVALHO R.C.T., SILVESTRE F.G., LILENBAUM W.,
FONSECA L.S., SILVA J.T. & PASCHOALIN V.M.F. 2010. Detection of
Mycobacterium bovis DNA in nasal swabs from tuberculous cattle by a multiplex
PCR. **Braz. J. Microbiol.** 41:386-390.

FURLANETTO, Leone V. et al . Uso de métodos complementares na inspeção
post mortem de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesq. Vet.**
Bras., Rio de Janeiro , v. 32, n. 11, Nov. 2012 .

FUVERKI, R.B.N.; MURAKAMI, P.S.; BIONDO, A.W.; BARROS FILHO, I.R. Uso
da PCR para detecção e identificação de micobactérias a partir de amostras
clínicas de bovinos. **Archives Veterinary Science**, v. 13, n.1, p. 73-77, 2008

GARNIER, T. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*.
PNAS. v. 100, n. 13, p. 7877–7882, 2003.

GINGERAS, T.R.; GHANDOUR, G.; WANG, E. Simultaneous genotyping and
species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic
Mycobacterium DNA arrays. **Genome Research**, v.8, p.435-438, 1998

GORMLEY, E. ; CORNER, L.A.L. ; COSTELLO, E. ; RODRIGUEZ-CAMPOS, S.
Bacteriological diagnosis and molecular typing de *Mycobacterium bovis* and

Mycobacterium caprae • Show more DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.04.010 **Research in Veterinary Science**, 2014

HAAGSMA, J. *Bovine tuberculosis*. Geneve: **Office International des Épizooties**, 1995. 11p. (Manual Amendment 2).

HADDAD, N.; MASSELOT, M.; DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. **Research in Veterinary science**. v. 76, p. 1-18, 2004

HARDIE, R.M.; W ATSON, J.M. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. **Epidemiology & Infection**, v.109, n.1, p.23-33, 1992.

HALSE, T.; VINCENT E. ESCUYER V. E.; MUSSER K. A. Evaluation of a single tube Multiplex Real-Time PCR iferenciação members of the Mycobacterium tuberculosis complex in clinical specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, 2011, Vol.49(7), pp.2562-2567 [Periódico revisado por pares]

HERNANDEZ, M. et al. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. **Analytical Biochemistry**, v.323, p.164-170, 2003.

HUARD, R. C.; OLIVEIRA L. C.; BUTLER W. D., SOOLINGEN D. VAN, HO JL 2003. Based on PCR to distinguish the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions method. **J. Clin.Microbiol.** 41 :1637-1650

HUARD, R. C., FABRE, M., DE HAAS, P., LAZZARINI, L. C. O., VAN SOOLINGEN, D., COUSINS, D., AND L. HO, J. 2006. Novel genetic Polymorphisms that Further Delineate the Phylogeny of Mycobacterium tuberculosis Complex. **Journal of Bacteriology** 188: 4271-4287

HOGAN et al. Requirements for CD4 T cell levels in acute Mycobacterium bovis strain bacille Calmette Guérin (BCG)-induced granulomas differ for optimal

mycobacterial control versus granuloma formation. **International Immunology**. p. 1-7, 2007

HOMEM, V. S. F. **Brucelose e tuberculose bovinas no município de Pirassununga, SP: prevalências, fatores de risco e estudo econômico**. 112p. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

HONG X.; HOPFINGERA. J., et al. (2004). Construction, Molecular Modeling, and Simulation of Mycobacterium tuberculosis Cell Walls. *Biomacromolecules*.

JORGE, K.S.G. **Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica**. 2011, 69p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande: Mato Grosso do Sul

JÚNIOR, M.E.K.; SOUSA, C.L.M. Considerações sobre a tuberculose bovina no norte Fluminense e no município de Campos dos Goytacazes após o advento do PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. **Perspectivas online**. Vol. 2, n.8, ano 2008

KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. A review. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.781-791, 2003.

KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1/2, p.5-14, 1994.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. **Veterinary Microbiology**, v. 112. p. 111-118, 2006.

KEE SJ, KIM SM, KIM SH, SHIN MG, SHIN JH, SUH SP, et al *Multiplex* PCR assay for identification of mycobacterial species isolated from liquid cultures.

Chonnam Med J. 2009; 45(1) :19–26

LAN, D. T. B. et al. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice.

Microbiology and Immunology. v. 42, n. 12, p., 863–870, 1998.

LATINI, M.D.S.; LATINI, O.A.; LOPEZ, M.L.; CECCONI, J.O. Tuberculosis bovina en seres humanos. **Revista Argentina del Torax**, v.51, p.13-16, 1990.

[LAGO](#), L. P.; [NAVARRO](#), Y. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review [Darío García-de-Viedma](#)

Research in Veterinary Science, 2013

LAVAGNOLI, M.R.; AMORIM, B.M.; MACHADO, G.P.; DEMONER, L.C.; ZANINI, M.S.; ANTUNES, J.M.A.P. Tuberculose em bovinos no Estado do Espírito Santo.

Veterinária e Zootecnia, v. 17, n. 1, p. 71-78, 2010

LILENBAUM, W. Atualização em Tuberculose Bovina. Uma mini revisão. **Rev.**

Bras. Med. Vet., v. 22, n. 4, p.145-151, 2000

LISLE, G. W.; BENGIS, R. G.; SCHMITT, S. M.; O'BRIEN, D. J. Tuberculosis in free- ranging wildlife: detection, diagnosis and management. **Revue scientifique**

et technique (international Office of Epizootics). v. 21, n. 2, p. 317-334, 2002.

LOPES, C.A.R. **Prevalência de brucelose e tuberculose em bovinos abatidos sob inspeção estadual no município de Aracruz - Espírito Santo.** 2008, 34f.

Monografia (Especialização em higiene e inspeção de produtos de origem animal). Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro

LOPES L.B., ALVES T.M., STYNEN A.P.R., MOTA P.M.P.C., LEITE R.C. & LAGE A.P. 2012. Parameter estimation and use of gamma interferon assay for the

diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**

32(4):279-283. Embrapa Agrossilvipastoril, Rodovia MT 222, km 2,5, Caixa Postal 343, Sinop, MT 78.550-970, Brazil.

MARCONDES, A.G.; SHIKAMA, M.L.M; VASCONCELLOS, S.A.; BENITES, N.R.; MORAIS, Z.M.; ROXO, E. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006..

MARQUES, M.E.O. Controle da Tuberculose Bovina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro, ano VI, N. 10. Janeiro 2008. ISSN: 1679-7353.

MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. The tuberculin test. **Vet. Microb.**, v.40, n.1-2, p.111-124, 1994.

MORATO, F. **Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos utilizando a técnica de cultivo em camada de Agar Middlebrook 7H11**. 2007, 84f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. São Paulo: São Paulo

MORRIS, R.S.; PFEIFEER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v.40,n.12, p. 153-177, 1994

MOTA, P.M.P.C.; LOBATO, F.C.F., ASSIS, R.A. et al. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.4, p.1-3, 2001

MURAKAMI¹, P. S; FUVERKI², R. B. N; NAKATANI³, S. M; FILHO⁴, I. R. B; BIONDO⁵, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 67-74, jan./jun. 2009.

NADER, A; HUSBERG, H. Estimación de pérdidas de producción por tuberculosis bovina en un rodeo lechero. In: KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs. **Vet. Microbiology**, v.40, n.1-2, p.5-14, 1994.

NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1/2, p.41-52, 1994.

NEILL, S. D.; BRYSON, D. G; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in Cattle. **Tuberculosis**. v. 81, n. 1/2, p. 79-86, 2001

NEILL, S. D.; SKUCE, R. A.; POLLOCK, J. M. Tuberculosis – new light from an old window. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1261-1269, 2005

NESPOLI, J. M. B. **Situação epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso**. 2012, 44 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-28092012-165944/>>. Acesso em: 27-06-2013

UEYAMA, M ; CHIKAMATSU, K ; AONO, A ; MURASE, Y ; KUSE, N ; ORIMOTO, K ; OKUMURA, M ; YOSHIYAMA, T ; OGATA, H ; YOSHIMORI, K ; KUDOH, S ; AZUMA, A ; GEMMA, A ; MITARAI, S Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from patients with tuberculosis in Japan. **Tuberculosis**, 2014, Vol.94(1), pp.15-19 [Periódico revisado por pares]

OLIVEIRA, V.M.; FONSECA, A.H.; PEREIRA, M.J.S.; CARNEIRO, A.V.; JESUS, V.L.T.; ALVES, P.A.M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição

da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3; p. 574-579, 2008.

OMER, M.K.; SKJERVE, E.; WOLDCHIWET, Z. et al. A cross-sectional study of bovine tuberculosis in dairy farms in Asmara, Eritrea. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.33, n. 4, p. 295-303, 2001

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Situación de la tuberculosis bovina en las Américas**. Washington, D.C., 1995. 6f. (RIMS 9, Informativo 26).

O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v.76 (Supl.1), p.1-46, 1995.

ORDÓÑEZ, P.T.; FLORES, M.A.S.; SUAZO, F.M.; CASILLAS, I.C.R. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. **Veterinária**, México, v. 30, n. 3, p. 227-229, 1999

PACHECO, A. M.; HAMZÈ, A. L.; AVANZA, M. F. B.; PEREIRA, D. M.; PEREIRA, R. E. P.; CIPRIANO, R. S.; LOT, R. F. S. Tuberculose bovina – relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VII, n. 13, Julho de 2009

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONCA, L. J. P. Isolamento de *Mycobacterium* spp. do leite de vacas suspeitas e positivas para tuberculose. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001

Parra A, Garcia N, Garcia A, Lacombe A, Moreno F et al. (2008) Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Vet Microbiol** 127:. 10.1016/j.vetmic.2007.09.001 315-324 PubMed: 17954014 [PubMed]

PARSONS LM, BROSCH R, COLE ST et al (2002). Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. **J. Clin. Microbiol**; 40: 2339–2345

PEPIN, M. et al. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 56, p. 666-670, 1994.

PERREZ, A.M.; WARD, M.P.; TORRES, P.; RITACCO, V. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, p. 63-74, 2002

PFYFFER GE *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection and staining procedures. In: Murray PR, Barron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, (eds). *Manual of clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: **American Society for Microbiology**. 2007; p 543–572

PINTO, P.S.A.; FARIA, J.E.; VILORIA, M.I.V.; BEVILACQUA P.D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 3, n. 1, p. 10 - 15, 2002.

PINTO, P.S.A. Atualização em controle da tuberculose no contexto da inspeção de carnes. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 115- 121, 2003.

POLLOCK, J. M & NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. **The veterinary Journal**. v. 163, p.115-127, 2002.

POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D.; MCNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 37-43, 2005.

POROCA, D.R.; LIMA, A.S.; LIMA, J.F.A.; CRUZ, H.L.A.; MONTENEGRO, R.A.; MELO, F.L.; SCHINDLER, H.C.; MONTENEGRO, L.M.L. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n.6, p. 716-722, 2009

PYM, A. S. et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 709-717, 2002

PRODINGER, W. M. et al. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 2270– 2272, 2002

PRODINGER, W. M. et al. Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 4984–4992, 2005

PUSTIGLIONE NETO, L. Tuberculose dos bovinos. **Pecuária de corte**, São Paulo, v.6, n.66, p.52-53, 1997.

RADOSTITS, O. M.; GA Y, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 817-827.

RIBEIRO, A.R.P.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V. et al. Prevalência de tuberculose 370 e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.55, n.3, p. 371 374-376, 2003.

RIBEIRO, DANIELA CARVALHO. **Comparação de protocolos de extração de DNA para detecção de *Mycobacterium bovis* através da PCR em homogeneizados de órgãos bovinos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-07032007-115429/>.

Acesso em 2014-05-14

RODRIGUEZ, C.A.R. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos**. 2005, 86f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicado às

Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. São Paulo: São Paulo

RODWELL T. C, MOORE M., MOSER K. S, BRODINE S. K, STRATHDEE S. A 2008. Tuberculosis for *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. **Emerg. Infect. Dis.** 14 :909-916

ROMERO, R. E.; GARZON, D. L.; MEJIA, G. A.; MONROY, W.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. Canadian **Journal of veterinary Research.** v. 63, p. 101-106, 1999.

RORING, S.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.227- 236, 2000.

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.63, n.2, p. 91-97, 1996

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Pecuária de corte**, v.11, n.101, p.45-50, 2000.

ROXO, E. **Situação Atual da Tuberculose Bovina no Brasil**. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal, PNCE bovine tuberculosis. Secretaria de Defesa Agropecuária. Docum. PNCE bovine tuberculosis DDD2005, Sao Paulo, pp. 1–5. 2004.

ROXO, E., 2005. Situação Atual da tuberculose bovina no Brasil. Plano Nacional de Controle e erradicação da brucelose e tuberculose, tuberculose PNCE bovina (Plano nacional para o controle e erradicação da tuberculose e brucelose bovinas). Secretaria de Defesa Agropecuária. Docum. PNCE tuberculose bovina DDD2005, São Paulo, pp 1-5.

RUGGIERO, A. P. M. **Métodos moleculares aplicados ao diagnóstico da tuberculose bovina** 2004 68 f. Dissertação (mestrado). Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SABEDOT, M. A.; BATISTA, P. BRITO M.; POZZA, S. S.; BUSANELLO, M.; ALMEIDA, R. Z.; RODRIGUES, M. **Prevalência de tuberculose bovina na região sudoeste do Paraná**. In: ZOOTEC, 2009, Águas de Lindóia. Anais..., Águas de Lindóia, São Paulo, 2009.

SAKAMOTO, S.M.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, M.A. S.; ROXO, E.; RICHTZENHAIN, L.J.; VASCONCELLOS, S.A.; FERREIRA NETO, J.S. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) **Arquivosdo Instituto Biológico**, São Paulo, v.66, n.2, p.44-58, 1999.

SALAZAR, F. H. P. **Ocorrência da tuberculose causada por Mycobacterium bovis em bovinos abatidos em frigorífico no Estado do Mato Grosso, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 73 p. 2005.

SANT'ANNA, C.C.; FONSECA, L.S.; SAAD, M.H.F. Relação entre o diagnóstico sorológico (ELISA) e a gravidade da tuberculose pulmonar na infância, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 34, n. 6, p.531-535, 2001

SAURET, J.; JOLIS, R.; AUSINA, V. *et al.* Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. **Tubercle and Lung Disease**, Avenel, v. 73, p. 388-391, 1992

SKORIC, M. *et al.* Tuberculous and tuberculoid lesions in free living small terrestrial mammals and the risk of infection to humans and animals: a review. **Veterinarni Medicina**. v. 52, n. 4, p. 144–161, 2007.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos**. São Paulo: Manole, 1993, v. 1 e v. 2, p. 620, 621, 1218.

SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed. São Paulo: Manole. 2006. 1728 p.

SOUSA JPC, RODRIGUES AM, EXPOSTO F. Mycobacterium. In: Ferreira WF, Sousa JC. **Microbiologia**. Lisboa: Lidel. 2000; Vol 2 p 85-98

SOUZA, A.V., SOUZA, C.F.A., SOUZA, R.M., RIBEIRO, R.M.P., OLIVEIRA, A.L. (1999) A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene Alimentar**, 13 (59).

TAYLOR, T.B.; P ATTERSON, C.; HALE, Y.; S AFRANEK, W.W. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.79-85, 1997

TAYLOR, J.M.; H UGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; N EILL, S.D. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.4, p.1272-1278, 2001.

USABIAGA, J. **Brucelosis y tuberculosis bovina: ¿control o eliminación?** São Paulo: OMS, 2001. (RIMSA 12/15).

WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.227-240, 1995.

WARREN, R. M. et al. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 10 n. 7, p: 818–822, 2006.

WEDLOCK, D.N.; SKINNER, M.A.; LISLE, G.W. et al. Control of *Mycobacterium bovis* infection and the risk to human populations. **Microbes and Infection**, v.4, p. 471-480, 2002.

WHELAN AO, COAD M, COCKLE PJ, HEWINSON G, M VORDERMEIER et al. (2010) Revisiting host preference in the *Mycobacterium tuberculosis* complex: experimental infection shows *M. tuberculosis* H37Rv to be avirulent in cattle. PLoS ONE 5: e8527 10.1371/journal.pone.0008527 PubMed: 20049086 [PMC free article] [PubMed]

WIKER, H. G. MPB70 and MPB83 – Major Antigens of ***Mycobacterium bovis***. Scandinavian Journal of Immunology. v. 69, p. 492–499, 2009.

WOOD P.R. & JONES S.L. 2001. BOVIGAM™: An in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis** 81(1/2):147-155.

WOOD P.R., ROTHEL J.S., MCWATHERS P.G.D. & JONES S.L. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma--interferon. **Vet. Immun. Immunopathol.** 25:37-46.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) memorandum from a WHO meeting with the participation of FAO. *Bulletin of World Health Organization*, v.72, p.8510-8857, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Tuberculosis Control: a short update to the 2009 report. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/en/index.html>. Acesso em: 09 ago. 2013.

World Health Organization (WHO): Global Tuberculosis Control 2011 (WHO/HTM/TB/2011.1)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global tuberculosis Report 2013. Geneva: WHO, 2013

RUGGIERO, A. P. , A.A. IKUNO, V.C.A. FERREIRA, E. ROXO **Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico** 1Universidade de Brasília, Faculdade

de Agronomia e Veterinária, Departamento de Medicina Preventiva, Campus Universitário "Darcy Ribeiro", CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.1, p.55-65, jan./mar., 2007

YEBOAH-MANU, D.; YATES, M.D.; WILSON, S.M. Application of a simple multiplex PCR to aid in routine work of the mycobacterium reference laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.11, p.4166-4168, 2001.

ZANDEN, A.G.M. **Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis and control of tuberculosis.**, 2002. p.12-45. Tese (Doutorado) - Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen, 2002.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; FIORAVANTI, R.L.; R OXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M.I.; C ATALDI, A.; S ALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.6, p.2809-2813, 2001.

ZUMÁRRAGA, M. J.; PAOLICCHI, F.; GARBACCIO, S.; GIOFFRÉ, A. Aplicación de la PCR em detección de *Mycobacterium bovis* em muestras de tejido de terneros. **Veterinaria Argentina**, v. 28, n. 179, p. 668-676,2001.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA *MYCOBACTERIUM* spp. DIRETAMENTE DE AMOSTRAS GRANULOMATOSAS DE BOVINOS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE PROCEDENTES DE FRIGORÍFICO NA BAHIA

1.0 INTRODUÇÃO

Entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, a tuberculose afeta diversas espécies animais, especialmente bovinos. A doença é causada por micobactérias que pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) (VAN INGEN, 2012). Tratando-se dos aspectos biológicos, a parede celular desses bacilos possui composição química e estrutura complexa, particularmente rica em componentes lipídicos o que exerce influência na morfologia da bactéria e também conferem uma barreira contra a ação dos agentes físicos e químicos do meio ambiente, como também influencia na patogenia das respectivas infecções (HONG e HOPFINGER, 2004). Os ácidos micólicos são os principais responsáveis pela sua propriedade de álcool-ácido resistência, observada através da coloração Ziehl-Neelsen (ZN) (PFYFFER, 2007), além de dificultar a captação de nutrientes retardando o seu crescimento (COLLINS, 1994; NEILL et al., 2001), ultrapassando 12 semanas para crescer em meio de cultura apropriado (CORNER et al., 2012).

No aspecto do diagnóstico devido a desvantagens nos métodos existentes, tem sido descrito diversos ensaios moleculares para a tuberculose, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR). Tais descrições contemplam métodos comerciais ou não. Para atingir o objetivo da identificação da micobactéria dois pontos são muito relevantes, a seguir: a escolha correta dos *primers* e a qualidade da técnica de extração do DNA (COLLINS et al., 1994; ZUMÁRRAGA et al., 2001). No que se refere à extração e purificação do DNA cromossomal do bacilo, Acha e Szyfres (2001) acreditam ser uma etapa limitante ao uso da PCR em amostras clínicas devido à complexidade da parede celular. Wards, Collins e Lisle (1995) contribuem no mesmo sentido, afirmando que a lise da parede celular para a liberação do DNA íntegro representa um passo determinante neste procedimento e acrescentam a dificuldade de purificar a bactéria das amostras clínicas, já que este micro-organismo é intracelular.

Ribeiro (2006) menciona ser fortemente perceptível a anuência de pesquisadores na aplicação de PCR no diagnóstico e tipificação da tuberculose bovina. No entanto, quando se trata de extrair DNA diretamente do tecido a

sensibilidade do método é reduzida e este fato limita sua difusão como método diagnóstico de rotina. A autora salienta neste caso, atenção para protocolos de extração mais eficientes e menos vulneráveis aos fatores inibidores da amplificação.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar protocolo de extração de DNA de *Mycobacterium*, coletados diretamente do granuloma de bovinos com suspeita de tuberculose abatidos em frigoríficos da Bahia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo ocorreu em dois matadouros-frigorífico sob inspeção estadual no estado da Bahia nas regiões do Recôncavo e do Sudoeste. Ambos são importantes estabelecimentos de abate comercial. Foram coletadas em diferentes períodos entre os anos de 2012, 2013 e 2014 resultantes de bovinos sadios ao exame *ante mortem* não havendo distinção. As amostras foram lesões granulomatosa sugestivas de tuberculose. Coletou-se 74 fragmentos com tamanho aproximado de 2x2 cm, armazenados em coletor tipo universal estéril, identificados e armazenados à -20°C. Posteriormente as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia para armazenamento.

Após diferentes tempos de conservação, todas as amostras foram submetidas ao protocolo de extração de DNA para bactérias gram-positivas (QIAGEN, Alemanha) adaptado, com modificações no tempo de ação da lisozima e da proteinase K. De forma breve, 25mg do centro do conteúdo dos granulomas, foram ressuspensos em 180 µL de solução de lisozima (20 mg/mL de lisozima; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1.2% triton X-100) e incubados por 2h a 37 °C (a melhor ação da lisozima foi testado em diferentes intervalos de tempo (FELBERGH, 2010)); posteriormente, 20 µl de proteinase K (QIAGEN, Alemanha) e 200 µl de tampão de lise AL (QIAGEN, Alemanha) foram adicionados, seguidos por uma incubação de 1h a 56 °C e, logo após, 15 minutos a 95 °C para inativação da proteinase K. O objetivo desta etapa foi provocar a lise da parede bacteriana para liberação do DNA. Os DNAs foram, em seguida, purificados

utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha) conforme instruções do fabricante (utilização dos tampões do kit e etanol 100% intercalados de centrifugação variada em cada etapa) e eluídos em 50 µl de tampão AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0). A leitura das concentrações e grau de pureza dos DNAs foram determinados por aparelho nanodrop *Thermo Scientific* 2000c. Após estes resultados, cada DNA extraído foi diluído em água grau PCR, tantas vezes fosse necessário para padronização em 25ng de concentração a fim de participarem do mPCR.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As leituras espectrofotométricas resultaram em excelentes concentrações de DNA com ótimo grau de pureza variando entre 115,2 ng/µL e 6.404,1 ng/µL e entre 1,79 a 1,98 respectivamente. Nenhuma amostra se mostrou fora dos índices considerados para alto grau de pureza apesar da amostra possuir inúmeras impurezas (tabela 1). No mPCR, o ensaio demonstrou bons resultados (CAP. 2 e 3)

Tabela 1. Resultados da leitura em aparelho nanodrop *Thermo Scientific* 2000c do DNA extraído direto do granuloma bovino.

Amostra	Conc. DNA (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
am2	1878	37,56	19,894	1,89	2,09
am3	362,5	7,251	3,778	1,92	1,18
am4	1665,9	33,317	17,608	1,89	2,11
am5	4072,9	81,458	42,839	1,9	2,22
am6	870,9	17,419	9,25	1,88	2,1
am7	1165	23,3	12,441	1,87	2,19
am8	1664,8	33,297	17,486	1,9	2,09
am9	821,3	16,426	8,546	1,92	1,96

am10	4206	84,12	44,428	1,89	2,23
am11	1998,6	39,972	20,802	1,92	2,23
am12	2672,8	53,455	28,483	1,88	2,17
am13.1	421,4	8,428	4,465	1,89	1,39
am14.2	4281,8	85,636	44,043	1,94	2,24
am15.1	1361,2	27,224	14,464	1,88	2,07
am16.2	3485,5	69,711	36,863	1,89	2,26
am17	772,8	15,456	8,188	1,89	2,11
am19	1865,7	37,315	19,634	1,9	1,99
am21	971,2	19,425	10,369	1,87	2,04
am25	1776,1	35,521	18,812	1,89	2,07
am26	4763,9	95,278	51,195	1,86	2,17
am27	4610,2	92,204	48,416	1,9	2,21
am28	811,2	16,224	8,68	1,87	2,12
am29	2763,4	55,269	29,514	1,87	2,18
am30	2343,3	46,867	24,689	1,9	2,2
am31	3262,9	65,257	34,073	1,92	2,25
am32	3335,9	66,719	34,593	1,93	2,21
am33	5439,5	108,791	57,914	1,88	2,17
am35.2	537,1	10,742	5,646	1,9	1,92
am36	4773,7	95,475	49,957	1,91	2,23
am37	6404,1	128,083	71,474	1,79	2,05
am38	291,5	5,829	3,064	1,9	1,46
am39	324,3	6,485	3,368	1,93	1,61
am40	3327,2	66,543	35,385	1,88	2,19
am41	5028,8	100,577	53,45	1,88	2,19
am42	1121,9	22,437	12,042	1,86	1,75
am43	1009,4	20,188	10,734	1,88	2,16

am44	710	14,2	7,692	1,85	2,05
am45	1239,8	24,796	13,087	1,89	2,09
am46	3529,8	70,595	37,342	1,89	2,23
am47	5868,6	117,373	64,755	1,81	2,09
am48	855,5	17,11	9,073	1,89	1,75
am49	1066,9	21,338	11,84	1,8	1,72
am50	3786,2	75,723	40,04	1,89	2,14
am51	1226,1	24,521	13,117	1,87	1,95
am52	1552,1	31,042	16,418	1,89	2,2
am53.1	1629,5	32,59	17,237	1,89	2,06
am54	140,2	2,804	1,502	1,87	1,47
am56	3289,3	65,786	34,573	1,9	2,25
am57	2275,1	45,502	24,219	1,88	2,17
am58	663,2	13,265	7,024	1,89	1,91
am59	986,8	19,737	10,723	1,84	1,94
am60	1599,5	31,99	16,982	1,88	2,2
am61	3390,9	67,819	35,558	1,91	2,22
am62	242,1	4,841	2,543	1,9	1,97
am63	216,1	4,322	2,212	1,95	1,07
am64	1707	34,14	17,756	1,92	2,06
am65	210,8	4,216	2,195	1,92	1,39
am66	770,4	15,408	8,232	1,87	1,4
am67.1	2619,8	52,396	28,468	1,84	2,16
am68	149,7	2,993	1,557	1,92	1,32
am69	674	13,479	7,215	1,87	2,16
am-1N	577,2	11,545	5,835	1,98	1,29
am-2N	1127	22,54	11,558	1,95	1,73
am-3N	519,7	10,394	5,286	1,97	1,38

am-4N	115,2	2,303	1,183	1,95	0,49
am-5N	390,6	7,812	4,055	1,93	0,9
am-6N	1834,9	36,698	18,555	1,98	1,99
am-7N	192,8	3,856	1,975	1,95	1,08
am-8N	311,2	6,224	3,181	1,96	1,22
am-9N	1048	20,96	10,784	1,94	2,15
am-10N	506,7	10,134	5,383	1,88	1,68
am-11N	760,6	15,212	7,956	1,91	1,73
am-12N	833,7	16,675	8,843	1,89	2,12
am-13N	390,6	7,813	4,172	1,87	1,9

Um protocolo eficaz de PCR deve incluir um procedimento de extração de DNA capaz de lisar a parede da micobactéria, promover boa recuperação do material genético e ainda remover os inibidores da reação (TAYLOR, 2007). Baseado na afirmativa do autor o protocolo realizado na presente pesquisa foi eficaz. Certamente o tratamento dado às amostras com os tempos e temperaturas da proteinase K e lisozima foram determinantes para o sucesso. Foi possível verificar altas concentrações de DNA neste trabalho assim como foi relatado por Fehlberg (2010) em trabalho com caprinos. A autora também avaliou presença de fatores inibitórios e esse fato também não ocorreu, porque o grau de pureza das amostras foi alto assim como o achado deste estudo. Honoré-Bouakline (2003) utiliza para tratamento da amostra, etapa semelhante com modificações e enfatiza a importância da preparação do DNA para eficiência do PCR.

Neste contexto, o protocolo utilizado demonstrou ser capaz de lisar parede da bactéria e extrair o DNA atingindo altas concentrações com excelentes graus de pureza apesar de toda contaminação vinda da amostra e tempo de conservação. Recomenda-se o uso do QIAamp DNA Mini Kit nestas condições para extração de DNA de *Mycobacterium*.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses e enfermedades transmisibles comunes al hombre e a los animales**. Washington: Organización Paramericana de la Salud, 2001 398p. (Publicación Científica y Técnica n. 580)

COLLINS, D.M.; R ADFORD, A.J.; D E LISLE, G.W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.83-94, 1994.

CORNER L. A, GORMLEY E, PFEIFFER DU (2012) the primary isolation of Mycobacterium bovis from bovine tissues: conditions to maximize the number of positive cultures. Vet Microbiol 156: 162-171. doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.016 PubMed: 22074859 [PubMed]

FEHLBERG, I. **Estudo da ocorrência de infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e/ou *Mycobacterium* spp. em caprinos com suspeita clínica de linfadenite caseosa.** Italaney Fehlberg. – Salvador, 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2010.

HONG X.; HOPFINGERA. J., et al. (2004). Construction, Molecular Modeling, and Simulation of Mycobacterium tuberculosis Cell Walls. Biomacromolecules.

HONORÉ-BOUAKLINE, S. et al. Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of Sample Preparation and DNA Extraction. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 2323–2329, 2003

NEILL, S. D.; BRYSON, D. G; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in Cattle. **Tuberculosis**. v. 81, n. 1/2, p. 79-86, 2001

PFYFFER G. E. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection and staining procedures. In: Murray PR, Barron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, (eds). Manual of clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC: **American Society for Microbiology**. 2007;

RIBEIRO, DANIELA CARVALHO. **Comparação de protocolos de extração de DNA para detecção de *Mycobacterium bovis* através da PCR em homogeneizados de órgãos bovinos.** 2006. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-07032007-115429/>. Acesso em 2014-05-14

TAYLOR, G. M. et al. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**. v. 3. n. 12, 2007

VAN INGEN J, RAHIM Z, MULDER A, BOEREE MJ, SIMEONE R et al. (2012) Characterization of *Mycobacterium* *mycoides* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 18: 653-655. 10.3201/eid1804.110888PubMed: 22469053 [PMC free article] [PubMed]

WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.227-240, 1995

ZUMÁRRA, M. J.; PAOLICCHI, F.; GARBACCIO, S.; GIOFFRÉ, A. Aplicación de la PCR em detección de *Mycobacterium bovis* em muestras de tejido de terneros. **Veterinaria Argentina**, v. 28, n. 179, p. 668-676,2001.

CAPÍTULO 2

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE mPCR DIRETAMENTE DE AMOSTRAS GRANULOMATOSAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE ORIUNDAS DE BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO NA BAHIA

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE mPCR DIRETAMENTE DE AMOSTRAS GRANULOMATOSAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE ORIUNDAS DE BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO NA BAHIA

Autor: Évelin Santiago Vasconcelos dos Santos

Orientador: Dr. Robson Bahia Cerqueira

RESUMO:

Tem sido amplamente estudados ensaios de investigação molecular para diagnóstico da tuberculose bovina. Estes métodos vem possibilitar maior agilidade e possuem alta sensibilidade e alta especificidade além de permitirem realização de diagnóstico diferencial entre doenças e identificação precisa do agente etiológico que é de grande importância para a epidemiologia, tratamento e prognóstico especialmente na saúde pública. O trabalho objetivou avaliar o mPCR como ferramenta para o diagnóstico da tuberculose realizado diretamente do material granulomatoso de lesões suspeitas coletadas em frigorífico sob inspeção estadual da região do Recôncavo da Bahia. Foram analisadas 13 amostras de bovinos suspeitos resultando em 61,54% das amostras positivas no isolamento sem diferença estatisticamente significativa para o mPCR que detectou 54% de *M. bovis* com a expressiva vantagem de divulgar resultado dentro de um período máximo de 48h, além de detectar várias espécies em uma única reação, não depender da cultura bacteriana e não necessitar do micro-organismo vivo para positivar o diagnóstico. Todo DNA extraído evidenciou boa concentração na extração e adequado grau de pureza. Os resultados indicam que o protocolo mostrou-se eficaz, rápido e bastante promissor na vigilância em matadouro.

Palavras chave: mPCR, tuberculose, granuloma, *Mycobacterium bovis*

USING THE mPCR TECHNIQUE DIRECTLY FROM GRANULOMATOUS SUSPECTED TUBERCULOSIS SAMPLES FROM CATTLE SLAUGHTERED IN SLAUGHTERHOUSE IN BAHIA

Author: Évelin Santiago Vasconcelos dos Santos

Advisor: Dr. Robson Cerqueira Bahia

ABSTRACT:

Bovine tuberculosis diagnosis has been widely studied by molecular assays. These methods have enabled greater agility, high sensitivity and specificity. Furthermore allow differential diagnosis between diseases and accurate identification of the etiologic agent which is of great importance to the epidemiology, treatment and prognosis especially in public health. The aim of this study was to evaluate mPCR as a tool for the diagnosis of tuberculosis performed directly from granulomatous material of suspicious lesions collected in slaughterhouses under inspection in Reconcavo area in Bahia state. Thirteen cattle suspected samples were analyzed resulting in 61.54% positive isolation with no significant statistical difference in the molecular assay where was detected 54% of *M. bovis*. with the significant advantage to disclose results within a maximum period of 48 h in addition to detect multiple species in a single reaction, not depend on bacterial culture and does not require the living micro-organism to make positive the diagnosis. DNA showed good concentration on the extraction and appropriate purity. The results indicate that the protocol was effective, fast and very promising in slaughterhouse vigilance.

Keywords: mPCR, tuberculosis, granuloma, *Mycobacterium bovis*

1.0 INTRODUÇÃO

Dentre as principais espécies do gênero *Mycobacterium* que possuem importância epidemiológica destacam-se aquelas pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (MTB), que compreende: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canettii* e *M. microti*, (HUARD et al., 2003; COUSINS et al., 2003; PRODINGER et al., 2005; SKORIC et al., 2007) e ainda citado por Alexander (2010) o *M. mungii* sendo este complexo, o grupo responsável pela maioria dos casos de tuberculose humana e animal (MURAKAMI, 2009). O homem pode, portanto, contrair a doença de diferentes animais e igualmente transmitir-lhes a infecção (PINTO, 2003; VAN, 2012, TORRES, 2013). Ainda em 2009 a OMS relata que a doença nos humanos continua a ser uma infecção endêmica em vários países.

O aspecto epidemiológico da enfermidade entre os bovinos no Brasil demonstra dados escassos e diferenciados dependendo da área pesquisada, em virtude da grande dimensão territorial e as características de criação próprias de cada região (RIBEIRO, LOBATO e ABREU, 2003). No estado da Bahia, estudo realizado por Costa (2012) indicou as prevalências de focos de TB e de bovinos reagentes de 1,6% e 0,21%, respectivamente. O inquérito no Estado foi realizado no período de 2008 a 2010. Os menores índices da doença foram encontrados em propriedades com exploração apenas de corte, em virtude entre outros fatores, dos bovinos serem abatidos precocemente, tendo um menor tempo de exposição aos membros infectados do rebanho. O sistema de criação é epidemiologicamente importante ainda para a inspeção sanitária nos matadouros, no que se refere ao abate de vacas leiteiras de descarte (MENZIES e NEILL, 2000).

O uso de estabelecimentos tipo matadouro - frigorífico para vigilância epidemiológica de enfermidades alvo em programas de controle ou que possuem caráter zoonótico é uma importante ferramenta no sistema de vigilância (ROSA, 2012), entretanto Corner (1994) ressalta que a prevalência da tuberculose, global e específica pode ser duplicada porque a inspeção de rotina só identifica cerca de 47% das lesões tuberculosas macroscopicamente detectáveis.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2006), a grande inespecificidade dos sinais clínicos, a dificuldade de isolamento do *M. bovis* do animal vivo e o baixo nível de anticorpos durante o período inicial da infecção fazem com que os diagnósticos clínicos, bacteriológico e sorológico tenham um valor relativo. O MAPA afirma ainda que existem métodos diagnósticos adequados para o desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, entretanto, não existe um método diagnóstico que tenha uma eficácia absoluta.

É consenso entre os pesquisadores que o método diagnóstico definitivo da tuberculose é o isolamento do agente, chamado também de "padrão-ouro" (ALMEIDA et al., 2004; PARRA, 2008). É essencial para definir as condições ideais para a cultura, que se leve em conta, a concentração de bacilos na amostra e os riscos de contaminação, uma vez que estes fatores podem influenciar a seleção de procedimentos de descontaminação e a duração da incubação (GORMLEY, 2014).

Em todo esse cenário surge a biologia molecular que em virtude da longa demanda de tempo para isolamento e identificação do agente, tornam procedimentos moleculares cada vez mais promissores a exemplo da PCR. Alguns testes, como o de Warren e colaboradores (2006) utilizando PCR *multiplex* para identificação de espécies do gênero *Mycobacterium* se tornam aceitáveis para serem usados em propostas de inspeção e laboratórios de rotina. Parra et al (2008) afirmam ser necessário desenvolver sistemas de diagnóstico que são diretamente aplicáveis de amostras biológicas colhidas direto do matadouro

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o mPCR como ferramenta para o diagnóstico da tuberculose realizado diretamente do material granulomatoso de lesões suspeitas de bovinos, coletadas em matadouro - frigorífico sob inspeção estadual da região do Recôncavo da Bahia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ATUAÇÃO

O local de realização do estudo se deu em um matadouro-frigorífico sob inspeção estadual (ADAB/DIPA) no estado da Bahia. O matadouro localizado na Rodovia BA – 026, Santo Antônio de Jesus- BA é um importante estabelecimento de abate com abrangência em mais de 200 municípios do estado com distância de até 758 Km chegando a abater bovinos dos estados de Minas Gerais e Tocantins.

3.2 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras no período de outubro de 2013 a janeiro de 2014 resultantes de bovinos sadios ao exame *ante mortem* não havendo distinção de idade, raça, sexo ou região de procedência. Neste período, um total de 33.205 bovinos foram abatidos procedentes de 150 municípios baianos. A análise ocorreu em animais pós abate que foram submetidos a avaliação sistemática de carcaças e vísceras pela inspeção sanitária. Durante o exame foi realizada busca por lesões sugestivas de tuberculose, nas linhas de inspeção de acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de origem Animal (RIISPOA). Quando ocorria suspeita, a decisão sanitária era tomada conforme determinado pelo artigo 196 do mesmo regulamento (BRASIL, 1997).

O material selecionado foi qualquer órgão ou tecido com lesões sugestivas sem restrição para a quantidade de alteração coletada do mesmo animal. Foram considerados suspeitos, locais que apresentaram lesões nodulares de tamanhos e formas variadas contendo exsudato purulento, caseoso ou calcificado. Coletou-se 13 fragmentos com tamanho aproximado de 2x2 cm, armazenados em coletor tipo universal estéril, identificados e armazenados à -20°C. Posteriormente as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia para armazenamento.

2.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

As amostras foram alicotadas e enviadas à USP (Universidade de São Paulo) – Laboratório de Zoonoses Bacterianas com o objetivo de análise bacteriológico, sendo processadas segundo protocolo local. Em resumo, o material foi descontaminado pelo método de HPC (Cetyridinium chloride monohydrate, 98%) com posterior semeadura em meio de *Lowenstein-Jensen e Stonebrink Leslie* em duplicata; os tubos foram observados durante 60 dias semanalmente para confirmação do diagnóstico quando permaneceram incubados a 37°C, sendo confirmada a espécie por PCR local.

2.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE *MULTIPLEX*

2.4.1 Extração de DNA dos conteúdos dos abscessos

De todas as amostras, foi realizado extração de DNA. O protocolo foi para bactérias gram-positivas (QIAGEN, Alemanha) adaptado, com modificações no tempo de ação da lisozima e da proteinase K. De forma breve, 25mg do centro do conteúdo dos granulomas, foram ressuspensos em 180 µL de solução de lisozima (20 mg/mL de lisozima; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1.2% triton X-100) e incubados por 2h a 37 °C (a melhor ação da lisozima foi testado em diferentes intervalos de tempo (FELBERGH, 2010)); posteriormente, 20 µl de proteinase K (QIAGEN, Alemanha) e 200 µl de tampão de lise AL (QIAGEN, Alemanha) foram adicionados, seguidos por uma incubação de 1h a 56 °C e, logo após, 15 minutos a 95 °C para inativação da proteinase K. O objetivo desta etapa foi provocar a lise da parede bacteriana para liberação do DNA. Os DNAs foram, em seguida, purificados utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha) conforme instruções do fabricante (utilização dos tampões do kit e etanol 100% intercalados de centrifugação variada em cada etapa) e eluídos em 50 µl de tampão AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0). A leitura das concentrações e grau de pureza dos DNAs foram determinados por aparelho nanodrop *Thermo Scientific* 2000c. Com estes resultados, cada DNA extraído foi diluído em água grau PCR, tantas

vezes fosse necessário para padronização em 25ng de concentração. Logo após, foram armazenados a -20 °C até a realização dos mPCRs.

2.4.2 Primers

Os primers deste estudo foram obtidos de trabalho publicado anteriormente por Warren et al (2006) para diferenciação de espécies do gênero *Mycobacterium spp.* (quadro 1).

2.4.3 Condições do mPCR de *Mycobacterium spp.*

Microtubos de 200 µl, contendo volume final de 25µl cada, foram utilizados, sendo: 0,625 Unidades da enzima HotStarTaq plus DNA polymerase (QIAGEN), tampão de PCR 1X, tampão Q 1X, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 1 µM de cada *primer* e 50 ng de DNA. Para controles positivos foram usados DNA de *M. bovis* e *M. tuberculosis* gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunologia e Biologia molecular, ICS- UFBA, Bahia, Brasil e para os negativos água, presente em todas as reações para avaliar o surgimento de contaminação nos reagentes. As reações foram realizadas no termociclador (Bio-Rad iCycler iQ5) sob as seguintes condições: incubação inicial a 95 °C por 5 minutos (para ativação da enzima); seguidos por 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. As etapas do mPCR foram realizadas em áreas fisicamente separadas para minimizar o risco de contaminação cruzada.

2.5 ELETROFORESE

A eletroforese (6V/cm) dos produtos amplificados ocorreu em gel de agarose 3% (w/v) em tampão TBE 1X. O corante utilizado foi o *Blue Green Loading Dye I*

da LGC Biotecnologia. O quadro 1 contém o tamanho dos produtos de PCR (em pb) esperados para 5 diferentes membros do complexo MTB avaliados.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os resultados foi utilizado Modelo Linear Generalizado GLM para uma distribuição binomial, ANOVA, função de ligação *logit*, tendo as médias avaliadas pelo teste de médias Bonferroni a 5% de significância. Foi utilizado programa R /2012.

Sequência primer	RD	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis BCG</i>	<i>M. canettii</i>
AAGCGTTGCCGCCGACCGACC CTGGCTATATTCCTGGCCCGG GAGCGGATCTGGCGGTTTGGGG	1	RD1 presente (146 pb)	RD1 presente (146 pb)	RD1 presente (146 pb)	RD1 ausente (196 pb)	RD1 presente (146 pb)
ATGTGCGAGCTGAGCGATG TGTAATACTGCTGACCCATGCG AAAGGAGCACCATCGTCCAC	4	RD4 presente (172 pb)	RD4 presente (172 pb)	RD4 ausente (268 pb)	RD4 ausente (268 pb)	RD4 presente (172 pb)
CAAGTTGCCGTTTCGAGCC CAATGTTTGTGCGCTGC GCTACCCCTCGACCAAGTGT	9	RD9 presente (235 pb)	RD9 ausente (108 pb)	RD9 ausente (108 pb)	RD9 ausente (108 pb)	RD9 presente (235 pb)
GGGAGCCCAGCAATTTACCTC GTGTTGCGGGAATTACTCGG AGCAGGAGCGGTTGGATATTC	12	RD12 presente (369 pb)	RD12 ausente (306 pb)	RD12 ausente (306 pb)	RD12 ausente (306 pb)	RD12 ausente

Quadro 1 Lista de primers com o tamanho dos produtos de amplificação correspondentes indicando a presença ou ausência da região de diferença (RD) em 5 diferentes membros do complexo *Mycobacterium*. (WARREN, 2006)

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oriundos de 150 municípios do estado da Bahia 33.205 bovinos foram inspecionados. Desse total, 11.577 fêmeas, 21.628 machos e 03 animais com lesões sugestivas de tuberculose representando uma frequência para o período analisado de 0,01%. Dentre as 13 amostras submetidas ao exame bacteriológico 61,5% (8/13) apresentaram crescimento característico de *Mycobacterium bovis* em meio *Stonebrink - Leslie* sendo confirmadas a partir das colônias por PCR de acordo com protocolo da USP. As amostras também foram semeadas em meio *Lowenstein-Jensen* na tentativa de isolar outras espécies de micobactérias, entretanto, não houve crescimento de colônias em nenhuma das amostras cultivadas neste meio (tabela 1).

Tabela 01 - Resultado de isolados identificados como *M. bovis* ou *M. tuberculosis* a partir de granulomas bovinos oriundos de frigorífico da região do Recôncavo da Bahia

Amostra	<i>Stonebrink-Leslie</i>	<i>Lowenstein-Jensen</i>	PCR - USP
1	+	-	<i>M. bovis</i>
2	+	-	<i>M. bovis</i>
3	+	-	<i>M. bovis</i>
4	+	-	<i>M. bovis</i>
7	+	-	<i>M. bovis</i>
9	+	-	<i>M. bovis</i>
10	+	-	<i>M. bovis</i>
13	+	-	<i>M. bovis</i>
Total	08	0	100%

Em relação às características epidemiológicas, pode-se observar localização da lesão e origem dos referidos animais (tabela 2).

Tabela 2. Localização da lesão e origem do animal com granulomas bovinos oriundos de frigorífico da Região do Recôncavo da Bahia

Amostra	Localização	Origem
1	pulmão	Santo Antônio de Jesus
2	pulmão	Santo Antônio de Jesus
3	fígado	Santo Antônio de Jesus
4	fígado	Santo Antônio de Jesus
5	fígado	Santo Antônio de Jesus
6	fígado	Santo Antônio de Jesus
7	fígado	Dom Macêdo Costa
8	linfonodo	Dom Macêdo Costa
9	linfonodo	Nazaré
10	linfonodo	Nazaré
11	linfonodo	Nazaré
12	linfonodo	Nazaré
13	linfonodo	Nazaré

Diante dos resultados expostos, foi interessante observar que um mesmo animal mostrou amostra positiva e negativa ao isolamento, dependendo da região analisada. Vale ressaltar que uma lesão positiva no isolamento caracteriza o animal como infectado pelo *Mycobacterium* ssp. Foi possível comprovar também que a equipe de inspeção demonstrou precisão na indicação das carcaças que poderiam estar com tuberculose, já que todos os animais indicados foram comprovadamente positivos ao exame bacteriológico em pelo menos um material granulomatoso coletado.

Miller et al. (2002) e Araújo et al. (2005), abordam que devido ao fato do número de bactérias vivas ser pequena em alguns tecidos, a eficácia da cultura como principal método de identificação *M. bovis* deve ser discutido também consideram como argumentos válidos, o tempo na obtenção das amostras até chegada ao laboratório e ainda a sensibilidade dos bacilos ao processo de descontaminação.

De acordo com Araújo (2005), estudos realizados no país, a partir de exames de carcaças em matadouros-frigoríficos, estimaram uma prevalência de tuberculose bovina de 0,17% em Minas Gerais; 5,16% no Pará e 0,64% no Rio Grande do Sul, dados superiores aos encontrados no presente trabalho. Ao referir-se a tal assunto, ele diz que diferenças de prevalências estão relacionadas ao grau de desenvolvimento regional, principalmente no que se refere ao estabelecimento de medidas sanitárias no rebanho. Existe uma estimativa de ocorrência em torno de 5,7% do rebanho nacional. Destes, 0,14% corresponde ao achado de lesões em matadouros (PUSTIGLIONE NETO, 1997; ROXO, 2000)

Furlanetto et al (2012) ao analisarem sete estabelecimentos de abate, encontraram 0,007% de prevalência aparente de tuberculose bovina em animais no estado de Mato Grosso, sendo este dado inferior ao achado nesta pesquisa. Ao analisar índices de tuberculose encontrados em matadouros os autores afirmam dever-se considerar o fato da inspeção de rotina *post mortem* não identificar todos os animais doentes, além do abate clandestino especialmente de animais de descarte ou a eliminação de bovinos positivos na unidade de criação que subestimam a real prevalência da enfermidade. Também Riet – Correa e Garcia (2001) afirmam que deve-se ponderar sobre a sensibilidade e critério da inspeção, além do sistema de criação. Por outro lado, Pinto (2003) destaca o fato de lesões que não são macroscopicamente suspeitas, serem positivas para a doença.

No cenário da investigação molecular, as leituras dos DNAs extraídos diretamente dos granulomas foram realizadas em espectrofotômetro variaram entre 115,2 ng/μL e 1.834,9 ng/μL de concentração e o grau de pureza entre 1,87 a 1,98 atestando DNA puro. As 13 amostras foram avaliadas pelo PCR *multiplex*

e destas, 54% (7/13) apresentaram perfil de amplificação característico de *M. bovis* (tabela 3, figura 1 e 2) o que inclui 15,38% de amostras que foram negativas no cultivo. Dentre as outras quatro espécies avaliadas, não foi detectado nas amostras amplificadas perfil de bandas característicos das mesmas (figura 1 e 2). Afirmando por Parsons (2002) e Halse et al. (2011) estudos nas regiões de diferença (RD) dos genomas bacterianos demonstraram que algumas delas foram também ausentes de outros membros da TBC, sugerindo, assim, que a presença ou ausência destas regiões podem ser úteis na diferenciação de membros do complexo.

Tabela 3. Resultado das amostras positivas para *M. bovis* no PCR *multiplex* direto do material caseoso de lesões suspeitas para o diagnóstico da tuberculose bovina de frigorífico da Região do Recôncavo da Bahia

AMOSTRAS	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. canetti</i>
2	-	-	+	-	-
3	-	-	+	-	-
4	-	-	+	-	-
5	-	-	+	-	-
6	-	-	+	-	-
7	-	-	+	-	-
10	-	-	+	-	-
TOTAL	0	0	7	0	0

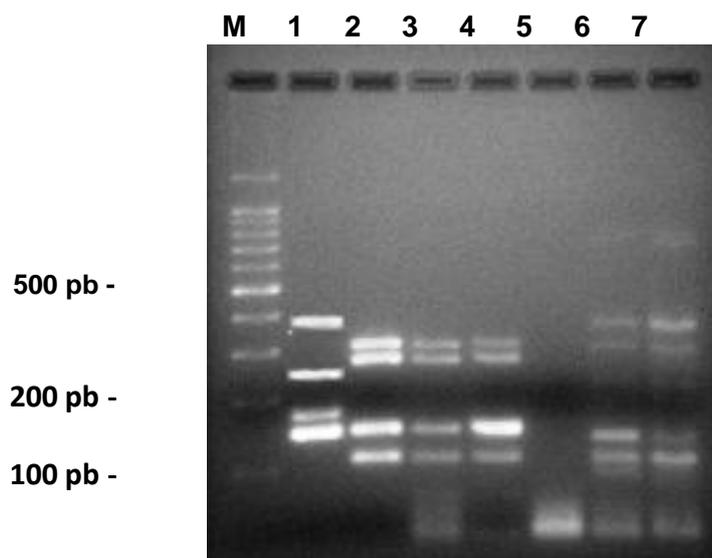


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose. Perfil de amplificação de amostras colhidas direto do material de granulomas bovinos. Linha M, marcador molecular (100pb *ladder*); linha 1, controle positivo *M. bovis*; linha 2 amostra positiva; linha 4, controle negativo; linhas 3, 5, 6 e 7, amostras negativas.

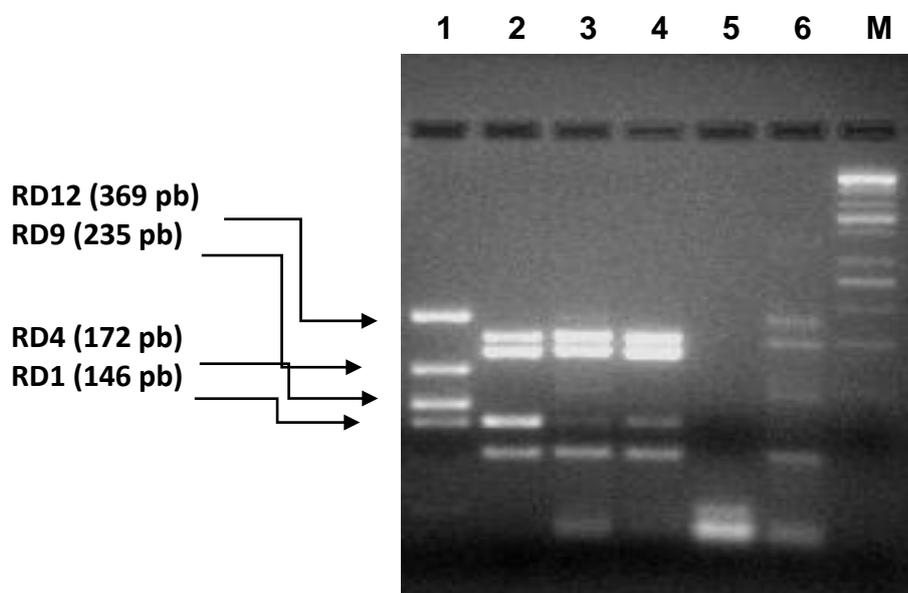


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose. Perfil de amplificação de amostras colhidas direto do material de granulomas bovinos. Linha 1, controle positivo *M. tuberculosis*; linhas 2, controle positivo *M. bovis*; linhas 3 e 4 amostras positivas; linha 5, controle negativo; linha 6, amostra negativa e linha M, marcador molecular (100pb *ladder*).

A aplicação do protocolo de mPCR permitiu com eficácia a distinção rápida e precisa de diferentes espécies de micobactérias. O método demonstrou estatisticamente ser tão eficaz quanto o exame microbiológico na detecção dos animais infectados por tuberculose com a expressiva vantagem de divulgar diagnóstico dentro de um período máximo de 48h, além de detectar várias espécies em uma única reação, não depender da cultura bacteriana e não necessitar do micro-organismo vivo para positivar o diagnóstico (tabela 4). Protocolo *multiplex* foi realizado com sucesso por Warren (2006); Arráiz (2007); Corset (2007) e Kee (2009).

Roring et al., (2000); Antognoli et al. (2001); Ribeiro, (2006) apontam dificuldades no uso de técnicas moleculares para diagnóstico, especialmente no uso deste método a partir diretamente do material caseoso. A eficácia do ensaio da PCR para diagnóstico da TB depende de diversos fatores, tais como: a qualidade do DNA, preferencialmente livre de contaminantes; escolha correta dos *primers* para amplificação, assim como no emprego de protocolos de extração de ácidos nucléicos adequados, especialmente para amostras paucibacilares (RORING et al., 2000; ZANINI et al., 2001; NAKATANI et al, 2004; SALAZAR, 2005; TAYLOR et al., 2007).

Um protocolo eficaz de PCR deve incluir um procedimento de extração de DNA capaz de lisar a parede da micobactéria, promover boa recuperação do material genético e ainda remover os inibidores da reação (TAYLOR, 2007). Baseado na afirmativa do autor o protocolo realizado na presente pesquisa foi eficaz. Certamente o tratamento dado as amostras com os tempos e temperaturas da proteinase K e lisozima foram determinantes para o sucesso. Foi possível verificar altas concentrações de DNA neste trabalho assim como foi relatado por Fehlberg (2010) em estudo com caprinos com mesmo protocolo e ensaio com modificações relatado por Honoré-Bouakline (2003). A autora também avaliou presença de fatores inibitórios e esse fato também não ocorreu, porque houve amplificação dos produtos de PCR.

Tabela 4- Resultado do mPCR e do isolamento de material granulomatoso de lesões suspeitas de tuberculose oriundo de frigorífico da Região do Recôncavo da Bahia

AMOSTRA	ISOLAMENTO	PCR
Am 1	+	-
Am 2	+	+
Am 3	+	+
Am 4	+	+
Am 5	-	+
Am 6	-	+
Am 7	+	+
Am 8	-	-
Am 9	+	-
Am 10	+	+
Am 11	-	-
Am 12	-	-
Am 13	+	-
TOTAL	08 (61,54%)	07 (54%)

Foi estabelecido uma correlação de ambas as técnicas utilizadas no presente trabalho e ficou demonstrado que a mPCR concordou em 61,54% dos casos com o cultivo, ressaltando a capacidade de detecção de amostras positivas que não haviam apresentado crescimento microbiológico. Três amostras foram positivas somente do isolamento e duas somente no mPCR (tabela 5). Esta discordância pode ser justificada. Para as lesões positivas somente no isolamento poderá ter havido problema na extração especialmente graças a quantidade muito pequena utilizada no protocolo (25mg) o que pode levar à ausência do *Mycobacterium* naquela alíquota. Para diferença de positividade só para PCR, as amostras paucibacilares também podem acontecer de demonstrarem ser falso

negativas. Outra justificativa é o processo de descontaminação que poderá ter eliminado os bacilos, além de problemas com contaminação (ZANINI *et al.*, 2001; GORMLEY, 2014). Os resultados dos ensaios de cultura podem ser afetados também pelos meios de crescimento e condições de incubação usadas e a distribuição restrita de micobactérias em tecidos (CORNER *et al.*, 2012). É enfatizado por Rodriguez *et al.*, (1995) e Roring *et al.*, (2000) a importância da comparação entre outros métodos de diagnóstico com o isolamento. Todos os animais em pelo menos uma amostra foi positivo em ambos os testes no presente trabalho.

Tabela 5. Relação entre isolamento e PCR *multiplex* direto do material granulomatoso de lesões suspeitas para o diagnóstico da tuberculose bovina de frigorífico da Região do Recôncavo da Bahia.

		mPCR		TOTAL
		POS	NEG	
ISOLAMENTO	POS	5 (38,5%)	3 (23,1%)	8 (61,5%)
	NEG	2 (15,4%)	3 (23,1%)	5 (38,5%)
TOTAL		7 (53,9%)	6 (46,2%)	13 (100%)

Seria conveniente estabelecer relação ao mPCR com os ensaios de Alzamora (2014), que isolou *Mycobacterium* em 56% das lesões de bovinos do estado da Bahia provenientes de frigorífico e praticou diagnóstico molecular semelhante porém utilizou extração por fervura e a partir da cultura.

Pesquisa no Rio de Janeiro com 24 bovinos com história de TB reagentes e inconclusivos ao TCC abatidos e necropsiados resultou em amostras analisadas por PCR *multiplex* encontrando através desta técnica 78,3% de positividade demonstrando a cultura 83% dos positivos (ZARDEN, 2013). Tem-se relato de protocolos para diagnóstico de tuberculose a partir de material caseoso com sucesso (PACHECO 2007, CARDOSO, 2009, FURLANETTO, 2012), porém a associação de métodos e o estabelecimento da correlação com o padrão ouro é fundamental. Marassi (2013) sugere através de seu estudo que dentre os métodos existentes, nenhum dos atuais possibilitou a identificação de todos os animais infectados entre os quais, isolamento e PCR utilizado por ele.

4.0 CONCLUSÕES

O protocolo de extração utilizado para granulomas bovinos mostrou-se bem sucedido visto que demonstrou altas concentrações e excelente grau de pureza para todas as amostras analisadas.

A m-PCR utilizada demonstrou ser uma ferramenta eficaz e rápida para identificação da presença do *Mycobacterium* diretamente de amostras de lesões sugestivas da doença, demonstrando ainda capacidade de distinguir espécies diferentes dentro do gênero.

Por último, conclui-se que a utilização da mPCR para avaliar casos de TB poderá somar para o aumento da eficácia das medidas de controle auxiliando a vigilância em matadouro.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R.F.C. **Investigação de focos de tuberculose bovina em rebanhos de corte a partir de lesões sugestivas ao abate no estado do Mato Grosso do Sul** (Dissertação). Campo Grande: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2004. 93 p

ANTOGNOLI, M.C.; SALMAN, M.D.; TRIANTIS, J.; HERNÁNDEZ J.; KEEFE, T. A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.111-116, 2001.

ALZAMORA FILHO, Fernando et al . Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 34, n. 2, Feb. 2014.

ARAUJO, C.P., C.Q.F. LEITE, K.A. PRINCE, K.S.G. JORGE, AND A.L.R. OSORIO, 2005: *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 749–752.

ARRÁIZ RN, ROMAY BZ, FARIA MN *Multiplex* PCR, which targets many different genes simultaneously, has been used for this goal. **Rev Chilena Infectol.** 2007 Abr; 24 (2) :99-105

AVILA, Luciana N. et al . Análise de detecção de cluster na caracterização espaço-temporal da tuberculose bovina no estado da Bahia. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 33, n. 11, Nov. 2013 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013001100005&lng=en&nrm=iso>. access on 02 Aug. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013001100005>.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília, 2006.

CARDOSO, M.A.; CARDOSO, R.F.; HIRATA, R.D.C. et al. Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. **Zoonoses Publ. Health**, v.56, p.465-470, 2009

CORNER, L. A. *Post-mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p.53-63, 1994.

CORNER L. A, GORMLEY E, PFEIFFER DU (2012) the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions to maximize the number of positive cultures. **Vet Microbiol** 156:. 162-17110.1016/j.vetmic.2011.10.016
PubMed: 22074859 [PubMed]

CORSETTI A, L SETTANNI, VALMORRI S, MASTRANGELO M, SUZZI G. Identification of lactic acid bacteria with natural yeast subdominant and its evolution during fermentation in laboratory scale. **Food Microbiol** 2007; 24:592-600.

COSTA L.B. **Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia**. 2012. Dissertação de Mestrado. Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Salvador. Bahia. 121p

COUSINS, D.V.; BATISTA R, CATALDI A, QUSE V, DOWN S, DUIGNAN P, MURRAY A, DUPONT C, AHMED N, COLLINS DM, BUTLER WR, DAWSON D, RODRIGUEZ D, LOUREIRO J, ROMANO MI, ALITO A, ZUMARRAGA M, BERANRDELLI A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1305-1314, 2003

FEHLBERG, I. **Estudo da ocorrência de infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e/ou *Mycobacterium* spp. em caprinos com suspeita clínica de linfadenite caseosa.**/ Italaney Fehlborg. – Salvador, 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2010.

FURLANETTO, L.V. et al . Prevalência de tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso, Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 64, n. 2, Apr. 2012

HALSE T. A., ESCUYER, V. E., MUSSER K. A. Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens **Journal of Clinical Microbiology**, 49 (2011), pp. 2562–2567

GORMLEY, E. ; CORNER, L.A.L. ; COSTELLO, E. ; RODRIGUEZ-CAMPOS, S. Bacteriological diagnosis and molecular typing de *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* • Show more DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.04.010 **Research in Veterinary Science**, 2014

HONORÉ-BOUAKLINE, S. et al. Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of Sample Preparation and DNA Extraction. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 2323–2329, 2003

HUARD, R. C.; OLIVEIRA L. C.; BUTLER W. D., SOOLINGEN D. VAN, HO JL 2003. Based on PCR to distinguish the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions method. **J. Clin. Microbiol.** 41 :1637-1650

KEE SJ, KIM SM, KIM SH, SHIN MG, SHIN JH, SUH SP, et al Multiplex PCR assay for identification of mycobacterial species isolated from liquid cultures. **Chonnam Med J.** 2009; 45(1) :19–26

KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. A review. Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a users guide. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.781-791, 2003.

MARASSI, Carla D. et al . A multidisciplinary approach to diagnose naturally occurring bovine tuberculosis in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 33, n. 1, Jan. 2013 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000100004&lng=en&nrm=iso>. access on 09 July 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000100004>

MENZIES, F. D.; NEILL, S. D. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. **The Veterinary Journal**, v. 160, p. 92-106, 2000

MEIKLE V., SCHNEIDER M., AZENZO G., ZUMARRAGA M., MAGNANO G. & CATALDI A. 2007. Individual animals of a cattle herd infected with the same *Mycobacterium bovis* genotype shows important variations in bacteriological, histopathological and immune response parameters. **Zoonoses Publ. Health**. 54:86-93.

MILLER, J.M., A.L. JENNY, AND J.B. PAYEUR, 2002: Polymerase chain reaction detection of Mycobacterium tuberculosis complex and Mycobacterium avium organisms in formalin fixed tissues from culture negative ruminants. **Vet. Microbiol.** 87, 15–23.

MURAKAMI¹, P. S; FUVERKI², R. B. N; NAKATANI³, S. M; FILHO⁴, I. R. B; BIONDO⁵, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 67-74, jan./jun. 2009.

NAKATANI, S.M., M. BURGER, M. C. ASSEF, S.R. BROCKELT, L. L. COGO, AND I. J. MESSIAS-REASON, 2004: Efficient method for mycobacterial DNA extraction in blood cultures aids rapid PCR identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 23, 851– 854.

PARSONS LM, BROSCH R, COLE ST et al (2002). Rapid and simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. **J. Clin. Microbiol**; 40: 2339–2345

PACHECO, L. G. C. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 480–486, 2007.

PARRA A, GARCIA N, GARCIA A, LACOMBE A, MORENO F et al. (2008) Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Vet Microbiol** 127: 10.1016/j.vetmic.2007.09.001 315-324 PubMed: 17954014 [PubMed]

PINTO, P.S.A. Atualização em controle da tuberculose no contexto da inspeção de carnes. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 115- 121, 2003.

PRODINGER, W. M. et al. Characterization of Mycobacterium caprae Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 4984–4992, 2005.

PUSTIGLIONE NETO, L. Tuberculose dos bovinos. **Pecuária de corte**, São Paulo, v.6, n.66, p.52-53, 1997.

R Development Core Team (2011). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em <<http://www.R-project.org>>.

RIBEIRO, A.R.P.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V.; FARIA, E.S.; SILVA, J.A. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, 2003.

RIBEIRO, A.R.P.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V. et al. Prevalência de tuberculose 370 e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.55, n.3, p. 371 374-376, 2003.

RIBEIRO, DANIELA CARVALHO. **Comparação de protocolos de extração de DNA para detecção de *Mycobacterium bovis* através da PCR em homogeneizados de órgãos bovinos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-07032007-115429/>. Acesso em 2014-05-14

RIET-CORREA, F.; GARCIA, M. Tuberculose. IN: RIET CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. (Org.). **Doenças dos ruminantes e eqüinos**. 2.ed. São Paulo, 2001, v.1, p.351-362

RODRIGUEZ, J.G.; MEIJA, A.; DEL PORTILLO, P.; PATARROYO, M.E.; MURILLI, L.A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, v.141, p.2131-2136, 1995

RORING, S.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*, v.74, p.227- 236, 2000.

ROSA, Diego C.; GARCIA, Keila C.O.D.; MEGID, Jane. Soropositividade para brucelose em suínos em abatedouros. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 32, n. 7, July 2012 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000700006&lng=en&nrm=iso>. access on 10 July 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700006>

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Pecuária de corte**, v.11, n.101, p.45-50, 2000.

SALAZAR F.H.P. 2005. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no estado de Mato Grosso, Brasil.** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 73p.

SKORIC, M. *et al.* Tuberculous and tuberculoid lesions in free living small terrestrial mammals and the risk of infection to humans and animals: a review. **Veterinarni Medicina.** v. 52, n. 4, p. 144–161, 2007.

TAYLOR, G. M. *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research.** v. 3. n. 12, 2007.

TORRES-GONZALEZ P, SOBERANIS-RAMOS O, MARTINEZ-GAMBOA A, CHAVEZ-MAZARI B, BARRIOS-HERRERA MT *et al.* (2013) Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected with *Mycobacterium bovis*. **PLoS negl Trop. Dis** 7: e2177 [PMC free article] [PubMed]

VAN INGEN J, RAHIM Z, MULDER A, BOEREE MJ, SIMEONE R *et al.* (2012) Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 18: 653-655. 10.3201/eid1804.110888PubMed: 22469053 [PMC free article] [PubMed]

WARREN, R. M. *et al.* Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.** v. 10 n. 7, p: 818–822, 2006

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; FIORAVANTI, R.L.; R OXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M.I.; C ATALDI, A.; S ALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v.96, n.6, p.2809-2813, 2001.

ZARDEN CFO, CD MARASSI, AC CARVALHO, EES FIGUEIREDO e W. LILENBAUM (2013). Bacteriological and molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle with inconclusive tests for tuberculin results. **Epidemiology and Infection**, 141, pp 1.390-1.393. doi: 10.1017/S0950268812002105.

CAPÍTULO 3

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE GRANULOMAS BOVINOS SUSPEITOS DE TUBERCULOSE ORIUNDOS DE FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO ESTADUAL NA BAHIA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE GRANULOMAS SUSPEITOS DE TUBERCULOSE ORIUNDOS DE FRIGORÍFICO SOB INSPEÇÃO ESTADUAL NA BAHIA

Autor: Évelin Santiago Vasconcelos dos Santos

Orientador: Dr. Robson Bahia Cerqueira

RESUMO:

Ensaio de investigação molecular para diagnóstico da tuberculose bovina tem sido amplamente estudado. Estes métodos vem possibilitar maior agilidade e possuem alta sensibilidade e alta especificidade além de permitirem realização de diagnóstico diferencial entre doenças e identificação precisa do agente etiológico que é de grande importância para a epidemiologia, tratamento e prognóstico especialmente na saúde pública. O trabalho objetivou associar recurso complementar ao exame *post mortem* em matadouro frigorífico através de PCR *multiplex* realizado a partir diretamente do material caseoso coletado. Foram analisadas 61 linfonodos suspeitos de bovinos abatidos em frigorífico sob inspeção estadual no Sudoeste da Bahia resultando em 4,92% das amostras positivas no isolamento e 18% no mPCR para *M. bovis*. Verificou-se positividade no isolamento mesmo em amostras com mais de um ano congeladas. Todo DNA extraído evidenciou boa concentração na extração e adequado grau de pureza. Os resultados indicam que o protocolo molecular mostrou-se eficaz, rápido e bastante promissor na vigilância em matadouro.

Palavras-chave: Bovino; *Mycobacterium bovis*; tuberculose; mPCR

MOLECULAR RESEARCH FROM GRANULOMATOUS SUSPECTED TUBERCULOSIS SAMPLES FROM SLAUGHTERHOUSE UNDER STATE INSPECTION IN BAHIA

Author: Évelin Santiago Vasconcelos dos Santos

Advisor: Dr. Robson Bahia Cerqueira

ABSTRACT:

Bovine tuberculosis diagnosis has been widely studied by molecular assays. These methods have enabled greater agility, high sensitivity and specificity. Furthermore allow differential diagnosis between diseases and accurate identification of the etiologic agent which is of great importance to the epidemiology, treatment and prognosis especially in public health. The aim of this study was to associate as additional resource to the *post-mortem* examination in a slaughterhouse, a multiplex PCR performed directly from the cheesy material. Sixty-one suspect cattle lymph nodes were analyze, resulting in 4.92% positive samples in isolation and 18% in mPCR for *M. bovis*. It was found positive in the isolation even in samples frozen more than one year. DNA showed good concentration on the extraction and appropriate purity. The results indicate that the protocol was effective, fast and very promising in slaughterhouse vigilance.

Keywords: Cattle; *Mycobacterium bovis*; tuberculose; mPCR

1.0 INTRODUÇÃO

A tuberculose, doença infecciosa antiga é uma zoonose de ocorrência mundial. A forma resistente a medicamentos é a maior preocupação, além da epidemia especialmente quando associada a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), em muitos casos, a resposta dos países a este desafio é inadequada. O relatório mais recente calcula que aproximadamente 450 mil pacientes têm o tipo de tuberculose resistente (WHO, 2013).

Quando infectado pelo *M. bovis*, o quadro clínico no homem é indistinguível do quadro causado pelo *Mycobacterium tuberculosis* (POLLOCK e NEILL, 2002; WEDLOCK, 2002) e a baciloscopia do escarro, metodologia empregada usualmente no Brasil para o diagnóstico da doença nos humanos, é ineficaz nesta distinção entre as duas espécies (KANTOR e RITACCO, 1994; USABIAGA, 2001). Os principais grupos de risco são os tratadores de rebanhos infectados e os trabalhadores da indústria de carnes (WHO, 2009). O último relatório da OMS reúne dados de 178 dos 197 Estados-membros da organização e relata que o Brasil, somente em 2012, registrou mais de 71 mil casos da doença (OMS, 2013).

Estima-se que os rebanhos infectados percam até 20% de sua eficiência produtiva. Perdas diretas resultantes da morte de animais, queda no ganho de peso, diminuição da produção de leite, descarte precoce, eliminação de animais de alto valor zootécnico e condenação de carcaças ao abate caracterizam a importância econômica da doença nos bovinos além da credibilidade da propriedade comprometida (OLIVEIRA et al., 2008; PACHECO et al., 2009)

Diante da implantação do programa de controle e erradicação da tuberculose bovina favorecendo importante declínio na frequência da doença, os matadouros-frigoríficos tornam-se importantes no contexto do rastreamento dos focos, através da rotina de inspeção, se tornando importantes “sentinelas epidemiológicos” (WEDLOCK et al., 2002, COSTA 2008; LOPES, 2008) já que esta é uma das zoonoses alimentares detectáveis durante o exame *post mortem*.

Uma outra questão deveras importante no papel da vigilância destes estabelecimentos é que estes defendem a qualidade higiênico-sanitária do produto final funcionando como barreira de proteção para o consumidor.

É consenso entre os pesquisadores que o método diagnóstico definitivo da tuberculose é o isolamento do agente, o chamado "padrão-ouro" (ARANAZ et al., 1996; ALMEIDA et al., 2004) que pode ser realizado a partir de lesões ou secreções de animais suspeitos. É essencial para definir as condições ideais para a cultura, que se leve em conta, a concentração de bacilos na amostra e os riscos de contaminação, uma vez que estes fatores podem influenciar a seleção de procedimentos de descontaminação e a duração da incubação (GORMLEY, 2014).

Devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da TB bovina como as limitações do teste alérgico e sorológico e extenso tempo exigido para identificação do agente nos métodos bacteriológicos de rotina, cresceu o interesse pelos ensaios moleculares especialmente para detecção direta do agente nas amostras sendo neste caso a PCR o método mais indicado (RORING et al 2000, ZANINI et al, 2001; RUGGIERO, 2004; UHEYAMA, 2013). Ainda assim Ruggiero et al (2007) destacam a inexistência de um exame sensível, reprodutível e rápido para rotina do diagnóstico da tuberculose em bovinos. Para atingir o objetivo da identificação da micobactéria dois pontos são muito relevantes, a seguir: a escolha correta dos *primers* e a qualidade da técnica de extração do DNA (COLLINS et al., 1994; ZUMÁRRAGA et al., 2001).

Vale lembrar que, entretanto, existem razões para diferenciação dos agentes, a exemplo da resistência do *M. bovis* à pirazinamida (droga antituberculose de 1ª linha) (PARSONS, 2002). Quando se deseja ou precisa fazer diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis*, a PCR multiplex se mostra uma técnica interessante. Numa única reação são utilizados vários conjuntos de *primers* específicos para determinadas regiões do genoma bacteriano (ARRÁIZ, 2007; CORSET, 2007 KEE, 2009). Hernandez et al., (2003) destacam ainda a economia de tempo e de reagente.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi realizar um estudo molecular em amostras de bovinos a partir de lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose em carcaças inspecionadas em frigorífico sob regime de inspeção estadual localizado na região Sudoeste da Bahia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ATUAÇÃO

A área de atuação deste estudo compreende um matadouro-frigorífico sob inspeção estadual (ADAB/DIPA) no estado da Bahia. O matadouro localizado na Rodovia BR 116, Km 867, Vitória da Conquista- BA (14°53'00" S, 40°48'00"O) é um centro de abate com abrangência em diversos municípios da região Sudoeste do estado.

2.2 ANIMAIS

As amostras coletadas no período de março a novembro de 2012 resultaram de bovinos sadios ao exame *ante mortem* não havendo distinção de idade, raça, sexo ou região de procedência. Neste período, um total de 58.268 bovinos foram abatidos procedentes de 76 municípios baianos. Foram estudados 70 bovinos pós abate procedentes de 20 municípios que foram submetidos a exames do serviço de inspeção sanitária passando por avaliação sistemática de carcaças e vísceras. Durante o exame foi realizada busca visual e tátil por lesões sugestivas de tuberculose, além de incisão longitudinal nos gânglios linfáticos indicados nas linhas de inspeção B, D, E, F, H, I de acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de origem Animal (RIISPOA). Quando ocorria suspeita, a decisão sanitária era tomada conforme determinado pelo artigo 196 do mesmo regulamento (BRASIL, 1997).

2.3 COLETA DE AMOSTRAS

O material coletado restringiu-se à linfonodos. Foram considerados sugestivos os linfonodos que apresentaram lesões nodulares de tamanhos e formas variadas contendo exsudato purulento, caseoso ou calcificado. Desses, foram retirados 99 fragmentos com tamanho aproximado de 2x2 cm, armazenados em coletor tipo universal estéril, identificados e armazenados à -20°C. Posteriormente as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia para análise. Deste total de amostras coletadas, vinte e duas foram excluídas porque os coletores contendo os conteúdos dos abscessos foram danificados no armazenamento. Assim, os cálculos estatísticos foram realizados com um total de 61 linfonodos.

Outra alíquota abrangendo área lesada e a área aparentemente normal, foi coletada em frascos, contendo formol a 10%, na proporção de 5 a 10 partes de fixador para cada parte de material colhido e encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

2.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

No LPV os fragmentos foram recortados, clivados e processados conforme sugerido por Behmer et al. (1976), para o diagnóstico histopatológico por coloração com Hematoxilina-Eosina. As amostras foram destinadas também a coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) para a identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) com a finalidade de se obter diagnóstico definitivo, conforme sugerido por Behmer et al. (1976). As lâminas coradas pelo método ZN foram avaliadas em microscópio óptico de luz e interpretados como positivo ou negativo para micobactéria, conforme sugerido por Varello et al. (2008). Sendo positivas as que apresentaram um ou mais BAAR, em pelo menos uma seção da amostra.

2.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Uma alíquota de cada amostra foi enviada à USP (Universidade de São Paulo) – Laboratório de Zoonoses Bacterianas sendo destinadas ao exame bacteriológico, e processadas segundo protocolo local. O material foi descontaminado pelo método de HPC (Cetyridinium chloride monohydrate, 98%) com posterior semeadura em meio de *Lowenstein-Jensen e Stonebrink Leslie* em duplicata; os tubos foram, então, incubados a 37°C e observados durante 60 dias semanalmente. Para confirmação do diagnóstico as colônias foram submetidas ao protocolo de PCR local.

2.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE MULTIPLEX

2.6.1 Extração de DNA dos conteúdos dos abscessos

As 61 amostras, independente do resultado do isolamento, foram submetidas à extração de DNA para o PCR. Para extração, foi utilizado o protocolo para bactérias gram-positivas (QIAGEN, Alemanha) adaptado, com modificações no tempo de ação da lisozima e da proteinase K. De forma breve, 25mg dos conteúdos dos abscessos, preferencialmente escolhidos do centro do granuloma, foram ressuspensos em 180 µL de solução de lisozima (20 mg/mL de lisozima; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1.2% triton X-100) e incubados por 2h a 37 °C, sendo agitados a cada 10 minutos (a melhor ação da lisozima foi testado em diferentes intervalos de tempo (Felbergh, 2010)); posteriormente, 20 µl de proteinase K (QIAGEN, Alemanha) e 200 µl de tampão de lise AL (QIAGEN, Alemanha) foram adicionados, seguidos por uma incubação de 1h a 56 °C e, logo após, 15 minutos a 95 °C para inativação da proteinase K. Esta etapa teve por finalidade lisar a bactéria para liberação do DNA tratando a amostra anteriormente à purificação do DNA. Os DNAs foram, em seguida, purificados utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha) conforme instruções do fabricante (utilização dos tampões do kit e etanol 100% intercalados de centrifugação variada em cada etapa) e eluídos em 50 µl de tampão AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0). As concentrações e o grau de pureza dos DNAs foram

determinados por aparelho nanodrop *Thermo Scientific* 2000c. Após verificação das leituras da concentração, cada DNA extraído foi diluído em água grau PCR, tantas vezes fosse necessário para padronização em 25ng de concentração. Logo após, foram armazenados a -20 °C até a realização dos mPCRs.

2.6.2 Primers

Os primers utilizados neste estudo foram obtidos de trabalho publicado anteriormente por Warren e colaboradores (2006) para *Mycobacterium spp.*, e estão listados no quadro 1.

2.6.3 Condições do mPCR de *Mycobacterium spp.*

Cada reação continha 0,625 Unidades da enzima HotStarTaq plus DNA polymerase (QIAGEN), tampão de PCR 1X, tampão Q 1X, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 1 µM de cada primer e 50 ng de DNA, tanto dos controles positivos e negativos, quanto das amostras dos granulomas. As reações, em volume final de 25 µl, foram realizadas no termociclador (Bio-Rad iCycler iQ5) sob as seguintes condições: incubação inicial a 95 °C por 5 minutos (para ativação da enzima); seguidos por 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. As etapas do PCR foram realizadas em áreas fisicamente separadas para minimizar o risco de contaminação cruzada. Um controle negativo contendo água foi incluído em todas as reações para avaliar o surgimento de contaminação nos reagentes. Como controles positivos foram usados DNA de *M. bovis* e *M. tuberculosis* gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunologia e Biologia molecular, ICS- UFBA, Bahia, Brasil.

2.7 ELETROFORESE

Os produtos amplificados foram fracionados por eletroforese (6 V/cm) em gel de agarose 3% (w/v) em tampão TBE 1X. O corante utilizado foi o *Blue Green Loading Dye I* da LGC Biotecnologia, visualizados através de fotodocumentar

BIO- RAD. Cinco μL de marcador Universal Ladder (Invitrogen). O quadro 1 contém o tamanho dos produtos de PCR (em pb) esperados para 5 diferentes membros do complexo MTB.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os resultados foi utilizado Modelo Linear Generalizado GLM para uma distribuição binomial, ANOVA, função de ligação *logit*, tendo as médias avaliadas pelo teste de médias Bonferroni a 5% de significância. Foi utilizado programa R /2012.

Sequência primer	RD	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis BCG</i>	<i>M. canettii</i>
AAGCGTTGCCCGCCGACCGACC CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG GAGCGGATCTGGCGGTTGGGG	1	RD1 presente (146 pb)	RD1 presente (146 pb)	RD1 presente (146 pb)	RD1 ausente (196 pb)	RD1 presente (146 pb)
ATGTGCGAGCTGAGCGATG TGTAATATGCTGACCCCATGCG AAAGGAGCACCATCGTCCAC	4	RD4 presente (172 pb)	RD4 presente (172 pb)	RD4 ausente (268 pb)	RD4 ausente (268 pb)	RD4 presente (172 pb)
CAAGTTGCCGTTTCGAGCC CAATGTTTGTGCGCTGC GCTACCCCTCGACCAAGTGTT	9	RD9 presente (235 pb)	RD9 ausente (108 pb)	RD9 ausente (108 pb)	RD9 ausente (108 pb)	RD9 presente (235 pb)
GGGAGCCCAGCATTACCTC GTGTGCGGGAATTACTCGG AGCAGGAGCGGTTGGATATTC	12	RD12 presente (369 pb)	RD12 ausente (306 pb)	RD12 ausente (306 pb)	RD12 ausente (306 pb)	RD12 ausente

Quadro 1 . Lista de primers com o tamanho dos produtos de amplificação correspondentes indicando a presença ou ausência da região de diferença (RD) em 5 diferentes membros do complexo *Mycobacterium*. (WARREN, 2006)

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram inspecionados no frigorífico no período das coletas, 58.268 bovinos oriundos de 76 municípios do estado da Bahia. Desse total, 70 animais apresentaram lesões sugestivas de tuberculose (figura 1, 2 e 3) representando uma frequência para o período analisado de 0,12% (dados já apresentados – FRANÇA (2013)). Dentre as 61 amostras submetidas ao exame bacteriológico 4,92% (3/61) apresentaram crescimento característico de *Mycobacterium bovis* em meio *Stonebrink - Leslie* sendo confirmadas por PCR de acordo com protocolo local - USP. Além do cultivo em *Stonebrink*, as amostras foram semeadas em meio *Lowenstein-Jensen* na tentativa de isolar outras espécies de micobactérias, entretanto, não houve crescimento de colônias em nenhuma das amostras cultivadas neste meio (tabela 1).

Tabela 01 - Resultado de isolados identificados como *M. bovis* ou *M. tuberculosis* a partir de granulomas bovinos oriundos de frigorífico da região Sudoeste da Bahia

Amostra	<i>Stonebrink-Leslie</i>	<i>Lowenstein-Jensen</i>	PCR - USP
13.1	+	-	<i>M. bovis</i>
15.1	+	-	<i>M. bovis</i>
58	+	-	<i>M. bovis</i>
Total	03	0	100%

As amostras positivas, foram analisadas quanto à histopatologia através da coloração hematoxilina – eosina (HE) e método de *Zielh-Neelsen*. Wangoo *et al* (2005) preconiza que a caracterização de lesões granulomatosas típicas de tuberculose, está baseada na presença de necrose central com mineralização, células epitelióides, macrófagos e células gigantes de *Langerhans*. Para este trabalho, no HE foram consideradas fortemente sugestivas (FS) para micobactérias, as amostras que apresentavam pelo menos uma das três condições: a) presença de células gigantes; b) necrose, com ou sem calcificação, inflamação crônica e células gigantes de *Langerhans* e c) presença de necrose,

calcificação e inflamação crônica. Diante do exposto, dentre as amostras positivas no isolamento, 66,7% mostraram-se fortemente sugestivas. Considerando avaliação de ZN nenhuma lesão apresentou BAAR (Tabela 2).

Tabela 2. Características histopatológicas de granulomas bovinos positivos no exame bacteriológico oriundos de frigorífico da Região Sudoeste da Bahia

Amostra	Histopatologia		Resultado
	HE	ZN	
13.1	CG+IC	Negativo	FS
15.1	NECROSE EOSINOFÍLICA.	Negativo	Negativo
58	N+CG+IC	Negativo	FS

CG- células gigantes; IC- inflamação crônica; N- necrose.

A procedência dos bovinos foi verificada nos municípios de Itapetinga, Vitória da Conquista e Itambé. No que se refere ao sexo, idade e localização, 66,7% das referidas lesões foram encontradas em machos de 48 meses de idade, no linfonodo traqueobrônquico (tabela 3). De acordo com Asseged *et al* (2004) 86% das lesões de TB em linfonodos, ocorrem na região da cabeça ou cavidade torácica revelando como caracterizado por Taylor (2007) a importância da via respiratória.

Tabela 3. Características epidemiológicas de granulomas bovinos positivos no exame bacteriológico oriundos de frigorífico da Região Sudoeste da Bahia

Amostra	Linfonodo	Sexo	Idade (meses)	Origem
13.1	traqueobrônquico	M	48 m	Itapetinga
15.1	traqueobrônquico	F	60 m	V. Conquista
58	hepático	M	48 m	Itambé



Figura 1. Achado de lesão sugestiva de tuberculose. Linfonodo mesentérico bovino com massa granulomatosa de consistência pastosa e cor amarelada.



Figura 2. Achado de lesão sugestiva de tuberculose. Linfonodo pré- escapular bovino, com forma arredondada, bem delimitada, cor amarelada e consistência firme.



Figura 3. Achado de lesão sugestiva de tuberculose. Linfonodo pulmão bovino, com forma arredondada, massa granulomatosa de consistência pastosa e cor amarelada.

Levantamentos realizados em frigoríficos de bovinos, demonstram diferenças nos índices de lesões suspeitas de TB (BAPTISTA et al 2004, COSTA, 2010, COSTA, 2012, DELGADO, 2011, ALZAMORA, 2014). As justificativas para tal contraste são diversas, dentre elas de acordo com Reis *et al* (1995) a subjetividade de classificação e as enormes semelhanças entre linfossarcomas e linfadenites inespecíficas. Além do citado, Riet – Correa e Garcia (2001) especificam como doenças que apresentam lesões macroscópicas similares à tuberculose; a actinobacilose, piogranuloma estafilocócico, mucormicose, coccidioidomicose, pentastomíase e hidatidose policística. Outros fatores também devem ser considerados como sensibilidade da inspeção e sistema de criação. De acordo com OIE (2012), a idade dos animais é outro fator de influência para diferentes índices encontrados.

Inquérito epidemiológico ocorrido em 2012 no estado da Bahia (circuitos produtores com características epidemiológicas semelhantes) baseado no teste cervical comparativo revelou um cenário de prevalência em torno de 0,21% de animais positivos para tuberculose bovina (COSTA, 2012), frequência semelhante à encontrada neste trabalho. Índices encontrados à campo, podem ser verificados no momento do abate.

Em ambiente de matadouro, Costa (2010) avaliou em três estabelecimentos de forma pioneira na Região Metropolitana de Salvador - Ba, lesões sugestivas ou não de tuberculose bovina, durante a inspeção *post mortem*. Em 10 meses foram coletadas 43 amostras, número inferior às condenações encontradas no presente estudo, sendo ainda de se considerar para este, coleta em estabelecimento único, menor período de coleta e a inclusão de lesões não sugestivas. Os achados encontrados resultaram em cinco lesões com características macroscópicas sugestivas de TB confirmadas mediante análise microbiológica e molecular. Nenhuma amostra corada pela técnica de *Ziehl-Neelsen* revelou a presença de bacilos álcool-ácido-resistentes na análise histopatológica exatamente como na presente pesquisa. A presença de BAAR em análises histopatológicas é bastante variável na literatura. Pode-se verificar desde nenhum bacilo (SALAZAR, 2005), até 50% de lesões positivas para ZN. Esta baixa frequência pode ser consequência: da reduzida taxa de sobrevivência das

micobactérias, da perda de estrutura bacteriana em razão das respostas imunitárias (ANDRADE *et al.*, 1991) ou a lesão examinada ser paucibacilares (RORING *et al.*, 2000; NAKATANI *et al.*, 2004). Há de se considerar que na presente pesquisa o ZN foi realizado direto do granuloma e não da cultura de bactérias. Varello *et al.*, (2008) e Watrelot-Virieux *et al.*, (2006) afirmam baixa sensibilidade para esta técnica.

Estudo realizado na região noroeste do estado de São Paulo demonstrou a ocorrência de 0,16% de lesões suspeitas ao exame *post-mortem* nos bovinos abatidos. Os animais foram provenientes de 29 cidades do estado paulista. No que diz respeito à coloração por HE, foi evidenciado 98,5 % de processo inflamatório do tipo granulomatoso (SOUZA, 2013). A frequência de lesões suspeitas foi semelhante à encontrada neste trabalho.

Baseado no número de lesões selecionadas pela inspeção sanitária poderia se esperar maior taxa de positividade no isolamento para este trabalho, entretanto Fráguas (2008), relata sensibilidade de 11,34% para este método. Os autores atribuem à taxa, ao número pequeno de bactéria na lesão ou ao alto grau de contaminação durante a coleta. Muitos trabalhos demonstram grandes taxas de contaminação durante esse procedimento a exemplo do estudo de Costa (2010), que apresentou mais de 50% das amostras contaminadas. Há situações em que ocorre contaminação generalizada dos meios de cultura, e a descontaminação adicional das espécies originais armazenadas podem ser necessárias com repetição da cultura (GORMLEY, 2014). Outros fatores também são plausíveis para justificar a baixa taxa de isolados, a citar: falhas no processo de descontaminação levando a morte das bactérias (PINTO, 2002, SALAZAR, 2005 E FRAGUÁS, 2008); dificuldade de crescimento em meio de cultura; morte do *Mycobacterium* após produzir o granuloma e a lesão ter sido causada por outro agente infeccioso. Corner (1994) afirma que mesmo após 1 ano de armazenadas a -20° C, 78% das amostras positivas permanecem nas mesmas condições.

É importante recomendar cautela na indicação deste método como rotina para determinação da tuberculose bovina. Apesar de relativa sensibilidade, cabe ressaltar que a especificidade é alta (DIRETRIZES, 2004; SANTOS, 2010) e que

este método constitui-se como padrão ouro de diagnóstico (PARRA, 2008; CARDOSO, 2009). Gormley (2014), discute limitações no uso de meios sólidos para o rastreio de alto rendimento para micobactérias patogênicas, e aponta que sistemas de cultura à base de caldo líquido automatizado proporciona melhorias no tempo de detecção e taxa de recuperação desses micro-organismos.

Refletindo sobre os aspectos já discutidos, vale destacar que para as mais de 95% das amostras negativas no isolamento, deve-se ter precaução para condenação desnecessária, apesar das possibilidades de outras etiologias não terem sido avaliadas neste estudo mas também que a saúde pública é o mais relevante. Pinto (2002) em Viçosa – Minas Gerais identificou apenas 12% das 50 lesões suspeitas selecionadas, como positivas ao isolamento. Furlanetto (2012) comprovou ainda em menor número com 1,5% dos granulomas positivos para *Mycobacterium*. Costa (2012) revelou maior prevalência totalizando 23% de crescimento em *Stonebrink* e dentre essa porcentagem, duas amostras cresceram também em *Lowenstein-Jensen* dessemelhante a este experimento que não apresentou crescimento neste último meio.

Quanto à investigação molecular, as leituras espectrofotométricas dos DNAs extraídos diretamente dos abscessos variaram entre 140,2 ng/μL e 6.404,1 ng/μL para as concentrações e o grau de pureza entre 1,79 a 1,95 atestando DNA puro. As 61 amostras foram avaliadas pelo PCR *multiplex* e destas, 18% (11/61) apresentaram perfil de amplificação característico de *M. bovis* (tabela 4, figura 4 e 5) o que inclui amostras que foram negativas no cultivo. Nenhuma das outras quatro espécies avaliadas foi detectada nas amostras amplificadas, uma vez que não foi evidenciado perfil de bandas características das mesmas (figura 4 e 5).

Tabela 4. Resultado do mPCR a partir de material granulomatoso para 5 diferentes espécies analisadas dentre as amostras positivas no exame bacteriológico oriundos de frigorífico da Região Sudoeste da Bahia

AMOSTRAS	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. canetti</i>
am7	-	-	+	-	-
am8	-	-	+	-	-
am9	-	-	+	-	-
am10	-	-	+	-	-
am13.1	-	-	+	-	-
am15.1	-	-	+	-	-
am50	-	-	+	-	-
am57	-	-	+	-	-
am58	-	-	+	-	-
am65	-	-	+	-	-
am68	-	-	+	-	-
TOTAL	0	0	11	0	0

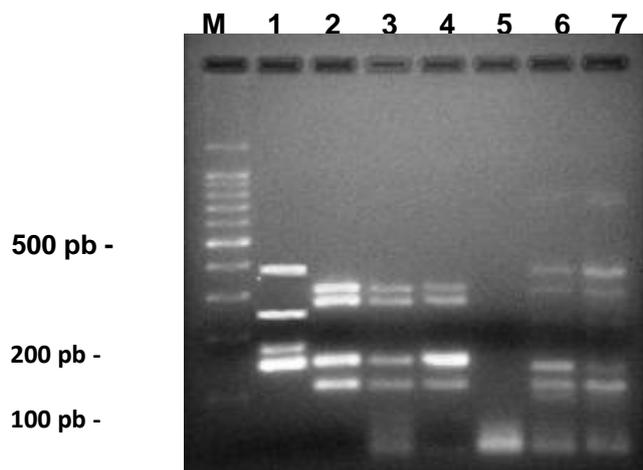


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose. Perfil de amplificação de amostras colhidas direto do material de abscessos bovinos. Linha M, marcador molecular (100pb *ladder*); linha 1, controle positivo *M. tuberculosis*; linha 2, controle positivo *M. bovis*; linhas 3 e 4, amostras positivas; linha 5, controle negativo; linhas 7 e 8, amostras negativas.

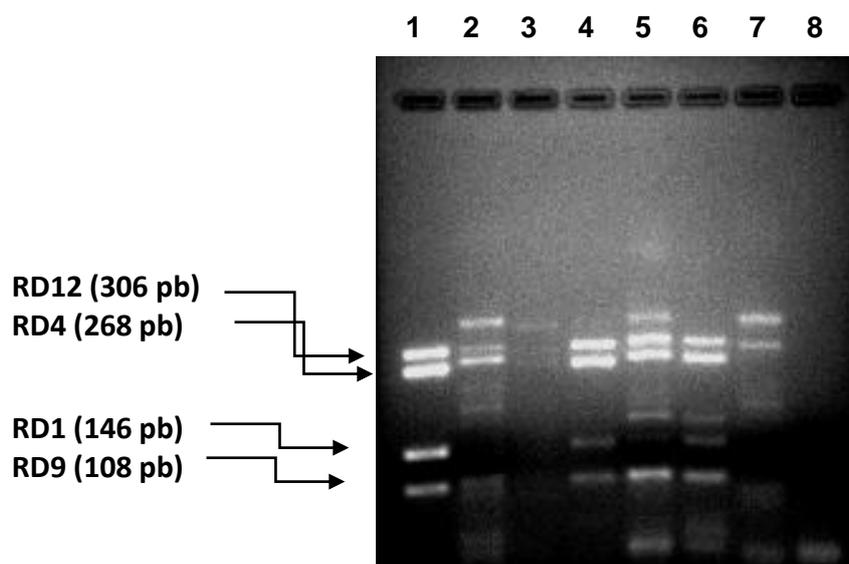


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose. Perfil de amplificação de amostras colhidas direto do material de abscessos bovinos. Linha 1, controle positivo *M. bovis*; linhas 2, 3, 5 e 7 amostras negativas; linhas 4 e 6, amostras positivas e linha 8, controle negativo.

O ensaio de mPCR deste experimento possibilitou a diferenciação rápida e precisa de diferentes espécies de micobactérias dentro de um período máximo de dois dias. O método é seguramente mais rápido e mais eficaz comparado ao exame microbiológico embora este último ainda seja o padrão ouro de diagnóstico da tuberculose. Foi estabelecido uma correlação de ambas as técnicas utilizadas no presente trabalho e ficou demonstrado que a mPCR confirmou todos os casos positivos pelo cultivo, ressaltando a capacidade de detecção de amostras positivas que não haviam apresentado crescimento microbiológico, 13,1% (8/61) (tabela 5) superando a técnica padrão-ouro. Em relação à especificidade, o teste demonstrou 88% de precisão. Rodriguez et al., (1995) e Roring et al., (2000) enfatizaram a importância da comparação entre outros métodos de diagnóstico com o isolamento.

Tabela 5. Comparação do PCR multiplex direto do granulomatoso com o isolamento para o diagnóstico da tuberculose bovina de frigorífico da Região Sudoeste da Bahia

		mPCR		TOTAL
		POS	NEG	
ISOLAMENTO	POS	3 (4,9%)	(0%)	3 (4,9%)
	NEG	8 (13,1%)	50 (82%)	58 (95,1%)
TOTAL		11 (18%)	50 (82%)	61 (100%)

Especificamente para este experimento, dentre as inúmeras vantagens no uso da PCR para investigação de doenças infecciosas, vale destacar a independência sobre a cultura bacteriana aliada à importante redução do tempo para diagnóstico e ainda a possibilidade do diagnóstico em amostras conservadas por muito tempo. Tratando-se de uma técnica do tipo *multiplex* ainda vale destacar a capacidade de distinção entre as espécies de bactérias pesquisadas. É também pertinente salientar que a reação em cadeia da polimerase não precisa do micro-organismo vivo para sua detecção, tornando-se também neste aspecto, superior ao isolamento. Ruggiero (2007), garante que a PCR *multiplex*, a qual emprega numa mesma reação conjuntos de *primers* específicos para determinadas regiões do genoma bacteriano, tem sido uma alternativa para diferenciar espécies do MTB. Brosch et al (2002), confirmam que o conhecimento sobre regiões presentes ou ausentes do genoma das micobactérias, contribui neste cenário.

Diversos autores como Wards et al. (1995); Zanini et al. (2001); Meickle et al. (2007); Cardoso et al., (2009) e Felbergh (2010) apontam também dificuldades no uso de técnicas moleculares para diagnóstico, especialmente no uso deste

método a partir diretamente do material caseoso. A complexidade e o custo têm sido restrições apontadas para a utilização da PCR na pesquisa sobre tuberculose (ZANDEN, 2002) além da contaminação cruzada nos laboratórios relatada por Kaduma *et al* (2003) que pode chegar a 65%.

Outro aspecto restritivo neste contexto parece consistir na lise celular ótima para recuperação do DNA, em decorrência da espessa camada de ácidos micólicos que reveste a parede celular micobacteriana. Roring *et al.*, (2000) apontam como uma importante etapa para realização da PCR a complexidade para extração de DNA direto no granuloma. Para este trabalho a extração não foi um problema visto que, foi verificado altas concentrações de DNA. O protocolo de extração aqui utilizado foi relatado com sucesso por Fehlberg (2010) e com modificações relatado por Honoré-Bouakline (2003), que discutiu o impacto da preparação das amostras e extração de DNA no diagnóstico molecular da tuberculose. Certamente o tratamento dado as amostras com os tempos e temperaturas da proteinase K e lisozima foram determinantes para o sucesso da desta etapa no presente trabalho. É ainda acrescentado por Antognoli *et al.* (2001), a dificuldade em concentrar as micobactérias no *pellet*, especialmente devido à flutuação e a tensão superficial. Taylor *et al* (2001), destacam também a pequena quantidade de bacilos nesse material. Fatores inibitórios são outros inconvenientes importantes que podem dificultar a amplificação, entretanto esse fato também não ocorreu nestes achados porque, o grau de pureza das amostras foi alto e houve amplificação de produtos na PCR.

Seria conveniente estabelecer relação no que se refere ao protocolo de extração e de mPCR com os trabalhos de Fehlberg (2010) que foi realizado direto do material caseoso porém, em caprinos e de lesões externas dos animais não resultando em nenhuma amostra positiva. Já Alzamora (2014), praticou este protocolo em bovinos porém, a partir da colônia isolada. As análises obtidas no presente estudo no aspecto molecular são difíceis serem comparada com outros resultados, uma vez que não apenas os procedimentos de extração e purificação foram diferentes, mas a sequência de metodologia e alvo também diferem bastante.

O presente estudo demonstrou positividade (18%) no PCR, superior à citada por Furlanetto (2012) que foi de 7% que pesquisou em matadouro frigorífico no estado de Mato Grosso e também com DNA extraído direto do tecido lesionado. Contudo a prevalência encontrada foi inferior aos achados de Cardoso (2009) no estado do Paraná e de Zanini et al (2001), ambos sugerindo superioridade do método molecular em relação com a cultura. Protocolo também que demonstrou bons resultados foi o de Yeboah-manu et al. (2001) que possibilitou a discriminação do *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. bovis* BCG.

4.0 CONCLUSÕES

O ensaio de mPCR empregado demonstrou a capacidade de avaliar positividade para tuberculose diretamente de amostras de lesões sugestivas da doença em um prazo máximo de 48h. A avaliação molecular evidenciou superioridade na sensibilidade para detecção do DNA micobacteriano em relação à cultura, demonstrando ainda ser capaz de diferenciar espécies do MTB numa única reação. Vale destacar ainda a eficácia do protocolo em amostras antigas que poderiam não ser mais avaliadas devido ao tempo de conservação.

Por último, conclui-se que a utilização da mPCR para avaliar casos de TB poderá somar para o aumento da eficácia das medidas de controle da doença. Resultados indicam que a técnica é versátil, rápida e bastante promissora na vigilância em matadouro.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R.F.C. **Investigação de focos de tuberculose bovina em rebanhos de corte a partir de lesões sugestivas ao abate no estado do Mato Grosso do Sul** (Dissertação). Campo Grande: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2004. 93 p

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P.V.; MÉNDEZ, M.D.C.; SCHILD, A.L. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, n.3/4, p. 81 - 86, 1991.

ANTOIGNOLI, M.C.; SALMAN, M.D.; TRIANTIS, J.; HERNÁNDEZ J.; KEEFE, T. A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.111-116, 2001.

ASSEGED B., WOLDESENBET Z., YIMER E. & LEMMA E. 2004. Evaluation of abattoir inspection for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle at Addis Adaba abattoir. **Trop. Anim. Health Prod.** 36:537-546.

ALZAMORA FILHO, Fernando et al . Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 34, n. 2, Feb. 2014.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; VIDAL, D.; DOMINGO, M.; GONZÁLEZ, O.; RODRÍGUEZ-FERRI, E.F.; VAN EMBDEN, J.D.A.; COUSINS, D.V. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n. 11, p.2734-2740, 1996.

ARRÁIZ RN, ROMAY BZ, FARIA MN *Multiplex* PCR, which targets many different genes simultaneously, has been used for this goal. **Rev Chilena Infectol.** 2007 Abr; 24 (2) :99-105

BAPTISTA, F.; MOREIRA, E.C.; SANTOS, W.L.M.; NAVEDA, L.A.B. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p.577 - 580, 2004.

BEHMER, O.P.; TALOSA, E.M.C.; FREITAS, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976.256 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 1997.

BROSCH, R.; GORDON, S.V; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOLLIGEN, D.; COLE, A. A New evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex.

Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, v.99, n.6, p.3684-3689, 2002.

CARDOSO M.A., CARDOSO R.F., HIRATA R.D.C., HIRATA M.H., LEITE C.Q.F., SANTOS A.C.B., SIQUEIRA V.L.D., OKANO W., ROCHA N.S. & LONARDONI M.V.C. 2009. Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. **Zoonoses Publ. Health** 56:465-470

COSTA, A. C. F. **Tuberculose bovina: diagnóstico anatomo-histopatológico, bacteriológico e molecular em animais abatidos na Região Metropolitana de Salvador, Bahia**. Dissertação de Mestrado. Salvador, Bahia, 46 p. 2008.

COSTA, L.B. **Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia**. 2012, 121f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. 304 Salvador

COSTA L.B. **Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia**. 2012. Dissertação de Mestrado. Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Salvador. Bahia. 121p

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 53-63, 1994

CORSETTI A, L SETTANNI, VALMORRI S, MASTRANGELO M, SUZZI G. Identification of lactic acid bacteria with natural yeast subdominant and its evolution during fermentation in laboratory scale. **Food Microbiol** 2007; 24:592-600.

COUSINS, D.V.; BATISTA R, CATALDI A, QUSE V, DOWN S, DUIGNAN P, MURRAY A, DUPONT C, AHMED N, COLLINS DM, BUTLER WR, DAWSON D, RODRIGUEZ D, LOUREIRO J, ROMANO MI, ALITO A, ZUMARRAGA M, BERANRDELLI A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1305-1314, 2003

DELGADO, E.M.; ABRANTES, M.R.; SOUSA, I.K.F.; NEVES, K.A.L.; MOREIRA, T.R.; VINHOLTE, B.P.; CASTRO, A.N.; SILVA, J.B.A. Condenação de carcaças acometidas de lesões sugestivas de tuberculose em abatedouro na região oeste do Pará, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, 2011.
DIRETRIZES brasileiras para tuberculose. **J. bras. Pneumol.**, v. 30, n. 1, p.6-12,59-62,2004.

FEHLBERG, I. **Estudo da ocorrência de infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e/ou *Mycobacterium* spp. em caprinos com suspeita clínica de linfadenite caseosa.**/ Italaney Fehlbeg. – Salvador, 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2010.

FURLANETTO, Leone V. et al . Uso de métodos complementares na inspeção post mortem de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 32, n. 11, Nov. 2012 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

736X2012001100011&lng=en&nrm=iso>. access

on 21 July 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100011>.

FRÁGUAS, S. A. Márcia Souza Cunha-Abreu,** Ana Maria dos Reis Ferreira,** Carla Dray Marassi,*** Walter Oelemann,*** Leila de Souza Fonseca,*** Rachel Ferreira,* Walter Lilenbaum* Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização **R. bras. Ci. Vet.**, v. 15, n. 3, p. 117-121, set./dez. 2008

FRANÇA, Leonardo Rosa da1*; CRUZ, Jurandir Ferreira da2; NEVES, Vanêssa Brito Fernandes3; CERQUEIRA, Robson Bahia4 Prevalência e histopatologia de lesões sugestivas de tuberculose em carcaça de bovinos abatidos no Sudoeste da Bahia *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.14, n.4, p.721-733 out./dez., 2013

GORMLEY, E. ; CORNER, L.A.L. ; COSTELLO, E. ; RODRIGUEZ-CAMPOS, S. Bacteriological diagnosis and molecular typing de *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* • Show more DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.04.010 **Research in Veterinary Science**, 2014

HERNANDEZ, M. et al. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. **Analytical Biochemistry**, v.323, p.164-170, 2003.

HONORÉ-BOUAKLINE, S. et al. Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of Sample Preparation and DNA Extraction. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 2323–2329, 2003.

KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the caribbean: Current status, control and eradication programs. **Vet. Microbiol.**, v. 40, n.1-2, p. 5-14, 1994

KEE SJ, KIM SM, KIM SH, SHIN MG, SHIN JH, SUH SP, et al *Multiplex* PCR assay for identification of mycobacterial species isolated from liquid cultures.

Chonnam Med J. 2009; 45(1) :19–26

MEIKLE V., SCHNEIDER M., AZENZO G., ZUMARRAGA M., MAGNANO G. & CATALDI A. 2007. Individual animals of a cattle herd infected with the same *Mycobacterium bovis* genotype shows important variations in bacteriological, histopathological and immune response parameters. **Zoonoses Publ. Health.** 54:86-93.

OLIVEIRA, V. M.; FONSECA, A. H.; PEREIRA, M. J. S.; CARNEIRO, A. V.; JESUS, V. L. T.; ALVES, P. A. M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 574-579, 2008

OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH). Manual of Diagnostic 350 Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th edition, 2012. Disponível em: < 351

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.352.pdf./>. Acesso em: 21 jun. 2013.

PACHECO, A. M.; HAMZÈ, A. L.; AVANZA, M. F. B. et al. Tuberculose bovina – 362 relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VII, n. 13, 363 Julho de 2009

PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; MENDOZA, J. H. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, v. 127, p. 315-324, 2008

PARSONS LM, BROSCH R, COLE ST et al (2002). Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. **J. Clin. Microbiol**; 40: 2339–2345

POLLOCK, J. M & NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. **The veterinary Journal**. v. 163, p.115-127, 2002

PRODINGER, W. M. et al. Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 4984–4992, 2005

R Development Core Team (2011). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em <<http://www.R-project.org>>.

REIS D.O., ALMEIDA L. & FARIA A.R. 1995. Estudo comparativo entre linfossarcoma, tuberculose e linfadenites inespecíficas ocorridas em bovinos abatidos e a correspondência histológica. **Hig. Alim.** 35:28-30.

RIET-CORREA, F. & GARCIA, M. Tuberculose. In: RIET CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDÉZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. (org). **Doenças dos Ruminantes e eqüinos**. 2. ed. São Paulo: Varela Editora, 2001, v.1, p.351-362

RORING, S.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.227- 236, 2000.

RUGGIERO, A.P.M. **Métodos moleculares aplicados ao diagnóstico da tuberculose bovina**. 2004. 68 f. dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo: São Paulo

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

SALAZAR, F.H.P. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil**. 2005. 68f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e

Zotecnia - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande: Mato Grosso do Sul.

SANTOS N, GERALDES M, AFONSO A, ADAMS V, CORREIA-NEVES M (2010) Diagnosis of tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*): a comparison of methods apply to animals harvested-hunter. **PLoS ONE**. 5: e12663

SOUZA, R. F. P.; LUVIZOTTO, M. C.. R.; FERNANDES, J. O. M.; 3, HEITOR FLÁVIO FERRARI, H. F. F. Caracterização histomorfológica de lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose ganglionar e pulmonar em bovinos abatidos na região Noroeste do estado de São Paulo; **Ciên. Agr. Saúde**. FEA, Andradina, v.9, 2013 27 - 35

RODRIGUEZ, J.G.; MEIJA, A.; DEL PORTILLO, P.; PATARROYO, M.E.; MURILLI, L.A. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, v.141, p.2131-2136, 1995

TAYLOR, J.M.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.4, p.1272-1278, 2001.

TAYLOR, G. M.; WORTH, D. R.; PALMER, S.; JAHANS, K.; HEWINSON, R. G. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**, v. 3, p. 3-12, 2007.

USABIAGA, J. *Brucelosis y tuberculosis bovina: ¿control o eliminación?* São Paulo: OMS, 2001. (RIMS 12/15).

UEYAMA, M ; CHIKAMATSU, K ; AONO, A ; MURASE, Y ; KUSE, N ; ORIMOTO, K ; OKUMURA, M ; YOSHIYAMA, T ; OGATA, H ; YOSHIMORI, K ; KUDOH, S ; AZUMA, A ; GEMMA, A ; MITARAI, S Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from patients with tuberculosis in Japan. **Tuberculosis**, 2014, Vol.94(1), pp.15-19 [Periódico revisado por pares]

VARELLO, M. K.; PEZZOLATO, D. MASCARINO, F. INGRAVALLE, M. CAMELLI, E. BOZZETTA Comparação de técnicas histológicas para o diagnóstico da tuberculose bovina no âmbito dos programas de erradicação **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 20 (2008), pp 164-169

WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gd (WC1+) T cells and CD 68+ cells. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 223 - 234, 2005.

WATRELOT-VIRIEUX, E. D.; DREVON-GAILLOT, Y.; TOUSSAINT, P.; BELLI Comparação de três métodos de detecção de diagnóstico para *tuberculose* em bovinos franceses **Journal of Veterinary Medicine Série B de Saúde Pública Veterinária**, 53 (2006), pp 321-325

WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v.43, p.227-240, 1995

WARREN, R. M. et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 10 n. 7, p: 818–822, 2006.

WEDLOCK, N. D. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. **Microbes and Infection**. v. 4 p. 471–480, 2002

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Tuberculosis Control: a short update to the 2009 report. 2009. Disponível em:

<http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/en/index.html>.

Acesso em: 09 ago. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global tuberculosis Report 2013.

Geneva: WHO, 2013

YEBOAH-MANU, D.; YATES, M. D.; WILSON, S. M. Application of a simple Multiplex PCR to aid in routine work of the *Mycobacterium* reference laboratory.

Journal of Clinical Microbiology, v. 39, n. 11, p. 4166-4168, 2001

ZANDEN, A.G.M. **Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis and**

control of tuberculosis., 2002. p.12-45. Tese (Doutorado) - Katholieke

Universiteit Nijmegen, Nijmegen, 2002.

ZANINI, M. S. et al. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction Identification in Bovine Lymphnode Biopsies and Genotyping in Isolates from Southeast Brazil by Spoligotyping and Restriction Fragment Length Polymorphism. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96: 000-000, 2001.

ZUMÁRRAGA, M. J.; PAOLICCHI, F.; GARBACCIO, S.; GIOFFRÉ, A. Aplicación de la PCR em detección de *Mycobacterium bovis* em muestras de tejido de terneros. **Veterinaria Argentina**, v. 28, n. 179, p. 668-676,2001.

4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tuberculose bovina ainda é uma doença presente no estado exercendo papel importante do cenário da saúde pública, sendo o matadouro frigorífico importante para detecção dos casos existentes.

Para minimizar equívocos no julgamento de tuberculose em abatedouros, recomenda-se a utilização de testes complementares de diagnóstico rápido. A associação entre a inspeção *post mortem* de rotina e o diagnóstico molecular (m-PCR) direto do material caseoso de tecidos suspeitos é uma adequada estratégia.

O protocolo de mPCR realizado direto do material de granulomas demonstrou ser eficiente, com excelentes resultados para concentração e pureza do DNA, com alto índice de correlação com o cultivo, indicando que esta técnica diagnóstica pode substituir os métodos bacteriológicos, acrescentando ainda a capacidade de distinção entre as espécies estudadas contribuindo para epidemiologia molecular da doença no estado e no país podendo contribuir para a criação de uma base de dados para o estudo epidemiológico da tuberculose bovina.

AGRADECIMENTOS: À FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pela bolsa concedida a autora e pelo financiamento do projeto.