

KLAUDIA DOS SANTOS GONÇALVES JORGE

**IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium bovis* EM BOVINOS E SUA
IMPORTÂNCIA NA OCORRÊNCIA DE TUBERCULOSE ZOONÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha

CAMPO GRANDE
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

KLAUDIA DOS SANTOS GONÇALVES JORGE

**IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium bovis* EM BOVINOS E SUA
IMPORTÂNCIA NA OCORRÊNCIA DE TUBERCULOSE ZOONÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-
Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul, para obtenção do título de Doutora.

Resultado _____

Campo Grande (MS), 15 de Abril de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha _____

Instituição UFMS

Prof. Dra. Eliana Roxo _____

Instituição Instituto Biológico de São Paulo

Prof. Dra. Aiesca Pellegrin _____

Instituição Embrapa Pantanal

Prof. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira _____

Instituição UFMS

Prof. Dra. Anamaria Paniago _____

Instituição UFMS

À minha família pela compreensão e amor que me dedicam.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha.

A minha amiga e colega, professora Dra Ana Luiza Alves Rosa Osório.

A professora Dra Clarice Queico Fujimura Leite, docente e pesquisadora da Faculdade de Farmácia da UNESP – Araraquara, SP e a toda a sua equipe.

A equipe de pesquisadores que participou diretamente do desenvolvimento deste trabalho: Ana Luiza Alves Rosa Osório, Alexandre Dobbins Azambuja, Adolfo Carlos Barreto Santos, Clarice Queico Fujimura Leite, Flávio Ribeiro de Araújo, Rivaldo Venâncio da Cunha.

Ao Laboratório Central de Mato Grosso do Sul, LACEN-MS.

A Delegacia Federal de Agricultura, DFA-MS.

A Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal, IAGRO-MS.

“A arte de viver não distingue
o trabalho do lazer,
a mente do corpo,
a educação da recreação.
É simplesmente uma atitude,
deixando que os outros
decidam se estamos
trabalhando ou nos divertindo.”
(anônimo)

RESUMO

Jorge KSG. Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica. Campo Grande; 2011. [Tese – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A tuberculose bovina é uma zoonose, doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem, causada por *Mycobacterium bovis*, cujo hospedeiro primário é o bovino, mas diversas espécies de mamíferos domésticos, silvestres e o homem são também susceptíveis ao mesmo bacilo. Para identificar casos de tuberculose bovina em Mato Grosso do Sul e correlacionar esse achado com tuberculose zoonótica realizou-se o diagnóstico clínico, bacteriológico e molecular da infecção e comprovou-se a presença de *M. bovis* em produtos de origem bovina comumente utilizados como alimento humano. Foram realizados dois estudos. No primeiro, o objetivo foi avaliar a contribuição da vigilância sanitária para a investigação epidemiológica retrospectiva de focos de tuberculose em rebanhos de Mato Grosso do Sul. A partir de lesões macroscópicas detectadas ao abate de um bovino durante a inspeção sanitária de rotina, examinou-se 200 bovinos por meio de teste cervical comparativo (TCC). Os animais positivos ou inconclusivos nesse teste foram abatidos e ao exame macroscópico, amostras de órgãos com lesões sugestivas de tuberculose foram coletadas e encaminhadas para cultivo em meio de Stonebrink, pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) e identificação molecular dos isolados por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR) com os oligonucleotídeos JB21/JB22. O TCC diagnosticou tuberculose em 24/200 (12%) bovinos sendo 23 positivos e um inconclusivo. Ao abate sanitário, todos os 24 bovinos apresentaram lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. O exame microbiológico (cultura e ZN) dessas lesões possibilitou o isolamento de BAAR, e a PCR identificou a presença de *M. bovis* em todos os isolados. Conclui-se que, ao detectar lesões sugestivas de tuberculose em um único bovino, a inspeção sanitária de abate contribui para a investigação epidemiológica retrospectiva de foco de tuberculose em rebanho bovino. No segundo estudo, o objetivo foi isolar e identificar *M. bovis* do leite de vacas em lactação oriundas do mesmo rebanho com diagnóstico de tuberculose por meio do TCC. Amostras de leite *in natura* de 27 vacas positivas no TCC foram cultivadas em meio de Stonebrink e incubadas por até 90 dias. As colônias isoladas foram coradas pela coloração de ZN e identificadas por PCR empregando dois pares de oligonucleotídeos: TB11/TB12 para identificação do gênero *Mycobacterium* spp e JB21/JB22 para identificação da espécie *M. bovis*. Das 27 amostras de leite *in natura* submetidas ao cultivo, 12 eram BAAR sendo todas confirmadas como de *Mycobacterium* spp pelos oligonucleotídeos TB11/TB12 e destes, quatro eram de *M. bovis*, detectadas pela presença de produto de amplificação gerado pelo emprego dos oligonucleotídeos JB21/JB22. Conclui-se que a presença de *M. bovis* e de outras micobactérias no leite *in natura* de vacas provenientes de rebanhos com diagnóstico de tuberculose oferece risco ao consumo humano não só pela possibilidade de contrair tuberculose zoonótica, assim como outras micobacterioses. Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que *M. bovis* está presente no rebanho

bovino do estado de Mato Grosso do Sul e pode ser encontrado tanto nos tecidos quanto no leite *in natura* de vacas oriundas de rebanho com diagnóstico de tuberculose. Além do risco predominantemente ocupacional de contágio humano por *M. bovis* pela via respiratória (inalação de gotículas infectadas) e cutânea (através de solução de continuidade da pele), medidas como a fervura/pasteurização do leite e produtos lácteos e o total cozimento da carne para o consumo são indispensáveis para evitar a transmissão de *M. bovis* por via digestiva ao homem, e para intensificar a prevenção e controle da tuberculose zoonótica.

Palavras-chave: Tuberculose. Zoonose. Diagnóstico. *Mycobacterium bovis*. Saúde Pública.

ABSTRACT

Jorge KSG. Identification of *Mycobacterium bovis* in cattle and its importance in the occurrence of zoonotic tuberculosis. Campo Grande; 2011. [Thesis – School of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul].

Bovine tuberculosis is a zoonotic disease, infection which is naturally transmissible between the vertebrate animals and man, caused by *Mycobacterium bovis*, whose primary host is the cattle, but several species of domestic mammals, wild animals and man are also liable to the same bacillus. To identify cases of bovine tuberculosis in Mato Grosso do Sul state and correlate this finding with zoonotic tuberculosis, the clinical, bacteriological and molecular diagnosis of infection was carried out and proved the presence of *M. bovis* in bovine products commonly used as food. Two studies were conducted. At first, the objective was to evaluate the contribution of health surveillance for the retrospective epidemiological studies of outbreaks of tuberculosis in herds of Mato Grosso do Sul state. From macroscopic lesions detected at slaughter of the cattle during routine health inspection, 200 cattle were examined through single intradermal comparative tuberculin test (SICTT). Animals with positive or inconclusive SICTT result were slaughtered. During the macroscopic examination, samples of organs with lesions suggestive of tuberculosis were collected and sent for culture on Stonebrink medium, search for acid-resistant bacilli (AFB) by Ziehl-Neelsen stain (ZN) and molecular identification isolates by polymerase chain reaction (PCR) with primers JB21/JB22. Tuberculosis was diagnosed by SICCT in 24/200 (12%) of the cattle. Of these, 23 were positive and one was inconclusive. All 24 cattle had gross lesions of tuberculosis. The microbiological examination (culture and ZN) of these lesions allowed the isolation of AFB, and PCR identified the presence of *M. bovis* in all isolates. We conclude that, by detecting lesions suggestive of tuberculosis in one cattle, the slaughter sanitary inspection contributed to the retrospective epidemiological investigation of an outbreak of tuberculosis in cattle. In the second study, the aim was to isolate and identify *M. bovis* in the milk of lactating cows originated from the same herd diagnosed with tuberculosis through the SICCT. Samples of fresh milk from 27 cows were cultured in a Stonebrink medium and incubated for 90 days. The isolated colonies were stained by ZN technique and identified by PCR using two pairs of primers: TB11/TB12 for identification of *Mycobacterium* spp JB21/JB22 and to identify the species *M. bovis*. Of the 27 samples of fresh milk subjected to cultivation, 12 were AFB and all confirmed as *Mycobacterium* spp by TB11/TB12 primers. Of these, four were of *M. bovis* detected by the presence of amplification product generated by the use of primers JB21/JB22. We conclude that the presence of *M. bovis* and other mycobacteria in raw milk of cows from herds with a diagnosis of tuberculosis poses a risk for human consumption, not only by the possibility of contracting zoonotic tuberculosis, but also other mycobacteria. The results of this study indicate that *M. bovis* is present in cattle from Mato Grosso do Sul and can be found both in tissues and in the fresh milk of cows coming from herds diagnosed with tuberculosis. Besides the risk predominantly occupational of human infection by *M. bovis* through respiratory (inhalation of infected droplets) and cutaneous (through interruption of the

skin) routes, measures such as boiling / pasteurizing milk and dairy products and total cooking the meat for consumption are essential to prevent transmission of *M. bovis* to humans through the digestive system and strengthen the prevention and control of zoonotic tuberculosis.

Key-words: Tuberculosis. Zoonosis. Diagnosis. *Mycobacterium bovis*. Public Health.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes, do inglês <i>Acid Fast Bacilli</i>
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
DR	Repetição direta, do inglês <i>Direct Repeat</i>
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ	Interferon gama
IL-2	Interleucina-2
LACEN-MS	Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multidrogasresistentes
MIRU	Unidades Repetitivas de Interespaçadores Micobacterianos, do inglês, <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
OIE	Organização Mundial para Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRA	Análise com Enzimas de Restrição, do inglês <i>Restriction Enzyme Analysis</i>

PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
PPD	Derivado Protéico Purificado, do inglês <i>Purified Protein Derivative</i>
RFLP	Análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição, do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SICTT	Teste cervical comparativo, do inglês <i>Single Intradermal Comparative Tuberculin Test</i>
TCC	Teste Cervical Comparativo
TCS	Teste Cervical Simples
Th1	Linfócito T auxiliar 1, do inglês <i>T helper</i>
TPC	Teste da Prega Caudal
ZN	Ziehl Neelsen
ZNF	Ziehl Neelsen-Faraco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 OBJETIVOS	8
3 REFERENCIAL TEÓRICO	8
3.1 Classificação e características morfológicas e biológicas de <i>Mycobacterium</i> spp.....	8
3.1.1 <i>Mycobacterium bovis</i>	10
3.2 Epidemiologia da tuberculose bovina.....	12
3.2.1 Distribuição geográfica.....	12
3.2.2 Hospedeiros de <i>Mycobacterium bovis</i>	14
3.2.3 Transmissão e vias de infecção	15
3.2.4 Patogenia.....	16
3.2.5 Sinais clínicos.....	18
3.2.6 Diagnóstico	18
3.2.7 Controle	23
3.3 Tuberculose humana causada por <i>Mycobacterium bovis</i>	25
4 ARTIGOS	29
4.1 Contribution of slaughter surveillance for bovine tuberculosis control in Mato Grosso do Sul state, Brazil.....	29
4.2 Detecção de <i>Mycobacterium bovis</i> no leite <i>in natura</i> de vacas positivas na tuberculinização	49
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES	69
7 PERSPECTIVAS.....	70
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

A reemergência de enfermidades é um tema preocupante e nos últimos anos aquelas que afetam os animais destacam-se, pois muitas são zoonoses que ameaçam a saúde humana, tanto pela transmissão direta do patógeno do animal para o homem, quanto indiretamente pelo consumo de produtos de origem animal contaminados. Além disso, essas enfermidades interferem negativamente na produção animal e resultam na redução da oferta de alimentos à população. Mesmo doenças endêmicas incluídas em programas de controle podem, em determinadas circunstâncias, aumentar a sua incidência.

Fatores como a intensa movimentação de diferentes espécies animais, ameaças constantes ao equilíbrio ecológico, microorganismos de difícil cultivo ou nunca antes isolados e até mesmo bioterrorismo implicam na permanência das doenças zoonóticas e também no aumento de suas emergências (BROW, 2004).

A atualidade e importância da pesquisa da tuberculose são indiscutíveis, pois os avanços no seu conhecimento e a tecnologia disponível para seu controle, não têm sido suficientes para causar impacto significativo na redução de sua morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento (ABRAHÃO, 1999).

A tuberculose é uma doença de alta relevância econômica para a criação de bovinos uma vez que afeta diretamente a produtividade e também influencia o comércio internacional dos animais e seus subprodutos. Além disso, a tuberculose bovina tem potencial zoonótico e, portanto representa risco para saúde pública (MICHEL et al., 2010).

A tuberculose bovina é uma zoonose, doença ou infecção naturalmente transmissível entre os animais vertebrados e o homem, causada por *Mycobacterium bovis*, cujo hospedeiro primário é o bovino, mas diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres, inclusive o homem, são também susceptíveis ao mesmo bacilo (BIET et al., 2005; CORNER, 2006).

É uma das mais graves e antigas enfermidades infecto-contagiosas conhecidas e caracteriza-se pela evolução geralmente crônica, inicialmente subclínica, evidenciando sintomas apenas quando há comprometimento dos órgãos atingidos (GUTIÉRREZ et al., 1998).

Distribui-se por todo o mundo e causa impacto sanitário e econômico negativos nos países afetados, particularmente naqueles em desenvolvimento (ROXO, 1997). Em alguns países desenvolvidos há uma preocupação crescente com a tuberculose zoonótica devido à presença de reservatórios silvestres que têm sido responsáveis pela reintrodução da doença e aumento alarmante do número de casos de tuberculose bovina (GARNIER et al., 2003; MICHEL et al., 2006).

No ser humano a infecção é causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, mas o patógeno próprio dos animais, *M. bovis*, tem sido provavelmente o agente zoonótico mais importante da humanidade (ACHA; ZYFRES, 1986; ABALOS; RETAMAL, 2004).

Mesmo que o controle da infecção por *M. bovis* em animais tenha contribuído para a redução da infecção humana, a tuberculose é considerada atualmente um problema reemergente. Os fatores que contribuem para isso são as cepas multidroga-resistentes (MDR), a disseminação do vírus da imunodeficiência humana, a presença de reservatórios silvestres e a persistência do agente nos bovinos. Estima-se que entre 2002 e 2020 aproximadamente um bilhão de pessoas serão infectadas, mais de 150 milhões desenvolverão a doença e 36 milhões morrerão de tuberculose (ABALOS; RETAMAL, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) decretou a tuberculose como um “estado de emergência mundial”. A infecção por *M. bovis* no ser humano e em animais e a considerável importância em saúde pública resultou em uma convenção sobre tuberculose zoonótica em Genebra, Suíça. Entre várias recomendações estão: necessidade de informações sobre a distribuição e prevalência da infecção e doença devidas ao *M. bovis* em animais e humanos; a necessidade de evidenciar a importância do *M. bovis* na atual epidemia de tuberculose humana nos países em desenvolvimento; o conhecimento do mecanismo de transmissão da doença; a realização de estudos epidemiológicos bem planejados que servirão de base para programas de controle; o desenvolvimento de testes diagnósticos que discriminem cepas dentro do complexo *M. tuberculosis* e a efetiva colaboração entre os profissionais de saúde, principalmente médicos e veterinários, para a investigação da importância zoonótica do *M. bovis* (ABRAHÃO, 1999).

A Organização Mundial para Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health* - OIE) também têm demonstrado a sua preocupação com as doenças

zoonóticas e publicou em 2000 e em 2004 importantes discussões sobre o assunto (BROW, 2004).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído em 2001 com o propósito de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal e aumentar a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2001). O programa nacional determina que o serviço de inspeção sanitária envie as lesões sugestivas de tuberculose detectadas no abate a um laboratório credenciado para a confirmação da doença, mas somente dos bovinos oriundos de propriedades certificadas livres de tuberculose. As lesões encontradas nos demais bovinos devem apenas ser comunicadas ao serviço de defesa oficial (BRASIL, 2006). Em países onde os programas de controle da doença estão avançados e a prevalência de tuberculose é baixa, como ocorre nos Estados Unidos, toda lesão sugestiva deve ser analisada e, temporariamente, são tomadas para análise, amostras aleatórias de tecidos sem lesão (KANEENE et al., 2006).

Em relação ao agronegócio, o impacto negativo da doença na pecuária causa prejuízos na ordem de três milhões de dólares (GARNIER *et al.*, 2003) com queda na produtividade, morte dos animais e impossibilidade de atender às exigências sanitárias dos países importadores de bovinos e seus subprodutos (JORGE et al., 2001).

Os dados disponíveis no Brasil sobre a tuberculose humana causada por *M. bovis* são precários. Evidencia-se, portanto, a necessidade de uma política de aporte de recursos humanos, materiais e financeiros, que envolvam a cooperação de órgãos vinculados à saúde pública e corrobore com as recomendações da OMS.

Medidas como a fervura e pasteurização do leite e seus subprodutos, proteção dos indivíduos que se ocupam dos animais, especialmente trabalhadores da indústria de carne, e a adoção de tratamentos de curta duração para o homem com observação do paciente continuam sendo válidas para o controle e prevenção da tuberculose zoonótica. Com as ferramentas atuais para o diagnóstico e controle da doença nos animais e de sua transmissão ao ser humano, a reemergência é um retrocesso na história dessa zoonose. Entretanto, a ausência de recursos e de técnicas avançadas nos programas de controle pode traduzir-se na perpetuação do problema uma vez que o patógeno é transmitido e sobrevive indefinidamente em seus hospedeiros, gera enfermidade em determinadas circunstâncias e está

tornando-se resistente às escassas drogas que são habitualmente utilizadas para o seu controle no ser humano.

Assim, medidas sanitárias integradas envolvendo os diferentes segmentos da saúde humana e animal pode proporcionar uma ampla abordagem da epidemiologia da tuberculose e atenuar a incidência de *M. bovis* nos animais e no homem.

2 OBJETIVOS

- identificar casos de tuberculose bovina em Mato Grosso do Sul por meio de diagnóstico clínico, bacteriológico e molecular;
- avaliar a contribuição da vigilância sanitária na detecção de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos oriundos de rebanho com diagnóstico clínico de tuberculose;
- identificar focos da infecção tuberculosa por meio do estudo retrospectivo de rebanhos;
- verificar a presença de micobactérias no leite de vacas em lactação oriundas de rebanho com diagnóstico clínico de tuberculose por meio de tuberculinização;
- relatar a presença de outras micobactérias detectadas no diagnóstico bacteriológico das amostras biológicas estudadas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Classificação e características morfológicas e biológicas de *Mycobacterium* spp

As micobactérias que causam tuberculose em mamíferos pertencem à Classe Actinobacteria, Ordem Actinomycetales, Família Mycobacteriaceae, Gênero *Mycobacterium* e fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, um grupo de espécies relacionadas constituído, atualmente, por sete espécies – *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum* (componentes clássicos), *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipeddi* – responsáveis por patologia similar em diferentes hospedeiros mamíferos (SMITH et al., 2006). Embora *M. canetti* cause tuberculose em humanos, apenas poucas cepas tem sido isoladas e a sua contribuição na epidemiologia da doença é incerta (Niemann et al., 2000).

Mycobacterium caprae encontrada primariamente em cabras na Espanha, foi recentemente elevada à espécie (ARANAZ et al., 1999; NIEMANN et al., 2002; ARANAZ et al., 2003; COUSINS et al., 2003) e *M. pinnipeddi* foi isolada de focas que parece ser seu hospedeiro natural, embora esse microrganismo seja também patogênico para cobaias, coelhos, antas, humanos, e possivelmente, bovinos (COUSINS et al., 2003).

A proximidade genética das espécies do complexo *M. tuberculosis* pode ser verificada pelo alto grau de similaridade em nível de DNA e pela sequência 16S rRNA idêntica, mas diferem enormemente em termos de hospedeiro preferencial, características fenotípicas e patogenicidade (NIEMANN et al., 2000; BROSCHE et al., 2002; ARANAZ et al., 2003).

Micobactérias do complexo *M. avium-intracellulare* não causam tuberculose mas podem ser patogênicas para aves e mamíferos. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* é agente etiológico da paratuberculose ou doença de Johne em ruminantes (DRIEMEIER et al., 1999) e também tem sido isolada de tecido de humanos com doença de Crohn (BIET et al., 2005; CARVALHO et al., 2009).

Micobactérias são estruturalmente relacionadas às bactérias Gram positivas, mas não se classificam como tal, pois as moléculas ligadas a sua parede celular são lipídeos, ao invés de proteínas ou polissacarídeos, que frequentemente não retém cristal violeta e aparecem como “fantasmas” após coloração de Gram (BARRERA, 2007). São bacilos pequenos e sem mobilidade, não esporulados, não capsulados e não flagelados. Como o ambiente muda, o bacilo é capaz de trazer à tona diferentes mecanismos fisiológicos, a fim de sobreviver mesmo em condições adversas. Essa é uma estratégia não só para a patogenicidade, mas também para a persistência das espécies. Há muito tempo demonstrou-se experimentalmente que, durante o curso da infecção em camundongos, *M. tuberculosis* pode mudar o seu comportamento aeróbico baseado no metabolismo de carboidratos para microaerofilia utilizando lipídeos (BLOCH; SEGAL, 1956). Com o completo sequenciamento do genoma de *M. tuberculosis*, um número exageradamente elevado de genes supostamente envolvidos no metabolismo de ácidos graxos foi identificado. Esse fenômeno pode estar relacionado à capacidade do patógeno de crescer ou persistir nos tecidos do hospedeiro onde os ácidos graxos sejam a principal fonte de carbono (NEYROLLES, 2006), o que sustenta a hipótese da microaerofilia.

As micobactérias assim como bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), isto é,

quando corados pela fuccina a quente resistem à descoloração com álcool-ácido - coloração de Ziehl-Neelsen (ZN).

A parede celular das micobactérias é complexa, constituída por 60% de lipídeos, como ácidos micólicos e micosídeos, e por polipeptídios. A parede celular é composta pela membrana citoplasmática em sua face interna, uma camada intermediária de peptidoglicanos e uma camada externa de ácidos micólicos específicos ligados ao açúcar arabinogalactano. O complexo micolilarabinogalactano impermeabiliza a superfície da micobactéria, tornando-a muito resistente a compostos hidrofílicos e à dessecação, além de dificultar a captação de nutrientes retardando o seu crescimento (CORNER, 1994). A análise química da composição molecular específica dos diferentes grupos funcionais de ácidos micólicos possibilita a identificação da espécie da micobactéria envolvida. Este método também pode ser usado na rotina de identificação de micobactérias (LEITE et al., 1998).

As espécies do gênero *Mycobacterium* spp. crescem em meios especiais compostos de ovo e amido, enriquecidos com asparagina e contendo verde malaquita para inibir contaminantes. O glicerol dificulta o crescimento de *M. bovis*, mas favorece o crescimento de todos os outros microrganismos do gênero. Em meios de cultura à base de ovo, é típico o crescimento de colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo-pálida, com borda irregular e superfície granular. As micobactérias também crescem em meios à base de agar; nestes as colônias são brancas, finas, ásperas e planas, exceto no centro onde são mais volumosas (CORNER, 1994). Micobactérias do complexo *M. tuberculosis* encontram condições ideais de multiplicação em animais de sangue quente, aproximadamente 37 °C e pH neutro (BARRERA, 2007).

As micobactérias são sensíveis à pasteurização, à fervura e à incidência de luz solar direta em ambiente seco. Desinfetantes fenólicos, formólicos, álcool e hipoclorito de sódio são eficientes no combate ao bacilo, mas sua ação pode ser afetada pela concentração do produto, tempo de exposição, temperatura e presença de matéria orgânica. Os bacilos podem sobreviver por seis meses a quatro anos em locais úmidos, com temperatura amena e ao abrigo da luz solar (ROXO, 1997).

3.1.1 Mycobacterium bovis

Mycobacterium bovis é um patógeno que habita preferencialmente o meio intracelular de fagócitos mononucleares e, como as demais micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, é hospedeiro-dependente e não pode multiplicar-se no meio ambiente. Porém, são capazes de se reproduzir *in vitro*. *M. bovis* é microaerófilo, ou seja, cresce preferencialmente em uma tensão reduzida de oxigênio. *M. bovis* não é capaz de metabolizar glicerol em piruvato como fazem as outras espécies do complexo. A análise da sequência genômica dessa espécie confirmou que todos os genes requeridos para a formação do piruvato não são funcionais. Desse modo, *M. bovis* cresce muito melhor na presença de piruvato como fonte de carbono (BARRERA, 2007).

Na baciloscopia, *M. bovis* aparece como cocobacilo de coloração vermelho intensa, medindo de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento (CORNER, 1994).

A forma mais eficiente de infecção por *M. bovis* é pelo contato direto com o animal contaminado. Causa tuberculose primariamente em bovinos, mas é o membro do complexo *M. tuberculosis* que tem a mais ampla gama de hospedeiros mamíferos domésticos, inclusive o homem, ou silvestres. Os hospedeiros de *M. bovis* comportam-se como reservatórios da infecção ou como hospedeiros ocasionais que participam do ciclo de transmissão do agente (HADDAD et al., 2004; SMITH et al., 2006; MICHEL et al., 2010).

De acordo com a OIE, *M. bovis* é classificado como um patógeno de risco 3 para a saúde pública cujo risco individual é alto e para a comunidade é limitado (OIE, 2005; THOEN et al., 2006).

3.2 Epidemiologia da tuberculose bovina

3.2.1 Distribuição geográfica

A tuberculose bovina possui distribuição mundial, mas a sua prevalência é maior em países em desenvolvimento onde o conhecimento da epidemiologia da doença e as ações concretas para o seu controle são limitadas (REVIRIEGO GORDEJO; VERMEERSCH, 2006).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população bovina no Brasil é de 205.292.000 de cabeças das quais 34,4% estão na região Centro Oeste que também apresentou o maior crescimento em relação ao rebanho efetivo nacional (2,5%) em 2009. O Brasil tem o segundo maior rebanho bovino do mundo, é o segundo maior produtor e o principal exportador mundial de carne bovina (BRASIL, 2010).

Mato Grosso do Sul tem o terceiro maior rebanho bovino do país com 22.325.623 cabeças o que representa 10,9% no efetivo total, atrás de Minas Gerais com 22.469.791 e Mato Grosso com 27.357.089 (BRASIL, 2010).

No Mato Grosso do Sul, Schenk e Schenk (1982) encontraram prevalência de 0,2% de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose em abatedouros, no período de 1974 a 1979. Jorge (2001) e Araújo et al. (2005) isolaram e identificaram *M. bovis* em amostras de órgãos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose detectadas pela inspeção sanitária de abate e confirmam a presença da tuberculose bovina no rebanho desse estado.

No Brasil, os dados de notificações oficiais de tuberculose bovina indicaram prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2010). Estudos isolados realizados em diferentes estados a partir do exame de carcaças em matadouros-frigoríficos estimaram prevalência de tuberculose bovina de 0,17% em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 1986), 5,16% no Pará (ALFINITO; OLIVEIRA 1986), 0,36% em São Paulo (RICCETTI et al., 1989) e 0,64% no Rio Grande do Sul (ANDRADE et al., 1991). Em Minas Gerais a prevalência de tuberculose em bovinos de corte abatidos no período de 1993 a 1997

em frigoríficos sob inspeção federal foi de 0,7%. Os índices encontrados são subestimados, pois a prevalência real deve considerar os casos de tuberculose sem lesões macroscópicas detectáveis no exame *post mortem* (BAPTISTA et al., 2004).

Em 1999 um levantamento realizado no estado de Minas Gerais nas regiões do Triângulo Mineiro e Centro Sul envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou a prevalência de animais infectados em 0,8%. O índice geral de propriedades com animais reagentes foi de 5% e no universo de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção, 15% (BELCHIOR, 2001).

Poucos estudos têm sido publicados quanto à prevalência da tuberculose bovina em países em desenvolvimento. As prevalências de bovinos infectados foram estimadas 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). Nicarágua, Honduras e República Dominicana apresentam prevalências menores que 1% e Argentina e Chile 2,2% e 4% respectivamente (ABALOS; RETAMAL, 2004).

Recentemente, uma atualização nos programas de controle da tuberculose nos países da América Latina e Caribe concluiu que 70% do rebanho bovino estão em países onde a taxa de infecção por *M. bovis* é maior que 1%: Haiti no Caribe, Guatemala na América Central, e Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Equador, Peru e Guiana na América do Sul. Os 30% restantes estão em países onde a infecção afeta menos de 1% dos bovinos ou é virtualmente nula como ocorre no Caribe: Antigua, Bahamas, Barbados, Bermuda, Ilhas Virgens, Dominica, Granada, Guadalupe, Montserrat, Antilhas Holandesas, Saint Kitts e Nevis, Santa Lucia, São Vicente, Granadinas, Trinidad Tobago, Jamaica e Cuba; na América Central: Panamá, Honduras e Belize; e na América do Sul: Colômbia, Suriname, Uruguai e Venezuela (KANTOR; RITACCO, 2006).

Nos países desenvolvidos, a tuberculose bovina encontra-se em fase avançada de controle ou erradicação, como se observa nos Estados Unidos e no Canadá, onde a incidência da doença é muito baixa, contando inclusive com áreas livres da doença (ESSEY; KOLLER, 1994).

Os países membros da Comunidade Européia, segundo levantamento realizado em 1991, apresentavam prevalências variadas de tuberculose bovina. A Dinamarca, Luxemburgo e os Países Baixos eram considerados áreas livres;

Alemanha, Bélgica, Portugal e Grã-Bretanha tinham taxas muito baixas, 0,0024%, 0,01%, 0,12% e 0,15%, respectivamente; Grécia e França, com casos esporádicos da doença; Irlanda com 8,8% de casos de tuberculose bovina e Itália com 3,71% ainda não haviam alcançado a erradicação. Na Espanha, onde o programa nacional de erradicação era recente, a infecção atingia 10% do rebanho bovino (CAFFREY, 1994). Atualmente a União Européia conta com 12 membros considerados oficialmente livres de tuberculose (ABERNETHY et al., 2006).

3.2.2 Hospedeiros de *Mycobacterium bovis*

A tuberculose tem sido relatada em uma variedade de espécies de mamíferos domésticos e silvestres, incluindo os primatas e espécies exóticas de vida livre ou de cativeiro. No homem, *M. bovis* causa doença clinicamente idêntica àquela causada por *M. tuberculosis* (PRITCHARD, 1988).

Os bovinos, suínos e bubalinos são as principais espécies de hospedeiros domésticos de *M. bovis* embora os ovinos, caprinos, eqüídeos, caninos e felinos também sejam susceptíveis. No Brasil e na Argentina, onde a tuberculose bovina é um problema importante, a infecção de porcos domésticos por *M. bovis* é comum e representa um reservatório adicional da doença (MORRIS et al., 1994; GUTIÉRREZ et al., 1998). Mota et al. (2001) relataram tuberculose em um cão que vivia em estreita relação com búfalos que apresentavam prevalência de 20,4% de animais reagentes a tuberculina, o que demonstra a importância do cão na cadeia de transmissão da tuberculose bovina.

Mycobacterium bovis é mais frequentemente isolado a partir de bovinos domesticados embora possa ser recuperado de outros bóvidos e demais mamíferos. O isolamento da micobactéria a partir de diferentes hospedeiros demonstra a dispersão de cepas em um hospedeiro alternativo ou a ampliação da preferência por espécies hospedeiras (SMITH et al., 2006).

A infecção por *M. bovis* foi também detectada em animais silvestres e pode ter severas conseqüências para o ecossistema (COUSINS et al., 2003). Tuberculose causada por *M. bovis* ocorre em diferentes populações de animais silvestres, na América do Norte, Europa, África e Nova Zelândia, e a manifestação da infecção

difere entre as espécies. Além do impacto direto nos animais silvestres, a tuberculose tem importância econômica quando a espécie envolvida é um reservatório da infecção para os animais domésticos. Também pode ser significativa para saúde pública se a espécie é fonte de infecção para a população humana. Os fatores que determinam a avaliação do risco para seres humanos são semelhantes aos que determinam risco para os animais domésticos (CORNER, 2006; BIET et al., 2005).

Muitos autores afirmam que a enfermidade é rara em animais selvagens, exceto naqueles que estejam ou tenham estado em contato com bovinos ou com o homem infectados por *M. bovis* (NEILL et al., 1994). Estudo realizado na Irlanda mostrou que espécies silvestres são hospedeiras que atuam na manutenção da infecção e contribuem para a persistência e difusão da enfermidade, além de interferir na eficácia de programas de erradicação da tuberculose em rebanhos bovinos (GORMLEY; COLLINS, 2000).

Na Nova Zelândia, onde a presença de reservatórios silvestres de *M. bovis* tem retardado a erradicação da tuberculose bovina, houve evidências epidemiológicas de que *Trichosurus vulpecula*, uma espécie de marsupial silvestre, foi o principal vetor da tuberculose para os bovinos em algumas áreas nas quais os rebanhos tornaram-se reinfected após a aplicação do sistema de saneamento “teste e abate” dos animais positivos (TWEDDLE; LIVINGSTONE, 1994).

Nos Estados Unidos, os cervídeos infectados por *M. bovis* também representam fonte de infecção para animais domésticos (GRIFFIN; BUCHAN, 1994). No Canadá a reemergência da tuberculose bovina é uma ameaça concreta. Em 2005 todas as culturas positivas para *M. bovis* realizadas por órgão oficial eram de amostras provenientes de animais silvestres (LUTZE-WALLACE; TURCOTTE, 2006).

Na Europa experimentos confirmaram que o texugo, um mamífero silvestre, transmite *M. bovis* para bovinos (NOLAN; WILESMITH, 1994).

3.2.3 Transmissão e vias de infecção

Mesmo antes de desenvolver lesões teciduais, o bovino infectado já é capaz de disseminar *M. bovis* por secreção nasal, leite, fezes, urina, secreção vaginal, sêmen e pela via uterina constituindo, ele próprio, a principal fonte de infecção (MCILROY et al., 1986). O uso de utensílios contaminados como, por exemplo, ordenhadeira mecânica na glândula mamária resulta em transmissão iatrogênica (NEILL et al., 1994).

A distribuição das lesões tuberculosas encontradas em bovinos naturalmente infectados mostra que 80 a 90% destas infecções ocorrem pela via respiratória sendo esta a via de infecção mais freqüente (MORRIS et al., 1994). Sabe-se que um único bacilo transportado no interior de uma gotícula é suficiente para estabelecer a infecção no pulmão do bovino (MENZIES; NEILL, 2000). A transmissão da tuberculose bovina pela via respiratória é facilitada pela convivência natural, em especial em rebanhos com alta densidade populacional e substancial movimentação de animais. A excreção respiratória seguida pela inalação de *M. bovis* é considerada a principal via através da qual a transmissão bovino-para-bovino ocorre. A ingestão de *M. bovis* a partir de animais infectados ou de pastagem, água e fômites contaminados é considerada uma via de infecção secundária à respiratória devido a uma quantidade menor de casos de bovinos com lesões mesentéricas. Embora menos freqüente, a transmissão vertical pela via orofaríngea é a principal forma de contaminação para bezerros jovens que se alimentam de leite materno contaminado por *M. bovis* proveniente de vacas tuberculosas. A transmissão genital e a infecção congênita não são comuns principalmente em regiões onde programas de controle da tuberculose são intensificados (NEILL et al., 1994; BIET et al., 2005).

3.2.4 Patogenia

A via de infecção por *M. bovis* pode ser deduzida a partir da localização das lesões *post mortem*. Lesões restritas a cavidade torácica sugerem que a infecção ocorreu pela inalação de aerossóis, enquanto que as lesões encontradas nos linfonodos mesentéricos sugerem que a infecção foi adquirida pela ingestão do agente (POLLOCK; NEILL, 2002). No entanto, com a generalização da infecção as lesões podem ser encontradas em praticamente todos os órgãos (ROXO, 1997).

Cerca de 90% dos casos de tuberculose bovina ocorre pela inalação de aerossóis contaminados com *M. bovis* (ROXO, 1997). Ao atingir o alvéolo o bacilo é fagocitado por macrófagos que, por quimiotaxia, migram até o foco da infecção. Se os bacilos resistirem aos efeitos bactericidas dos macrófagos ocorrerá multiplicação dos mesmos até 2 a 3 semanas após a inalação do agente infeccioso. Na tentativa de conter o crescimento intracelular das micobactérias o hospedeiro destrói seus próprios tecidos através da necrose de caseificação resultante da reação de hipersensibilidade tardia desencadeada pela ativação dos macrófagos por interferon-gama (IFN γ) e interleucina-2 (IL-2), citocinas liberadas por linfócitos T auxiliares (Th1) aproximadamente dez dias após o início da infecção. Novas células de defesa migram para o local dando origem a uma lesão granulomatosa específica (BRASIL, 2003). A área central do granuloma é constituída por macrófagos que assumem a forma de células gigantes multinucleadas resultantes da fusão de vários macrófagos, também conhecidas como “células de Langhan”, e por macrófagos alongados como as células epiteliais conhecidos como “células epitelióides” (NEILL et al., 2005). Linfócitos, monócitos e outras células sangüíneas circundam a lesão que pode sofrer fibrose periférica e posterior calcificação. As células do centro dos granulomas maiores podem ficar isoladas e morrerem, provavelmente por combinação da hipóxia com os efeitos citotóxicos dos macrófagos ativados. Como o tecido morto do centro do granuloma se transforma em uma massa esbranquiçada ou amarelada, pastosa, friável, lembrando a caseína do queijo, este processo é chamado de necrose de caseificação (BERNHAGEN et al., 1996; KOBAYASHI et al., 2001).

A presença de uma lesão no ponto de entrada do *M. bovis* e no linfonodo regional constitui o complexo primário (ROXO, 1997). O trato digestivo também é porta de entrada da tuberculose bovina, principalmente em bezerros alimentados com leite proveniente de vacas com mastite tuberculosa e em animais que ingerem água ou forragens contaminadas. Nesse caso, o complexo primário se localizará nos órgãos digestivos e linfonodos regionais (BRASIL, 2006). Nessa fase, pode ocorrer aparente cura da infecção. Entretanto, em decorrência de uma reinfecção endógena ou exógena que provoca a recrudescência e disseminação das lesões a infecção atinge tecidos vizinhos e pode se disseminar por todo o organismo (ROXO, 1997).

3.2.5 Sinais clínicos

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa de evolução crônica; só raramente pode se manifestar de forma aguda. Frequentemente infecções recentes não apresentam sinais clínicos. Esses podem aparecer em estágios mais avançados da doença e caracterizam-se por emaciação progressiva, aumento de volume dos linfonodos e, em alguns casos, tosse, dispnéia e episódios de diarreia intercalados com constipação (ROXO, 1997). Dificuldade em ganhar ou manter peso e queda na produção de leite também são relatados (OLMSTEAD; RHODE, 2004).

3.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico indireto *in vivo* da tuberculose bovina é realizado por meio de testes cutâneos com tuberculinas. As tuberculinas disponíveis são extratos antigênicos de proteínas purificadas ou PPD (*purified protein derivative*), de isolados AN5 de *M. bovis* (PPD bovino) e D4 de *M. avium* (PPD aviário). Embora descritas como puras, as tuberculinas são uma mistura de proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos nucleicos, o que inclui uma grande variedade de antígenos, alguns comuns a várias espécies de micobactérias que contribuem para as reações inespecíficas (MONAGHAN et al., 1994). Mesmo que os testes tuberculínicos não diferenciem as espécies de micobactérias; não distinguem estágio latente da infecção de doença, e não identifiquem animais anérgicos; e que a exposição à micobactérias ambientais além de erros do operador possam levar a falsos resultados (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006), ainda não existe um método mais preciso ou satisfatório para substituí-los (MICHEL et al., 2010).

Os testes cutâneos utilizando tuberculinas para o diagnóstico de tuberculose podem ser de três tipos. O teste da prega caudal (TPC) é utilizado como prova de triagem, porém, exclusivamente em gado de corte; o teste cervical simples (TCS) é a prova de rotina em gado de leite devido à sua boa sensibilidade; e o teste cervical comparativo (TCC) é a prova confirmatória para animais reagentes ao TPC ou ao

TCS. Todavia, também pode ser empregado como única prova diagnóstica em rebanhos com histórico de reações inespecíficas (BRASIL, 2006).

No TPC a tuberculina bovina é inoculada por via intradérmica na dosagem de 0,1 mL, de seis a 10 cm da base da cauda, na junção das peles pilosa e glabra em quaisquer dos lados, desde que se utilize o mesmo lado para todos os animais do rebanho. A formação de uma pápula no local de aplicação da tuberculina indica que a inoculação foi correta. A leitura do teste é realizada após 72 ± 6 horas da inoculação, comparando-se, por avaliação visual e palpação, a prega inoculada com a prega do lado oposto. Qualquer aumento de espessura na prega inoculada classificará o animal como reagente (BRASIL 2006).

No TCS a inoculação de tuberculina bovina é feita no terço médio da região cervical ou na região da espinha da escápula, a 20 cm da cernelha, a uma distância igual das bordas superior e inferior do pescoço. A região é demarcada por tricotomia, devendo-se evitar local com lesão ou nódulos de parasitos. A espessura da dobra da pele é determinada com o auxílio de cutímetro antes da inoculação, e as medidas são anotadas em formulário específico. A tuberculina PPD bovina é inoculada por via intradérmica na dosagem de 0,1 mL. Após 72 ± 6 horas da inoculação, é realizada nova medida da dobra da pele no local de inoculação da tuberculina bovina. O resultado do teste é obtido subtraindo-se da medida da dobra da pele 72 horas após a inoculação, a medida da dobra da pele tomada no dia da inoculação da tuberculina bovina (ΔB). Os resultados são interpretados de acordo com os critérios definidos no Regulamento Técnico do PNCEBT: se ΔB for de até 1,9 mm o resultado do teste é negativo; se ΔB for de 2,0 a 3,9 mm e o local da inoculação apresentar pouca sensibilidade a dor, consistência endurecida e reação delimitada o resultado pode ser considerado inconclusivo, mas se houver muita dor, consistência macia e presença de exsudato ou necrose o resultado é positivo como também o é se a $\Delta B \geq 4,0$ mm (BRASIL 2006).

No TCC, as tuberculinas são inoculadas por via intradérmica na dosagem de 0,1 mL, sendo o PPD aviário inoculado cranialmente e o PPD bovino caudalmente. A inoculação de tuberculina PPD aviária é feita na junção do terço anterior e do terço médio da região cervical ou à frente da espinha da escápula a 20 cm da cernelha, a uma distância igual das bordas superior e inferior do pescoço. A tuberculina bovina é inoculada na junção do terço médio e terço posterior na região cervical ou atrás da espinha da escápula a 20 cm da cernelha, a uma distância igual das bordas superior

e inferior do pescoço. Deve-se manter uma distância de 15 a 20 cm entre as duas inoculações. Recomenda-se que as inoculações sejam efetuadas de um mesmo lado de todos os animais do estabelecimento de criação. Os locais de inoculação são demarcados por tricotomia. Antes das inoculações, as medidas da espessura das dobras da pele dos locais da inoculação da tuberculina PPD aviária e da tuberculina PPD bovina são determinadas com o auxílio de cutímetro e anotadas em formulário específico. Após 72 ± 6 horas das inoculações, são realizadas novas medidas das dobras da pele. O resultado do teste é obtido subtraindo-se da medida da dobra da pele obtida 72 horas após a inoculação, a medida da dobra da pele tomada no dia da inoculação, tanto para a tuberculina aviária (ΔA) quanto para a tuberculina bovina (ΔB). Em seguida subtrai-se ΔA de ΔB . Os resultados obtidos ($\Delta B - \Delta A$) são interpretados de acordo com os critérios definidos no Regulamento Técnico do PNCEBT: se $\Delta B < 2,0$, $\Delta B < \Delta A$ e $\Delta B > \Delta A$ em até 1,9 mm, o resultado do teste é negativo; se $\Delta B > \Delta A$ em 2,0 a 3,9 mm o resultado do teste é inconclusivo; se $\Delta B > \Delta A$ em 4,0 mm ou mais, o resultado do teste é positivo. Resultados inconclusivos devem ser definidos pela realização de novo TCC após 60 dias, ou, a critério do médico veterinário responsável, o animal pode ser considerado positivo com base nas características epidemiológicas do rebanho analisado (BRASIL 2006).

Vários testes indiretos *in vivo* e *in vitro* para o diagnóstico da infecção por *M. bovis* foram desenvolvidos, tais como a hipersensibilidade com ESAT-6 (POLLOCK et al., 2003), linhagens de macrófagos (RITELLI et al., 2003), aglutinação em látex (KOO et al., 2004), imunoadsorção enzimática - ELISA (DUNN et al., 2005) e detecção de IFN- γ bovino (WOOD et al., 1994). Os testes indiretos são influenciados por fatores biológicos, como a cinética da resposta imune natural induzida pela infecção e reações cruzadas com outros microorganismos que interferem com a especificidade e mensuração da resposta (WALRAVENS et al., 2002; CAGIOLA et al., 2004; GORMLEY et al., 2004).

O diagnóstico histopatológico é complementar ao exame *post-mortem* de carcaças com lesões suspeitas de tuberculose. Sob coloração de Ziehl-Neelsen-Faraco (ZNF) (MENDES LUZ; ZANCHETA NETO, 2002) é uma técnica direta de diagnóstico presuntivo que detecta BAAR. Já sob coloração de hematoxilina-eosina (HE) é uma técnica indireta que detecta granuloma considerado a lesão característica desta doença (CORNER, 1994; CASSIDY et al., 1999).

Testes diretos permitem a detecção do patógeno em amostras clínicas e resultam em diagnóstico mais preciso. O padrão ouro para o diagnóstico da tuberculose é o isolamento da micobactéria em meio de cultivo e a sua identificação. Entretanto, as micobactérias patogênicas crescem lentamente (em até 90 dias, ou mais) sendo que 10% das amostras de *M. bovis* só apresentam colônias visíveis após 60 dias de cultivo (CORRÊA; CORRÊA, 1992). A qualidade do meio de cultura, da descontaminação da amostra e das condições de incubação aliados ao fato de algumas amostras conterem apenas um pequeno número de bacilos vivos também pode comprometer o sucesso do isolamento (ARAÚJO et al., 2005). Além disso, a identificação da espécie por meio de provas bioquímicas é trabalhosa, requer cultura nova, pura e abundante, condição só alcançada após sucessivos repiques a partir do primo isolamento (CORNER, 1994; PINTO et al., 2002; MICHEL et al., 2010).

Diversos ensaios que empregam técnicas de biologia molecular têm sido realizados, tanto para a identificação de micobactérias isoladas em meio de cultura quanto em amostras clínicas (TELENTI et al., 1993; RODRIGUEZ et al., 1995; VITALE et al., 1998).

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) (PCR) consiste em uma metodologia de diagnóstico rápido, pois permite amplificar uma sequência específica do DNA do agente. A qualidade da extração do DNA e a escolha correta dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) a serem empregados são apontadas como pontos críticos para o sucesso da PCR (ABANTO, 2000; ZUMARRAGA et al., 2005). Em teoria, a PCR pode ser usada para qualquer tipo de amostra biológica, entretanto certas amostras podem conter inibidores da PCR que levam a resultado falso negativo (MICHEL et al., 2010).

A eletroforese de DNA em gel de agarose e a disponibilidade de enzimas de restrição, que clivam o DNA em sítios definidos gerando fragmentos de diferentes tamanhos, proporcionaram a análise de fragmentos de DNA bacteriano (MARSHALL et al., 1981). Nesse princípio, Telenti et al. (1993) formularam a técnica denominada PCR-PRA (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Pattern Analysis*). O método baseia-se na variação da sequência de nucleotídeos do locus do gene *hsp65* presente em diferentes espécies de micobactérias. Envolve, inicialmente, a amplificação de um fragmento de 439 pb comum ao gênero *Mycobacterium*, cuja digestão pelas enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* gera fragmentos polimórficos que possibilitam, por meio de chaves de classificação, a diferenciação de espécies.

Diversos estudos visando à identificação de micobactérias diretamente em amostras clínicas ou a partir de culturas têm sido realizados com o uso da PCR em tempo real (*Real Time*), uma técnica que permite a detecção rápida e precisa da micobactéria e proporciona a confirmação do diagnóstico em menor intervalo de tempo (TAYLOR et al., 2001; HARRINGTON et al., 2007; PINSKY et al., 2008; KUMAR et al., 2009). O fator limitante para o uso desse método é o custo, pois necessita equipamento sofisticado de elevado valor financeiro.

Vários métodos de epidemiologia molecular utilizando diferentes marcadores moleculares têm sido propostos para diferenciar espécies dentro do complexo *M. tuberculosis*. Para a obtenção de resultados confiáveis, é necessário considerar as qualidades e limites das técnicas moleculares. No caso das técnicas moleculares de tipagem os critérios mais cruciais que devem ser considerados são polimorfismo e estabilidade dos marcadores (HADDAD et al., 2004).

A análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição - *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) é uma técnica que identifica polimorfismo associado com o padrão dos fragmentos de restrição de múltiplas cópias do fragmento de DNA IS6110 como ocorre no genoma de *M. tuberculosis*, por isso é bastante usada nessa espécie para estudos de epidemiologia molecular (THIERRY et al., 1990). Já a maioria dos isolados de *M. bovis* tem apenas uma cópia desse fragmento (ARANAZ et al., 1996; KAMERBEEK et al., 1997).

Em micobactérias, marcadores moleculares com estrutura de minissatélites – Unidades Repetitivas de Interespaçadores Micobacterianos (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*-MIRU) são compostos de seqüências de 51-77 pb distribuídos em 41 loci ao longo do cromossomo bacteriano. Foram identificadas 12 regiões de MIRU no genoma do complexo *M. tuberculosis* e a associação entre eles leva a 16 milhões de diferentes combinações que permitem não só identificar a espécie de micobactéria, mas também discriminar isolados de *M. bovis* (SUPPLY et al., 2000; Bo-Young, 2008).

A técnica de *Spoligotyping*, abreviação de *Spacer Oligonucleotide Typing*, baseia-se no polimorfismo do locus cromossômico de repetição direta - *Direct Repeat* (DR) do complexo *M. tuberculosis* que contém um número variável de sequencias curtas e idênticas intercaladas por espaçadores representados por sequencias variáveis (não repetitivas). Um único par de *primers* baseado nas duas extremidades da seqüência não variável da DR é usado e permite a amplificação

dos espaçadores (seqüência variável) entre as DR. Assim, a variação nos espaçadores é explorada para obter diferentes padrões de hibridização do DNA amplificado com múltiplos oligonucleotídeos espaçadores sintéticos correspondentes, os quais são covalentemente ligados a uma membrana. O polimorfismo entre dois isolados reside no fato de que um ou mais espaçadores podem ser ausentes/presentes em um isolado, mas não no outro. Assim, a técnica de Spoligotyping possibilita a detecção e tipificação simultânea de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* e é indicada para a diferenciação de estirpes com poucas cópias de IS6110, como ocorre em *M. bovis* (KAMERBEEK et al., 1997; HADDAD et al., 2004).

Embora muito se saiba a respeito da tuberculose, o diagnóstico da doença e a identificação da micobactéria infectante ainda não é uma questão simples. A identificação da espécie é indispensável para o estudo da transmissão da micobactéria entre humanos e animais e representa um papel fundamental no controle e vigilância da tuberculose (MICHEL et al., 2010).

3.2.7 Controle

O controle da tuberculose bovina está baseado no diagnóstico oportuno e na eliminação dos animais afetados, junto com a prevenção da disseminação da infecção tanto dentro como para fora dos rebanhos (MORRISON et al., 2000). O desenvolvimento de novas técnicas para o diagnóstico da infecção nas populações e a aplicação de técnicas de genotipificação para a investigação epidemiológica dos isolados estão entre as principais ferramentas que se projetam como desafios para os programas de controle. As técnicas tradicionais devem ser complementadas com alternativas de maior eficiência, especialmente quando a prevalência da enfermidade é baixa. Neste sentido, têm sido desenvolvidas diversas provas para a detecção da resposta imune contra diferentes antígenos bacterianos, para a detecção de IFN- γ bovino e para a detecção direta do DNA do agente (ABALOS; RETAMAL, 2004).

Assim como no controle da tuberculose humana, as ações veterinárias devem complementar-se com acompanhamento, contenção e vigilância dos animais

expostos em um rebanho (COUSINS, 2001). A investigação de todo granuloma bovino detectado em animais de matadouros é uma ação complementar importante aos programas de controle (CORNER, 1994; COUSINS, 1998), particularmente em regiões onde predomine a pecuária de corte na qual o destino dos bovinos é o abate.

Gonçalves (1998) relata que os planos de combate a tuberculose bovina, de eficácia comprovada em países que realizaram programas de erradicação da doença, consistem exclusivamente em medidas de profilaxia sanitária, pautadas pela detecção de rebanhos infectados a partir da realização da tuberculinização e inspeção de carcaças após o abate, e na proteção dos rebanhos não infectados controlando a introdução de animais.

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde comunitária e de promover a competitividade da pecuária nacional. O PNCEBT definiu uma estratégia de certificação de propriedades livres ou monitoradas onde essas enfermidades são controladas com rigor (BRASIL, 2006).

A estratégia deste programa consiste em um conjunto de medidas sanitárias compulsórias, associadas a ações de adesão voluntária, que dizem respeito à certificação de propriedades livres e de propriedades monitoradas. O setor público atua como agente certificador dentro de um processo que envolve diretamente toda a cadeia produtiva (BRASIL, 2006).

Os procedimentos de certificação de propriedades livres de tuberculose obedecem aos princípios técnicos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), ajustados à realidade dos sistemas de produção brasileiros e às necessidades do PNCEBT. Uma vez terminado o saneamento, a propriedade obtém o certificado de livre ou monitorada de Brucelose e Tuberculose, cuja manutenção depende do cumprimento de todas as regras e normas sanitárias estabelecidas (BRASIL, 2006).

No programa de controle adotado no Brasil, assim como nos demais países, está prevista a confirmação do diagnóstico através de análises bacteriológicas completas nas seguintes situações: confirmação da presença de infecção tuberculosa em bovinos de um país ou região onde não foi comprovada

anteriormente; estudo de animais positivos ao teste tuberculínico, nos quais não se observaram lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose; confirmação da presença de infecção em animais positivos ao teste tuberculínico, com ou sem lesões macroscópicas, de uma propriedade considerada livre ou monitorada para tuberculose; pesquisa de micobactérias em amostras de leite e de outros produtos de origem animal; necropsias de animais com reações inespecíficas, nos quais são encontradas lesões sugestivas de tuberculose (BRASIL, 2006).

3.3 Tuberculose humana causada por *Mycobacterium bovis*

A infecção humana por *M. bovis* foi primeiramente descrita no início do século XX. Estimou-se que tenha sido a causa de 10 a 18% de todos os casos de tuberculose, existindo uma associação entre o número de casos humanos identificados e a prevalência da enfermidade na população bovina local (DABORN et al., 1996; SAURET et al., 1992).

Mycobacterium tuberculosis é o agente mais importante da tuberculose em humanos e responde por mais de 90% dos casos. Porém, *M. bovis* é reportado no mundo todo como sendo o segundo agente causal mais freqüente, responsável por aproximadamente 5% dos casos globais de tuberculose. Nos países industrializados estimou-se que uma proporção que varia de 0,5 a 7,2% de todos os pacientes com tuberculose comprovada bacteriologicamente era devida a *M. bovis* (de LA RUA-DOMENECH, 2006). Entretanto, é nos países em desenvolvimento que a infecção humana por *M. bovis* constitui uma grave ameaça à saúde pública e pode representar 10 a 15% dos novos casos de tuberculose registrados anualmente (COSIVI et al., 1998; ROCHA et al., 2011).

O homem pode se contaminar com *M. bovis* por meio da inalação de gotículas infecciosas eliminadas pela respiração de animais infectados e pela ingestão de leite *in natura* contaminado proveniente de vacas infectadas (THOEN et al., 2006). O consumo de alimentos tais como nata fresca, manteiga, requeijão e queijos brancos produzidos com leite cru também representa risco de infecção (THOEN et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2008). A infecção em humanos ainda

pode ser decorrente do manuseio do leite ou de carcaças provenientes de bovinos tuberculosos assumindo, nesses casos, um caráter ocupacional (CHALMERS et al., 1996; SAURET et al., 1992) .

Em 1992 registrou-se a ocorrência de 8.000 casos anuais de tuberculose humana causada por *M. bovis* na América do Norte, América Latina e Caribe. No mesmo ano *M. bovis* foi implicado em diversos casos de tuberculose humana que variaram de 0,1% na França a 5% no Reino Unido. Nos Estados Unidos, em 1996, 0,1% dos casos de tuberculose humana eram devido a *M. bovis*, mas o índice elevava-se para 3% na fronteira com o México, onde a doença no gado era comum (ABRAHÃO, 1999).

Na América Latina as informações sobre a frequência de tuberculose humana causada por *M. bovis* são limitadas. Especula-se que possam ocorrer mais de 7000 casos de infecção humana por *M. bovis* a cada ano (KANTOR; RITACCO, 2006). Estimativas indicam que do total de casos humanos, 2% da tuberculose pulmonar e 8% da extra pulmonar são atribuídos a *M. bovis*. A falta de dados deve-se ao fato de que muitos laboratórios de saúde pública não empregam em sua rotina técnicas necessárias para identificar em humanos o agente que causa a doença nos bovinos, e os atestados de óbito não registram a tuberculose extra pulmonar encontrada nas autópsias (PAHO, 2001). Em particular, a tuberculose é a principal doença entre os indivíduos imunocomprometidos que são suscetíveis a infecção por *M. tuberculosis* e por *M. bovis* (AYELE et al., 2004).

Na Argentina, em estudo realizado no período de 1982 a 1984, a tuberculose zoonótica em adultos representou 0,36% dos casos diagnosticados por meio do cultivo e era restrita à população de alto risco, tais como trabalhadores rurais ou magarefes (BARRERA; KANTOR, 1986). Já no período de 1984 a 1989, tuberculose zoonótica representou 2,4% a 6,2% do total de casos de tuberculose em humanos, sendo que 64% dos pacientes pertenciam à população de risco (LATINI et al., 1990).

Não existem estimativas da proporção de pacientes com tuberculose causada por *M. bovis* no Brasil, no entanto é importante que o sistema de saúde esteja atento à possibilidade de ocorrência deste agente. Em alguns locais, ele assume o papel de principal agente etiológico causador da doença, apresentando-se de forma idêntica ao *M. tuberculosis*, mas com maior incidência da forma ganglionar e outras extra pulmonares. Sua ocorrência é mais frequente em comunidades que consomem leite e derivados não pasteurizados ou fervidos proveniente de rebanho bovino infectado,

e em pacientes rurais e profissionais (veterinários, ordenhadores, funcionários de matadouros, entre outros). Uma vez confirmada a contaminação humana, os serviços sanitários devem ser informados, para atuar na imediata identificação das fontes de infecção e tomada das medidas de controle adequadas, prevenindo assim a ocorrência de novos casos (BRASIL, 2005).

Pardo et al. (2001) isolaram *M. bovis* do leite *in natura* obtido de vacas com tuberculose; Leite et al. (2003) analisaram amostras de leite provenientes de supermercados do estado de São Paulo e encontraram *M. bovis* em leite *in natura* de vacas sem histórico de tuberculinização. Nesse mesmo estudo, a análise bacteriológica identificou a presença de *M. bovis* em tecidos com lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose obtidas de búfalos, suínos e bovinos provenientes dos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Pará.

A presença de *M. bovis* no leite e nas lesões dos animais demonstra que o homem pode estar exposto a este agente por meio da ingestão de produtos de origem animal contaminados, principalmente o leite, considerando-se que no Brasil cerca de 50% do leite consumido não é pasteurizado (LEITE et al., 2003) e, segundo Belchior (2001), 92,9% dos queijos produzidos nas propriedades rurais analisadas no estado de Minas Gerais são feitos com leite *in natura*. O consumo de carne sem inspeção também constitui um sério risco à população. De acordo com Araújo (2004), 50% da carne consumida no Brasil são provenientes de abate clandestino.

Em países onde programas de erradicação da tuberculose bovina encontram-se avançados como ocorre no Reino Unido, evidências sugerem que poucas pessoas possam ter adquirido a doença dos bovinos na última década. Entretanto, em países em desenvolvimento a propagação da tuberculose de animais a seres humanos, principalmente a partir de leite contaminado, continua a ser um perigo real. Contudo, este perigo parece ser totalmente ignorado (DAVIS, 2006).

A tuberculose humana devido ao *M. bovis* é transmitida dos bovinos ao homem e, ocasionalmente, do homem aos bovinos (COSIVI et al., 1998). Recentemente na Argentina, a identificação de dois casos de infecção humana por *M. bovis* relacionados epidemiologicamente, sugere a transmissão pessoa-a-pessoa de uma cepa multidroga-resistente (MDR) de *M. bovis* (ETCHECHOURY et al., 2009).

Embora a proporção de tuberculose humana por *M. bovis* seja muito menor do que a causada por *M. tuberculosis*, seu potencial impacto sobre os grupos

populacionais de maior risco não deve ser subestimado. O risco de infecção respiratória com *M. bovis* a partir dos bovinos permanece mais alto para fazendeiros, veterinários, trabalhadores rurais e magarefes, enquanto nos países em desenvolvimento a etnicidade, práticas culturais e religiosas bem como fatores socioeconômicos têm sido identificadas como colaboradores para um aumento na ocorrência de infecção humana por *M. bovis* (MICHEL et al., 2010).

O diagnóstico diferencial entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* deve ser prioridade nos programas de controle a fim de otimizar a intervenção veterinária como um meio de reduzir a carga de doenças humanas a partir de fontes animais. Entretanto, muitas das técnicas desenvolvidas para o diagnóstico de tuberculose quase sempre não são adequadas para países em desenvolvimento, pois requerem infra-estrutura laboratorial de última geração e pessoal técnico bem treinado. Ao mesmo tempo em que países em desenvolvimento são mais severamente afetados por ambas, tuberculose humana e animal, muitos dos investimentos feitos no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico podem não contribuir grandemente para o controle e vigilância da doença nas áreas mais afetadas (MICHEL et al., 2010).

Um dos principais desafios futuros para o controle da tuberculose humana é determinar a real contribuição de *M. bovis* na prevalência dessa enfermidade.

4 ARTIGOS

4.1 Contribution of slaughter surveillance for bovine tuberculosis control in Mato Grosso do Sul state, Brazil

Contribution of slaughter surveillance for bovine tuberculosis control in Mato Grosso do Sul state, Brazil

Klaudia Santos Gonçalves Jorge^{1/+}, Ana Luiza Alves Rosa Osório², Alexandre Dobbins Azambuja¹, Flávio Ribeiro de Araújo³, Adolfo Carlos Barreto Santos⁴, Clarice Queico Fujimura Leite⁴, Rivaldo Venâncio da Cunha¹

¹Mato Grosso do Sul Federal University, UFMS, 79070-900 Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil

²Embrapa Pantanal, Corumbá, State of Mato Grosso do Sul, Brazil

³Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil

⁴São Paulo State University, UNESP, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, State of São Paulo, Brazil

ABSTRACT

To assess the contribution of slaughter surveillance in the detection of lesions suggestive of tuberculosis for retrospective epidemiological study of outbreaks, from one bovine with tuberculosis like-lesion detected, we examined 200 others bovines that have had contact with it before. The chosen methods were single intradermal comparative tuberculin test (SICTT), slaughter and macroscopic examination, microbiological culture, acid fast bacilli (AFB) and molecular identification. Twenty four bovines were SICTT positive or inconclusive and were taken to sanitary slaughter. All tuberculosis suggestive lesions were cultured in Stonebrink medium. AFB colonies were submitted to the PCR assay using the JB21/JB22 primer set. All

+Corresponding author tel +55 67 3345-3531; fax +55 67 3345-3600.
E-mail address: klaudia.jorge@ufms.br

samples culture and AFB positive were identifying like *Mycobacterium bovis*.
 Conclusions: The retrospective epidemiological investigation started by one tuberculosis detection of a single lesion during slaughter inspection routine allowed the identification of one tuberculosis infection focus in Mato Grosso do Sul State, Brazil.

Key words: Slaughter surveillance; *Mycobacterium bovis*; Bovine tuberculosis; Chain reaction polymerase; Epidemiology.

INTRODUCTION

Animal tuberculosis is a disease of high economic relevance within the context of livestock farming as it directly affects animal productivity and also influences international trades of animal products. Moreover, animal tuberculosis bears a zoonotic potential and is therefore of public health concern (Michel et al. 2010).

Tuberculosis in animals is primarily known from cases in cattle and others bovids for which the disease is generally referred to as bovine tuberculosis. The major causative agent of bovine tuberculosis is *Mycobacterium bovis*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex of strains which includes seven species – *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* and *Mycobacterium pinnipeddi* – and cause tuberculosis in humans and animals (Niemann et al. 2000; Smith et al. 2006).

The host range of *M. bovis* is broad and includes various domestic animals and humans. *Mycobacterium bovis* infections have also been detected in wildlife and can

have severe consequences for the ecosystem (Cousins et al. 2003). Bovine tuberculosis is one of the most important zoonosis in the Region of the Americas. The presence of this disease in livestock is a constraint to the production and marketing of cattle. Moreover, as a risk to public health, its importance is even greater. About 70% of the cattle bred in Latin America are held in areas with high disease prevalence and nearly 17% in areas virtually free from tuberculosis. Brazil as well as Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, Peru and Guyana are South American countries that belonging to the group classified with a relatively high prevalence (higher than 1%) or no information of tuberculosis (Kantor and Ritacco 2006).

The basis of effective tuberculosis control in cattle included the removal of tuberculin reactors and suspect cattle, disinfection of premises and the implementation of sound hygienic practices, followed by a periodic review of herd disease status using the tuberculin test and meat plant surveillance (Collins 2006).

The Brazilian program of bovine tuberculosis control was only instituted in 2001 and the technical regulation was approved in 2004 (Brasil 2001; Brasil 2004). This program does not require the examination of all suspicious lesions of tuberculosis detected by inspection of slaughter and either a retrospective epidemiological study of these cases with the location of affected herds.

Slaughter surveillance has been an important component of bovine tuberculosis control and eradication program in countries where the prevalence of disease is low (Collins 2006). Epidemiological investigation would be initiated following identification of meat lesions of infected animals at slaughter by inspection service in order to find and to control the focus of the infection. Given the huge number of slaughtered daily, epidemiological surveillance based on ante mortem and postmortem inspection in

slaughterhouses provides hard information that offer essential comparative advantages (PAHO 2001; Kaneene et al. 2006).

The nature of the association between the meat plant inspectorate and the agency responsible for the control and eradication of the tuberculosis at herd level needs to be re-assessed, if the full contribution of meat plant surveillance to the eradication of tuberculosis in cattle is to be achieved. Moreover, this infection has health implications for the consumer and is also an occupational hazard for the meat plant employee and for other personnel who frequently are in direct contact with livestock. It is important to focus also on the contribution which efficient meat inspection, coupled with real-time data retrieval, and supported by advanced diagnostic bacteriology including DNA-based strain typing, can make to the eradication of this zoonotic disease (Collins 2006).

To assess the contribution of health surveillance in the detection of lesions suggestive of tuberculosis in cattle slaughtered for retrospective epidemiological study of outbreaks of infection, we examined herds of cattle of Mato Grosso do Sul State, Midwest, Brazil, through single intradermal comparative tuberculin test (SICTT) (Brasil 2004), slaughter and macroscopic examination of cattle SICTT positive or inconclusive, microbiological culture and polymerase chain reaction (PCR) identification of isolates.

MATERIALS AND METHODS

Twenty four from a total of 200 Holstein crossbred dairy cattle from three different herds of farms located in Caarapó, Mato Grosso do Sul, Midwest, Brazil, with positive or inconclusive SICTT were taken to sanitary slaughter. These herds were examined

because a tuberculosis like-lesion has been previously detected there at slaughterhouse by abattoir surveillance service in one bovine that belonged to one of these herds. Animals from this herd were bought by the two other herds examined. Bovines were all apparently healthy, with good body conditions. Most of them were lactating female over 36 months of age. There was only one male positive SICTT of the same age.

During sanitary slaughter were examined head, thorax, abdomen and carcass region organs. All lymph nodes and organs specimens with suggestive lesions for tuberculosis were collected and maintained in individual sterile bags at 4 °C for transport to the laboratory until further analysis. Samples were composed of the parotid lymph node, sublingual lymph node, retropharyngeal lymph node, tracheobronchial lymph node, esophageal lymph node, mediastinal lymph node, apical lymph node, mesenteric lymph node, hepatic lymph node, prescapular lymph node, subiliac lymph node, lung and liver.

One pathological sample from each bovine, preferably retropharyngeal lymph node and lung, was decontaminated by Petroff method (Kantor 1979) and culturing in Stonebrink medium, incubated at 37 °C, and examined for presence of micobacteria growth weekly, during 90 days. Colonies positive for acid fast bacilli (AFB) by Ziehl-Neelsen (ZN) staining were submitted to the PCR for specie identification.

The mycobacterial DNA was extracted by heat shock according to Mazars et al. (2001) with some modifications. Acid fast bacilli were suspended in 200 µl of TE buffer (pH 8.0) and followed by three times boiling (100 °C)/freezing (-20 °C) proceeding for about 10 minutes each. The PCR with primers Jb21 (5'-TCGTCCGCTGATGCAAGTGC-3') e Jb22 (5'-CGTCCGCTGACCTCAAGAAG -3') (Rodriguez et al. 1995) for identification of *Mycobacterium bovis* amplified products

of 500 bp. The positive control was *M. bovis* AN5 and negative control was pure water. Ladder of 100 bp and 50 bp were used like molecular weight markers.

Analysis of the amplified products was performed by electrophoresis in 1.0% agarose gel stained with 0,5 µg/mL of ethidium bromide in horizontal vat (HORIZON™ 11 – 14). The gel was photographed and analysed by Alpha Imager system (Alpha Innotech™).

RESULTS

The role of health surveillance at slaughter to identify a single bovine tuberculosis lesion during routine abattoir surveillance was essential in initiating a retrospective epidemiological investigation and identifies the location of an outbreak of tuberculosis. 200 bovines by three herds were been examined by SICTT. These, 23 (11.5%) were positive and only one bovine (0.5%) was inconclusive in this test.

Among the 24 bovines with positive or inconclusive response to SICTT submitted to sanitary slaughter, all presented tuberculosis like-lesions distributed by the head, thoracic, abdominal and carcass region organs (Table). Bovines showed at least one (01) until five (05) lesions on slaughter. From 24 bovines were collected 55 visible tuberculosis lesions. The majority of lesions were concentrated in the thoracic region (23/55, 41.42%) followed by head region (20/55, 36.36%), abdominal region (09/55, 16.36%), and carcass region (03/55, 5.45%).

Higher frequency of lesions were at retropharyngeal lymph node (14/55, 25.45%) followed by lung (13/55, 23.64%), mediastinal lymph node (06/55, 10.91%), hepatic lymph node (04/55, 7.27%) and liver (04/55, 7.27%), parotid lymph node (03/55, 5.45%), sublingual lymph node (02/55, 3.64%), esophageal lymph node (02/55,

3.64%), tracheobronchial lymph node (02/55, 3.64%) and prescapular lymph node (02/55, 3.64%), apical lymph node (01/55, 1.82%), mesenteric lymph node (01/55, 1.82%) and subiliac lymph node (01/55, 1.82%). The culture of lesions samples showed colonies growth on Stonebrink medium between 15 and 62 days (Table 1).

Table 1 Single Intradermal Comparative Tuberculin Test (SICTT), lesions distributions and days for recovery *Mycobacterium bovis* in culture from herds of Caarapó, Mato Grosso do Sul, Brazil

Bovine	SICTT	Lesions samples collected by region				Growth time (days)
		Thoracic	Head	Abdominal	Carcass	
01	+	lung	...	...	...	62
02	+	lung, mediastinal In	retropharyngeal In	...	...	15
03	+	lung, tracheobronchial In	retropharyngeal In	mediastinal In	...	62
04	Inc	lung, mediastinal In	retropharyngeal In	liver and hepatic In	...	62
05	+	apical, mediastinal and esophageal In	...	liver and hepatic In	...	44
06	+	...	retropharyngeal In	...	...	44
07	+	...	retropharyngeal In	...	...	44
08	+	...	retropharyngeal and parotid In	...	...	53
09	+	lung,, mediastinal In	...	liver and hepatic In	...	48
10	+	lung, esophageal In	retropharyngeal In	...	...	54
11	+	...	retropharyngeal, sublingual and parotid In	...	prescapular In	50
12	+	lung	...	...	...	50
13	+	lung	retropharyngeal In	...	...	50
14	+	lung	...	...	...	36
15	+	...	retropharyngeal In	...	...	54
16	+	lung	retropharyngeal In	...	...	53
17	+	lung, mediastinal In	retropharyngeal In	...	...	41
18	+	lung	retropharyngeal and sublingual In	...	...	45
19	+	lung, mediastinal In	...	...	...	45
20	+	...	retropharyngeal In	...	...	45
21	+	...	...	...	subiliac In	45
22	+	...	...	...	prescapular In	25
23	+	...	...	liver and hepatic In	...	58
24	+	tracheobronchial In	parotid In	...	...	57

In: lymph node; inc: inconclusive

All isolates were confirmed by ZN staining as being AFB. The PCR with primers JB21/JB22 amplified a DNA fragment of 500 bp that features *M. bovis* in all of micobacterial isolates (Fig.1).

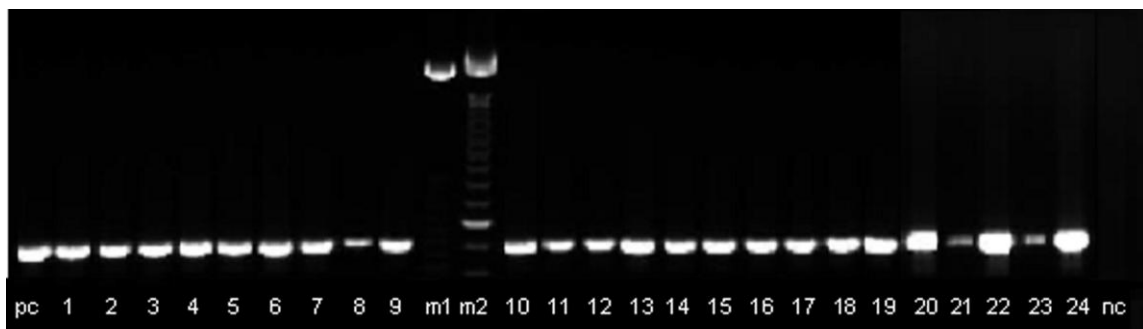


Fig.1 Amplification of 500 bp fragments of DNA from cultures samples by polymerase chain reaction. Lanes - pc: positive control *M. bovis* AN5; 1-24: culture samples; m1: molecular weight (50 bp); m2: molecular weight (100 bp); nc: negative control without DNA

DISCUSSION

Abattoir surveillance has been an important component of bovine tuberculosis control in many countries of the world, mainly where the prevalence of this infection is low. Slaughter inspection can provide a retrospective epidemiological investigation from tuberculosis like-lesions found during meat inspection of infected bovines at slaughter.

United States of America starts the bovine tuberculosis eradication program in 1917. From the 1950s, when area test was becoming an inefficient method to detect bovine

tuberculosis when the prevalence was low, the focus of bovine tuberculosis control moved to slaughter inspection (Kaneene et al. 2006).

The control of *M. bovis* infection in New Zealand has been achieved by applying a multi-faceted science-based program. Between them, all breakdowns detected via testing or slaughterhouse inspection are investigated and movements are traced back (Ryan et al. 2006).

According Kantor and Ritacco (2006), official inspection is currently in vigour in 22 Latin American and Caribbean countries. In Cuba, where bovine tuberculosis has been almost eradicated, a random sampling is performed for surveillance whenever no visible lesions are observed at veterinary inspection. In Argentina, between 1977 and 1981, the specificity of slaughterhouse inspection increased from 58% to 85% (Kantor et al. 1981; Latini et al. 1997; Kantor and Ritacco 2006). In Brazil, isolated works have been demonstrated that abattoir surveillance is a suitable tool to study bovine tuberculosis (Schenk and Schenk 1982; Jorge 2001; Pinto et al. 2002; Leite et al. 2003; Araújo et al. 2005; Nassar et al. 2007; Cardoso et al. 2009). In this work the detection of a single bovine tuberculosis lesion initiated a retrospective epidemiological investigation to identify the source of the infected animal and 200 bovines by three herds were examined by SICTT. These, 23 (11.5%) were positive and only one bovine (0.5%) was inconclusive in this test. Amazingly, this doubtful bovine showed five suggestive tuberculosis lesions on slaughter, the largest number of lesions found in a single animal. All the others bovines showed at least one slaughter lesion. Although animal with inconclusive response to SICTT could be retested after 60 days, the ability of field veterinarian on assess the epidemiological situation must be recognized.

Differently, in Northern Ireland, associated with the increased number of tuberculin skin reactors has been the significant reduction in the proportion of reactor cattle with lesions detected at slaughter, from a 12-year annual rate of 43% to 32% in the last few years. It is unclear at this stage if this is a function of disease prevalence, imperfect specificity, the nature of the organism (selection against more strains likely to cause lesions), abattoir inspection, test interference or in the tuberculin itself. Nevertheless, this finding is important in the bovine tuberculosis scheme as the presence of lesions is used in risk assessments, with non-lesioned outbreaks being regarded as lower risk (Abernethy et al. 2006). Tuberculous lesions continued to be observed in cattle in slaughterhouses during the course of veterinary-meat inspection in Central European states, even after control of bovine tuberculosis in cattle and other animals has been achieved (Pavlik et al. 2006).

After analyze organs from four body region, the largest concentration of suggestive tuberculosis lesions in our research was at thoracic region (67.27%). According to Corner (1994) 85.4% of the lesions are in this region. Others authors tend to collect lung and lymph nodes but do not specify which lymph nodes (Pinto et al. 2002, Leite et al. 2003; Araújo et al. 2005; Cardoso et al. 2009). One sample from each animal was taken for culture because we found only one visible lesion in 09/24 (37.5%) bovines examined. We preferably picked retropharyngeal lymph-nodes and lung up because these were the organs with the highest incidence of lesions.

Between 70% and 90% of lesions are found in either the lymph nodes of the head or in the thoracic cavity (Corner 1994). The predominant distribution of tuberculous lesions in the respiratory tract and associated lymph nodes of naturally infected cattle led researchers to infer that infection occurred following inhalation of bacteria (Cassidy 2006). Evidences that the aerosol route was the key portal of entry was

provided by experimental infections in calves (Collins and Grange 1983). More recent experimental work in cattle confirms the respiratory tract as the primary site of infection as both direct inoculation and 'in-contact' infection result in lesions largely confined to this location (Cassidy 2006). Careful examination post-mortem of lymph nodes and of the lungs is an important component of national tuberculosis eradication programme, as well as being an integral part of the veterinary meat inspection and hygiene programme (Collins 2006).

To obtain the best results from bacteriological examination of specimens, they must be presented to the laboratory in the best possible condition (Corner 1994). Previous works done by our team resulted in low recovery of mycobacteria: 28.9% (Jorge 2001), 23.6% (Araújo et al. 2005). In the present study, mycobacteria were isolated in 100% of the samples. We attribute our success in recovery of colonies growing to the good conditions of lesions samples collection, careful decontamination procedures and rapid implementation of cultivation. Samples were cleaned during the collection and immediately chilled for up to 48 hours before being cultured. According to Corner (1994), in addition to freezing, other factors that diminish the success of primary isolation of *M. bovis* from clinical samples are culture medium, the decontamination procedure and incubation conditions.

In this study, the higher frequency of the first appearance of recognizable colonies on Stonebrink medium occurred between 41 and 50 days. Already Corner (1994) found 36 days on average when working with 491 samples of bovine tuberculin reactors.

For identification of microorganisms at the species level, molecular methods are now extensively used for diagnosis and control of infectious diseases. This approach is fast, sensitive, and of high specificity (Kidane et al. 2002). Different molecular techniques have been proposed to rapidly identify and differentiate *M. bovis*, even

directly in biological samples (Sechi et al. 2000). The PCR assay proposed by Rodriguez et al. (1995, 1999) is a simple and accurate method to identify and differentiate *M. bovis*. In the present study, all isolated micobactéria were characterized as *M. bovis* by PCR analysis. Similarly, Cardoso et al. (2009) reported that the same PCR assay identified all of the 17 culture positive isolates as *M. bovis*. Rogriguez et al. (1999) when working with 121 isolates obtained from different geographic regions of Latin America found 100% of positivity with the primer pair JB21 and JB22. Previously, Rodriguez et al. (1995) had an amplified 500 bp fragment from 15 strains including *M. bovis* and BCG Pasteur. Already Sechi et al. (2000), using the same pair of primer showed that 13.3% (4/30) strains could not be identified. However, these strains were confirmed as belonging to the *M. tuberculosis* complex by PCR and Restriction Enzyme Analysis (PRA) (Telenti et al. 1993) of hsp65 and they were identified as *M. bovis* by biochemical methods. This indicates that not all strains of *M. bovis* contain the 500 bp fragment in its DNA. The absence of the fragment of 500 bp in the DNA of some strains of *M. bovis* also explained the result found by Araújo et al. (2005) that obtained 76.4% (13/17) of identification of *M. bovis* from culture positive isolates. From four strains (23.6%) that lacked the 500 bp, PRA identified two as *M. tuberculosis* complex and two as nontuberculous micobactéria.

The primer pair JB21 and JB22 also has been used to differentiate *M. bovis* and *M. tuberculosis* from human samples. In a study with 46 samples of sputum identified as *M. tuberculosis* complex from patients with clinical diagnosis of tuberculosis in Mexico, the PCR with the primer pair JB21 and JB22 reveled one of them was *M. bovis* (Vázquez-Murrafo et al. 2008). In another study conducted in Ethiopia with 40 patients with tuberculous lymphadenitis, JB21 and JB22 primer set was effective in

distinguishing between *M. tuberculosis* and *M. bovis* in five samples that exhibited coamplification when the PCR system for the *pncA* genes was used and in confirm the six cases that had been positive for the *M. bovis pncA* gene (Kidane et al. 2002). The strategy to initiate the molecular identification of 24 isolates obtained in this study using a pair of primers specific for *M. bovis* strain was chosen based on the positive result of SICTT, slaughter inspection, acid fast analysis, isolation of micobactéria and mainly due to the epidemiological context.

Mycobacterium bovis strains have a wide host range, infecting wild and domesticated mammals as well as man, while natural infection with *M. tuberculosis* appears restricted to humans (Hewinson et al. 2006). It is important to focus also on the contribution which efficient meat inspection, coupled with real-time data retrieval, and supported by advanced diagnostic bacteriology including DNA-based strain typing, can make to the eradication of this zoonotic disease (Collins 2006).

From our data we can conclude that all positive or inconclusive SICTT bovines were infected with *M. bovis* as evidenced by presence of macroscopic lesions, positive cultures and PCR based analysis. In addition, the detection of a single bovine tuberculosis lesion during routine slaughter inspection initiated a retrospective epidemiological investigation which allowed identification of tuberculosis infection focus in Mato Grosso do Sul, Brazil.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank to Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) for financial support (41/100.271/2006).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest

REFERENCES

Abernethy D.A., Denny G.O., Menzies, F.D., McGuckian, P., Honhold N., Roberts, A.R., 2006. The Northern Ireland programme for the control and eradication of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, 112, 231-237.

Araújo C.P., Leite C.Q.F., Prince K.A., Jorge K.S.G., Osório A.L.A.R. 2005. *Mycobacterium bovis* identification by molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 749-752.

Brasil, 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose, Instrução Normativa 2/2001.

Brasil, 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose, Instrução Normativa Secretaria de Defesa Agropecuária 6/2004.

Cardoso, M.A., Cardoso, R.F., Hirata, R.D.C., Hirata, M.H., Leite, C.Q.F., Santos, A.C.B, Siqueir, V.L.D, Okano, W., Rocha, N.S., Lonardoni, M.V., 2009. Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. Zoonoses and Public Health 56, 465-470.

Cassidy, J.P., 2006. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. Veterinary Microbiology, 112, 151-161.

Collins, J.D., 2006. Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. Veterinary Microbiology, 112, 369-381.

Collins, C.H., Grange, J.M., 1983. A review, the bovine tubercle bacillus. Journal of Applied Bacteriology, 55, 13 – 29.

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

Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodríguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alito, A., Zumarraga, M., Bernardelli, A., 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 1305-1314.

Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Smith, N.H., Gordon, S.V., 2006. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: A feeling for the organism. *Veterinary Microbiology*, 112, 127-139.

Jorge, K.S.G., 2001. Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. MSc Thesis, UFMS, Campo Grande, MS, 73 pp.

Kaneene, J.B., Miller, R.A., Meyer, R.M., 2006. Abattoir surveillance: The U.S. experience. *Veterinary Microbiology*, 112, 273-282.

Kantor, I.N., 1979. Bacteriología de la tuberculosis humana y animal, OPAS/OMS. Nota técnica 11, 63 pp.

Kantor, I.N., de la Veja, E., Caballero, P., Pinanez, D., 1981. Estudio de organos bovinos decomisados por tuberculosis em mataderos Del Gran Buenos Aires. *Rev. Argentinian Medicine Veterinary*, 62, 282-286.

Kantor, I.N., Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology*, 112, 111-118.

Kidane, D., Olobo, J.O., Habte, A., Negesse Y., Aseffa, A., Abate, G., Yassin, M.A. 2002. Identification of the causative organism of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4230-4234.

Latini, O. Canal, A. M., Ferrara, M.V., Siqueira, M.D., Bagnaroli, R., Torres, P., 1997. Confiabilidad em la determinación de prevalência de infección por *Mycobacterium bovis* em ganado bovino por decomisos em frigoríficos. Archivos de Medicina Veterinaria, 29, 197-204.

Leite, C.Q.F., Anno, I.S., Leite, R.S.A., Roxo, E., Morlock, G.L., Cooksey, R.C., 2003. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98, 319-323.

Mazars E., Lesjean S., Banuls A.L., Gilbert M., Vincent V., Tibayrenc B.M., Locht C., Supply P., 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proceedings National Academy of Science of United States of America, 98 (04), 1901-1906.

Michel, A.L., Müller, B., Van Helden, P.D., 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? Veterinary Microbiology, 140, 371-381.

Nassar, A.F.C., Miyashiro, S., Oliveira, C.G., Pacheco, W.A, Ogata, R.A., 2007. Isolation and identification of bovine tuberculosis in a Brazilian herd (São Paulo). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 102, 639-642.

Niemann, S., Richter, E., Rutsch-Gerdes, S. 2000. Differentiation among Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Molecular and Biochemical Features: Evidence for Two Pyrazinamide-Susceptible Subtypes of *M. bovis*. Journal of Clinical Microbiology, 38, 152-157.

Pan American Health Organization (PAHO/WHO), 2001. Proceedings of the Inter American Meeting at the Ministerial Level on Health and Agriculture. Working Document RIMSA 12/15, São Paulo, Brazil, May 2001. Accessed July 2010. Available from: <http://www.paho.org/English/ad/dpc/vp/rimsa12index-e-htm>.

Pavlik, I., 2006. The experience of new European Union Member States concerning the control of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 112, 221-230.

Pinto, P.S.A., Faria, J.E., Vitoria, M.I.V., Bevilacqua, P.D., 2002. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção *post-mortem* de bovinos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 3, 10-15.

Rodriguez, J.G., Mejia, G.A., Del Portillo, P., Patarroyo, M.E., Murillo, L.A., 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology*, 141, 2131-2138.

Rodriguez, J.G., Fissanoti, J.C., Del Portillo, P., Patarroyo, M.E., Romano, M.I., Cataldi, A., 1999. Amplification of a 500-base-pair fragment from cultures isolates of *Mycobacterium bovis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37, 2330-2332.

Ryan, T.J, Livingstone, P.G., Ramsey, D.S.L., Lisle, G.W., Nugent, G., Collins, D.M., Buddle, B.M., 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: The experience from New Zealand. *Veterinary Microbiology*, 112, 211-219.

Sechi, L.A., Dupre, I., Leori, G., Fadda, G., Zanetti, S., 2000. Distribution of a specific 500-base-pair fragment in *Mycobacterium bovis* isolates from Sardinian cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3837-3839.

Shenk, M.A.M., Shenk, J.A.P., 1982. Prevalência de tuberculose, cisticercose e hidatidose em bovinos abatidos nos matadouros-frigoríficos no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (1974/1979). *A Hora Veterinária*, 1, 28-31.

Smith, N.H., Gordon, S.V., De la Rua-Domenech, R., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G., 2006. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature*, 4, 670-681.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E.C., Bodmer, T., 1993. Rapid Identification of *Mycobacteria* to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 175-178.

Vázquez-Marrufo, G., Marín-Hernández, D., Zavala-Páramo, M.G., Vázquez-Narvaez, G., Álvarez-Aguilar, C., Vázquez-Garcidueñas, M.S., 2008. Genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexican patients. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 610-618.

4.2 Detecção de *Mycobacterium bovis* no leite *in natura* de vacas positivas na tuberculinização

Detecção de *Mycobacterium bovis* no leite *in natura* de vacas positivas na tuberculinização

Mycobacterium bovis* no leite *in natura

Detection of *Mycobacterium bovis* in raw milk of positive tuberculin cows

Klaudia Santos Gonçalves Jorge^I, Ana Luiza Alves Rosa Osório^{II}, Alexandre Dobbins Azambuja^{III}, Flávio Ribeiro de Araújo^{IV}, Adolfo Carlos Barreto Santos^V, Clarice Queico Fujimura Leite^V, Rivaldo Venâncio da Cunha^{VI}

^IPrograma de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Campo Grande-MS, Brasil

^{II}Embrapa Pantanal. Corumbá-MS, Brasil

^{III}Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Campo Grande-MS, Brasil

^{IV}Embrapa Gado de Corte. Campo Grande-MS, Brasil

^VFaculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de São Paulo (UNESP). Araraquara-SP, Brasil

^{VI} Departamento de Medicina Interna. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Campo Grande-MS, Brasil

Autor para correspondência

Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge

e-mail: klaudia.jorge@ufms.br

Rua Padre João Crippa 1390 apto 152 - Centro

79002390 Campo Grande-MS

Telefone: 67 33821518 Fax: 67 3324 3600

Suporte financeiro: Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) - Bolsa doutorado no MS - Processo N. 41/100.271/2006.

RESUMO

OBJETIVO: Isolar e identificar *Mycobacterium bovis* no leite de vacas em lactação oriundas de rebanho com diagnóstico clínico de tuberculose.

MÉTODOS: Amostras de leite de 27 vacas com diagnóstico de tuberculose por meio do teste cervical comparativo (TCC), provenientes de rebanho de Caarapó - Mato Grosso do Sul, foram cultivadas em meio de Stonebrink e incubados a 37°C por até 90 dias. As colônias com característica de micobactérias foram corados pela técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) e identificadas pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) empregando dois pares de oligonucleotídeos: TB11/TB12 (gênero específico) e JB21/JB22 (espécie específico).

RESULTADOS: Das 27 amostras de leite, submetidas ao cultivo, 12 foram positivas para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) sendo todos confirmados como de *Mycobacterium* spp pelos oligonucleotídeos TB11/TB12 e destes, quatro eram de *Mycobacterium bovis*, detectados pela presença de produto de amplificação gerado pelo emprego dos oligonucleotídeos JB21/JB22.

CONCLUSÃO: A presença de *M. bovis* e de outras micobactérias no leite *in natura* de vacas de rebanhos leiteiros com diagnóstico clínico de tuberculose bovina oferece risco ao consumo humano não só pela possibilidade de contrair tuberculose zoonótica, assim como de outras micobacterioses.

DESCRIPTORIOS: Tuberculose. Micobacteriose. Zoonose. Diagnóstico. *Mycobacterium bovis*. Leite. Saúde Pública.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Isolate and identify *Mycobacterium bovis* in the milk of lactating cows coming from herds with clinical diagnosis of tuberculosis.

METHODS: Samples from 27 cows diagnosed with tuberculosis by the single intradermal comparative tuberculin test (SICTT) from herd of Caarapó - Mato Grosso do Sul, were grown in Stonebrink and incubated at 37 °C for 90 days. Colonies with the characteristic of mycobacteria were stained by Ziehl-Neelsen (ZN) technique and identified by polymerase chain reaction (PCR) using two pairs of primers: TB11/TB12 (genus-specific) and JB21/JB22 (species-specific).

RESULTS: Of the 27 samples of milk subjected to cultivation, 12 were positive for acid-fast bacilli (AFB) and were all confirmed as *Mycobacterium* spp by TB11/TB12 oligonucleotides. Four of these were identified as *Mycobacterium bovis* by the presence of amplification product generated by use of oligonucleotides JB21/JB22.

CONCLUSIONS: Raw milk of cows from dairy herd with clinical diagnosis of tuberculosis offers risk for human consumption, not only due to the possibility of contracting zoonotic tuberculosis, but also because of other pathogenic mycobacteria.

DESCRIPTORS: Tuberculosis. Mycobacteria. Zoonosis. Diagnosis. *Mycobacterium bovis*. Milk. Public Health.

INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis é o agente etiológico da tuberculose bovina, uma das zoonoses de maior relevância no mundo, afetando também a uma ampla variedade de animais selvagens, os animais domésticos e o homem. A doença representa uma grande barreira comercial relacionada com os animais de produção, causando perdas significativas para a pecuária mundial, além do risco para a saúde pública.¹⁶

No Brasil não existem dados atualizados de prevalência da enfermidade em estudos com planejamento amostral. Entre 1989 e 1998, os dados de notificações oficiais indicavam prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados.² Um levantamento realizado em 1999 em Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou a prevalência aparente de animais infectados em 0,8%. Em rebanhos, a prevalência variou de 5% a 15%. O mesmo estudo revelou que 92,9% dos queijos produzido nas propriedades rurais analisadas eram feitos com leite *in natura*.³

Apesar da maioria das infecções de tuberculose em humanos ser causada por *Mycobacterium tuberculosis*, 5-10% dos casos podem ser devido a *M. bovis*.²³ A prevalência de tuberculose humana causada por *M. bovis* é desconhecida devido à complexidade e ao elevado custo para a diferenciação entre as espécies micobacterianas. Entretanto, sabe-se que *M. bovis* está amplamente distribuído e seu potencial zoonótico é particularmente importante em áreas severamente

² Brasil. Instrução Normativa 6/2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose. 2006.

³ Belchior APC 2001. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais. [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

afetadas pela pandemia de HIV, e onde o controle efetivo da tuberculose por meio da pasteurização do leite e abate de animais infectados não é aplicado.³

Mycobacterium bovis tem sido associado com tuberculose extra pulmonar em crianças, usualmente decorrente do consumo de leite *in natura*.²⁰ Uma revisão sobre tuberculose em crianças que vivem ao longo da fronteira Estados Unidos/México revelou que um terço de todas as culturas positivas para micobactérias era de *M. bovis*.⁵

Animais silvestres, animais domésticos de produção ou de companhia e alimentos de origem animal representam ameaça à saúde humana.⁶ O consumo de leite não pasteurizado e carne incorretamente tratada pelo calor, e o contato com animais infectados são as principais fontes de infecção com *M. bovis* para humanos.³

O objetivo desse estudo foi detectar presença de *M. bovis* no leite de vacas em lactação oriundas de um rebanho com diagnóstico clínico de tuberculose por meio do Teste Cervical Comparativo (TCC).

MÉTODOS

O estudo foi realizado com vacas leiteiras holandesas aparentemente saudáveis, de aproximadamente 36 meses de idade provenientes de um rebanho com diagnóstico clínico de tuberculose por meio do TCC. O rebanho pertencia a uma propriedade rural no município de Caarapó, Mato Grosso do Sul, Brasil, cuja exploração leiteira era a principal atividade econômica.

Foram tomadas amostras de leite provenientes de 27 vacas em lactação positivas no TCC. As amostras de leite foram tratadas com solução de lauril sulfato de sódio (LSS) 3% e hidróxido de sódio (NaOH) 1%⁹ e cultivadas em meio de Stonebrink. As

culturas foram incubadas em estufa a 37 °C por até 90 dias e avaliadas semanalmente quanto ao surgimento de colônias bacterianas. Colônias com morfologia de micobactérias foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) e analisadas microscopicamente quanto à presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

A extração de DNA dos BAAR isolados foi realizada pela técnica de termólise.¹⁴ Os DNA obtidos foram submetidos a duas reações de polimerase em cadeia (PCR). Para confirmação do gênero *Mycobacterium* spp foi empregado o par de oligonucleotídeos iniciadores Tb11 (ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (CTTGTCGAACCGCATACCCT), sendo considerado resultado positivo a presença de um produto de amplificação de 439 pares de bases (pb) do gene *hsp65*.²¹ A espécie *M. bovis* foi confirmada pela segunda PCR com os oligonucleotídios Jb21 (5'-TCGTCCGCTGATGCAAGTGC-3') e Jb22 (5'-CGTCCGCTGACCTCAAGAAG-3') e visualização de fragmento de 500 pb.¹⁹ A cepa padrão *M. bovis* AN5 foi usada como controle positivo. A análise dos produtos amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% em cuba horizontal (HORIZON[®]11–14), marcador molecular de 100 pb, e os produtos de amplificação foram fotodocumentados em sistema Alpha Imager (Alpha Innotech[®]).²¹

DNA de bactérias que apresentaram produto de amplificação de 439 pb para o par de oligonucleotídio TB11/TB12 e de 500 pb para o par JB21/JB22 foram considerados respectivamente positivos para gênero *Mycobacterium* spp e para espécie *M. bovis*.

RESULTADOS

Das 27 amostras de leite, provenientes de 27 vacas com TCC positivo, submetidas ao cultivo, em 12 (44,4%) amostras foram identificadas colônias disgonicas e de crescimento lento, características de micobactérias. Submetidas a coloração de Ziehl-Nelseen, todas as colônias apresentaram características tintoriais de BAAR. Pela PCR empregando os oligonucleotídeos TB11/TB12, todas as 12 amostras foram confirmados como do gênero *Mycobacterium* spp pela presença do produto de amplificação de 439 pb. Dentre os 12 isolados de micobactérias, quatro (33,3%) eram da espécie *Mycobacterium bovis*, detectados pela presença de produtos de amplificação de 500 pb, gerados por PCR com o emprego dos oligonucleotídeos JB21/JB22 (figura).

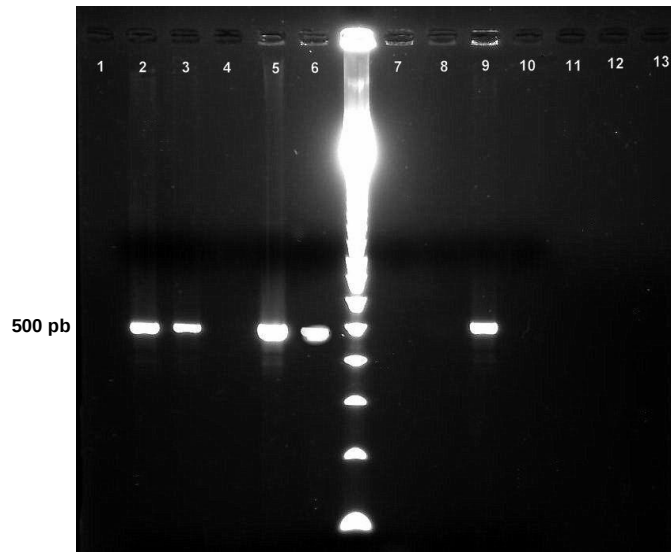


Figura. Amplificação de fragmento de 500 pb de DNA de culturas de leite por PCR com oligonucleotídeos JB21/JB22. Colunas - 1-5 e 7-13: culturas de leite; 6: controle positivo *M. bovis* AN5. Marcador molecular 100 pb.

DISCUSSÃO

Assim como descrito para o estado de São Paulo,¹³ o isolamento de *M. bovis* a partir do leite de vacas holandesas oriundas de rebanho com diagnóstico clínico de tuberculose sustenta a premissa de que, no Mato Grosso do Sul, o leite pode ser uma fonte de transmissão de *M. bovis* dentro do rebanho, para outros animais domésticos e para o homem.

Neste estudo, o percentual de 44,4% de recuperação de micobactérias e de 33,3% de *M. bovis* em amostras de leite, é consistente se comparado ao estudo realizado na Índia onde foi verificado percentual de recuperação de 35,1% do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.²⁰ Pardo et al¹⁸ (2001) realizando estudo em condições mais favoráveis, pela colheita e cultivo de amostras de leite por 15 vezes do mesmo animal, obtiveram 36,54% de positividade.

Poucos trabalhos relatam a frequência da excreção de *M. bovis* no leite, sendo que apenas 1% das vacas infectadas elimina o bacilo de forma intermitente por essa via.⁸ Pardo et al¹⁸ (2001) demonstraram que o padrão de eliminação de micobactérias no leite em 15 dias de coletas sucessivas teve a mesma característica irregular. *Mycobacterium bovis* não se multiplica no leite, ou o faz lentamente, mas sabe-se que grande quantidade de bactérias é eliminada diretamente da glândula mamária infectada para o leite.¹²

Embora a relação entre infecção tuberculosa e eliminação de *M. bovis* no leite seja desconhecida, a doença é significativamente mais prevalente e a severidade das lesões encontradas ao abate é maior nos bovinos de raças de exploração leiteira como a holandesa, do que nos zebus ou nos mestiços, mesmo sob condições idênticas de criação.²

Neste estudo, *M. bovis* foi identificado em 33,3% das vacas com diagnóstico de tuberculose por TCC. Em leites *in natura* de vacas sem avaliação previa pelo TCC, no Brasil, Leite et al¹³ (2003) obtiveram baixa taxa de positividade de 4,3%. Assim, os resultados aqui apresentados evidenciam a importância do TCC no diagnóstico clínico de tuberculose, confirmados pelo achado de *M. bovis* em 33,3% de leite *in natura*. Provavelmente se fosse efetuado maior número de coletas do mesmo animal, taxa superior de positividade teria sido encontrada. Por outro lado, na Índia Srivastava et al²⁰ (2008) verificaram que 15% de leite *in natura* provenientes de vacas cujo diagnóstico por TCC era desconhecido, estavam contaminados com *M. bovis*. Esta porcentagem de positividade, talvez possa ser justificada pela alta incidência de tuberculose bovina no gado indiano.

Uma vez que o leite de vacas infectadas é paucibacilar¹⁶, os bacilos da tuberculose bovina são de crescimento lento,²² e a identificação do *M. bovis* dependente de

provas bioquímicas é morosa e com resultados muitas vezes duvidoso, são então propostas técnicas moleculares. Neste trabalho, portanto, a identificação de *M. bovis* em 33,3% das amostras analisadas pode ter sido facilitada pela utilização de duas técnicas de PCR.

Acredita-se que a tuberculose animal represente um risco remoto para saúde pública em países desenvolvidos devido à introdução da pasteurização do leite e de programas de controle efetivos.⁶ Entretanto, essa tendência em subestimar a habilidade de *M. bovis* em causar tuberculose ou em supor que ela tenha sido totalmente eliminada, pode ter implicações diretas no controle da doença em animais domésticos.¹

Em países em desenvolvimento a propagação de tuberculose de animais a seres humanos, principalmente a partir de leite contaminado e subprodutos, é um perigo real.⁶ Sabe-se que países onde a tuberculose bovina ainda não está controlada também apresentam maiores índices de tuberculose zoonótica. Adicionalmente, medidas como o cozimento da carne e principalmente a fervura ou pasteurização do leite não são práticas consagradas na maioria desses países.^{17,4} Bacilos viáveis também podem ser encontrados no iogurte e nos queijos cremosos por até 14 dias, e na manteiga por até 100 dias após a preparação.¹¹ Essas podem ser situações de risco vivenciadas pelo Brasil, onde o programa de controle foi adotado recentemente.⁴

Diversos estudos relatam casos de tuberculose extra pulmonar, particularmente linfadenite tuberculosa, em humanos envolvendo além de *M. tuberculosis*, *M. bovis* como agente causal.^{10,17}

⁴ Brasil. Instrução Normativa 2/2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose. 2001.

Estudo realizado em Uganda detectou 7% de isolamento de *M. bovis* a partir de biópsia de linfonodos de humanos com linfadenite cervical. Os padrões de *spoligotype* dos isolados haviam sido previamente detectados em bovinos de Uganda e confirmou a infecção humana com a micobactéria zoonótica em área onde o consumo de carne e leite crus é rotina.¹⁷

Na Etiópia Kidane et al¹⁰ (2002) demonstraram que 17,1% dos casos de linfadenite tuberculosa em humanos eram devidos a *M. bovis*. Por outro lado, estudo semelhante realizado no mesmo país não identificou *M. bovis* em nenhuma das 107 amostras positivas para complexo *M. tuberculosis*.⁴ A discordância entre esses resultados pode estar relacionada à procedência urbana ou rural, e à proporção de indivíduos HIV - positivos em cada estudo.^{4,15}

Nos países industrializados a tuberculose humana causada por *M. bovis* é rara devido a décadas de controle da doença nos bovinos e à pasteurização do leite. Entretanto, o consumo de produtos lácteos provenientes de países cujo controle da tuberculose bovina ainda não foi alcançado pode ser responsável por tuberculose zoonótica. Em Nova York, EUA, onde a população mexicana triplicou no período de 1990 e 2000, 1% dos casos de tuberculose humana, confirmados por cultura entre os anos de 2001 a 2004, apresentaram padrão de *spoligotype* de *M. bovis*. Nenhum dos pacientes entrevistados (66%) apresentou evidências que pudessem sugerir infecção por aerossol ou pessoa-a-pessoa. Entretanto, mais da metade deles (78%) reportaram desconhecer se os produtos lácteos que consumiam eram pasteurizados e a maioria (83%) relatou ter consumido queijos produzidos no México. Além disso, as lesões desses pacientes com tuberculose zoonótica eram extra pulmonares (60%), pulmonares (26%) ou ambas (14%). A maioria dos pacientes (57%) era nascida no México ou filhos de mexicanos (29%).²⁵

Não existem métodos laboratoriais validados que permitam a certificação do leite e seus produtos não tratados pelo calor, como livres de *M. bovis* viáveis.⁷ Em vista disso, um dos preceitos válidos em todo o mundo para a prevenção e controle da tuberculose zoonótica é manter e reforçar a política de pasteurização ou fervura do leite e produtos lácteos,²⁴ além de estabelecer programas efetivos de controle da tuberculose no rebanho.

Conclui-se que o leite *in natura* de vacas de rebanho com diagnóstico clínico de tuberculose bovina oferece risco ao consumo humano não só pela possibilidade de contrair tuberculose zoonótica, assim como de outras micobacterioses devido a presença de outras espécies de micobactérias nos leites amostrados.

REFERÊNCIAS

1. Amanfu W. The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. *Tuberculosis*. 2006;86:330-335.
DOI:10.1016/j.tube.2006.01.007
2. Ameni G, Aseffa A, Engers H, Young D, Gordon S, Hewinson G, et al. High Prevalence and Increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to Zebu breeds under field cattle husbandry in Central Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(10):1356-1361.
DOI:10.1128/CVI.00205-07
3. Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat in Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8:924-937.

4. Beyene D, Bergval I, Hailu E, Ashenafi S, Yamuah L, Aseffa A, et al. Identification and genotyping of the etiological agent of tuberculous in Ethiopia. *Infect Dev Ctries*. 2009;3(6):412-419.
5. Dankner WM, Davis CE. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics*. 2000;105(6):e79. DOI:10.1542/peds.105.6.e79
6. Davies PDO. Tuberculosis in humans and animals: are we a threat to each other? *J R Soc Med*. 2006;99:539-540.
7. 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*. 2006;86:77-109.
DOI:10.1016/j.tube.2005.05.002
8. Grange JM, Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol*. 1994;40:137-151.
9. Kantor IN 1979. Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal. OPAS/OMS. Nota técnica 11, 63 pp.
10. Kidane D, Olobo JO, Habte A, Negesse Y, Aseffa A, Abate G, et al. Identification of the Causative Organism of Tuberculous Lymphadenitis in Ethiopia by PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):4230-4234.
11. Kleeberg HH. Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health. *Rev Sci Tech*. 1984;3:11-32.
12. Lake R, Hudson A, Cressey P. Risk profile: *Mycobacterium bovis* in milk. Christchurch: Institute of Environmental, Science and Research Ltd. 2002.

13. Leite CQF, Anno IS, Leite RSA, Roxo E, Morlock GL, Cooksey RC. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:319-323.
14. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Tibayrenc BM, Locht C, Supply P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(04):1901-1906.
15. Ndukum JA, Kudi AC, Bradley G, Ane-Anyangwe IN, Fon-Tebug S, Tchoumboue J. Prevalence of Bovine Tuberculosis in Abattoirs of the Littoral and Western Highland Regions of Cameroon: A Cause for Public Health Concern. *Vet Med International*. 2010;2010:1-8. DOI:10.4061/2010/495015.
16. OIE – World Organization for Animal Health. Chapter 2,4,7 Bovine Tuberculosis. Manual for Diagnosis Techniques for Livestock Diseases. Version adoptede by the World Assembly of Delegates of the OIE. 2009;1-15.
17. Oloya J, Opuda-Asibo J, Kazwala R, Demelash AB, Skjerve E, Lund A, et al. Mycobacteria causing human cervical lymphadenitis in pastoral communities in the Karamoja region of Uganda. *Epidemiol Infect*. 2008; 136:636-643. DOI:10.1017/S0950268807009004.
18. Pardo RB, Langoni H, Mendonça LJP, Chi KD. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2001;38(6):284-287.
19. Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology*. 1995;141:2131-2138.

20. Srivastava K, Chauhan DS, Gupta P, Singh HB, Sharma VD, Yadav VS, et al. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India - Possible relevance in human health. *Indian J Med Res.* 2008;128:26-31.
21. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:175-178.
22. Thoen C, LoBue P, Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol.* 2006;112:339-345. DOI:10.1016/j.vetmic.2005.11.047.
23. Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle BM. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect.* 2002;4:471-80.
24. WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report. WHO/HTM/TB/2004.331. Geneva. 2004:145–146.
25. Winters A, Driver C, Macaraig M, Clark C, Munsiff SS, Pichardo C, et al. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* - New York City, 2001-2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2005;54:605-608.

5 DISCUSSÃO

A pesquisa voltada para o conhecimento da tuberculose bovina justifica-se tradicionalmente por tratar-se de uma doença infecto-contagiosa de caráter zoonótico que apresenta risco a saúde pública e impõe limitações ao comércio internacional de bovinos e seus subprodutos, além de diminuir a produtividade dos animais afetados.

Mycobacterium bovis é a micobactéria do complexo *M. tuberculosis* que apresenta a mais ampla gama de hospedeiros entre os animais domésticos e silvestres. Também infecta o homem. Alguns hospedeiros comportam-se como reservatórios e outros são ocasionais e contribuem para que a infecção se propague (SMITH et al., 2006).

Diversas técnicas de epidemiologia molecular de micobactérias têm sido propostas e todas apresentam qualidades, mas também limitações. O sucesso do diagnóstico depende da escolha da técnica mais apropriada, e essa deve levar em conta o polimorfismo e a estabilidade dos marcadores moleculares envolvidos (HADDAD et al., 2004).

Embora muito se saiba a respeito da tuberculose, o diagnóstico da doença e a identificação da micobactéria infectante ainda não é uma questão simples. A identificação da espécie é indispensável para o estudo da transmissão da micobactéria entre humanos e animais e representa um papel fundamental no controle e vigilância da tuberculose (MICHEL et al., 2010).

Os dados disponíveis a respeito da importância da tuberculose humana causada por *M. bovis* são incompletos e dispersos. Isto se deve a falta de definição da espécie de micobactéria envolvida na infecção como ocorre na maioria dos países, especialmente naqueles em desenvolvimento (ROCHA et al., 2011).

A contribuição da tuberculose zoonótica para o índice global de tuberculose humana deve ser tratada com responsabilidade como um problema de urgência. Assim, um dos principais desafios para o controle da tuberculose humana é determinar a real participação de *M. bovis* na prevalência e incidência dessa infecção. As principais explicações para a ausência de estimativas precisas sobre a contribuição de *M. bovis* para a prevalência global de tuberculose são, em primeiro lugar, a impossibilidade de distinguir entre tuberculose causada por *M. tuberculosis*

ou por *M. bovis* em nível clínico ou radiológico. Segundo, a maioria dos laboratórios usa o meio de cultura Lowenstein-Jensen que contém glicerol, o qual dificulta o crescimento de *M. bovis*. Além disso, cultivo é sempre uma opção cara para muitos países pobres, comparado à coloração de ZN que é mais rápida e mais barata. Terceiro, e talvez o mais importante, na maioria dos casos o tratamento da tuberculose causada por *M. tuberculosis* ou *M. bovis* era o mesmo, portanto, não houve interesse clínico na diferenciação entre os agentes causadores da enfermidade (CATALDI; ROMANO, 2007). Entretanto, atualmente a tipagem de micobactérias tem implicações nas decisões terapêuticas da tuberculose, uma enfermidade com incidência mundial e emergência global de estirpes resistentes a fármacos anti-tuberculose, e nas intervenções mais saudáveis na saúde pública (ALLIX-BÉGUEC et al., 2010; ROCHA et al., 2010).

Entre os produtos provenientes de bovinos consumidos no Brasil, aproximadamente 50% do leite são *in natura* (LEITE et al., 2003), 50% da carne são provenientes de abates clandestinos (ARAÚJO et al., 2005) e 92,9% dos queijos produzido nas propriedades rurais analisadas por Belchior (2001) no estado de Minas Gerais são feitos com leite *in natura*.

Em nosso estudo foi possível identificar *M. bovis* tanto nos tecidos quanto no leite de bovinos. *Mycobacterium bovis* foi isolado a partir de lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose detectadas durante abate sanitário de todos os bovinos positivos no TCC. Em relação ao leite, 12/27 amostras coletadas de vacas positivas no TCC continham micobactérias sendo quatro da espécie *M. bovis*. A presença de *M. bovis* nos tecidos de bovinos e no leite de vacas com diagnóstico clínico de tuberculose significa risco de infecção humana, tanto pela vias inalatória e cutânea quanto por via digestiva, e constitui sério problema de saúde pública. A fervura/pasteurização do leite e produtos lácteos, bem como o adequado cozimento da carne para o consumo humano é indispensável, para evitar a transmissão por via digestiva de *M. bovis* e outras micobactérias patogênicas, e para intensificar a prevenção e controle da tuberculose zoonótica.

Estudos preliminares revelaram que *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* pode estar presente em 03/08 amostras de leite cujas micobactérias não foram identificadas como *M. bovis* (dados não mostrados). Estudos complementares serão desenvolvidos para a confirmação dessa hipótese.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* é o agente etiológico da paratuberculose ou doença de Johne em ruminantes (DRIEMEIER et al., 1999), a qual também tem sido isolada de tecido de pacientes com doença de Crohn (BIET et al., 2005; CARVALHO et al., 2009). No Brasil a paratuberculose é rara, embora já tenha sido diagnosticada por meio de teste sorológico (FERREIRA et al., 2001) e de isolamento bacteriano (RISTOW et al., 2007). Recentemente, Carvalho et al. (2009) detectaram *M. avium* subsp. *paratuberculosis* no leite de vacas em Minas Gerais.

6 CONCLUSÕES

- a. *Mycobacterium bovis* está presente no Mato Grosso do Sul e pode ser encontrado tanto nos tecidos de bovinos durante a inspeção de abate quanto no leite de vacas oriundas de rebanho com diagnóstico clínico de tuberculose;
- b. A detecção de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos durante a inspeção sanitária de abate permite rastrear o foco da infecção e contribuir para o estudo epidemiológico retrospectivo dessa enfermidade;
- c. Exames bacteriológicos e moleculares das lesões sugestivas de tuberculose e de leite proveniente de vacas oriundas de rebanho com diagnóstico clínico dessa enfermidade permitem confirmar a infecção com *M. bovis* por meio de isolamento do agente e identificação molecular;
- d. Outras micobactérias patogênicas que infectam bovinos, como *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, podem estar presentes nos rebanhos de Mato Grosso do Sul e podem ser encontradas no leite de vacas oriundas de rebanhos com diagnóstico clínico de tuberculose;
- e. O exame bacteriológico e molecular do leite proveniente de vacas oriundas de rebanho com diagnóstico clínico de tuberculose pode identificar não só *M. bovis*, mas também *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, patogênica para bovinos, responsável por causar paratuberculose ou doença de Johne.

7 PERSPECTIVAS

- a. Ampliar a amostragem de lesões sugestivas de tuberculose obtidas durante a inspeção sanitária de abate de bovinos em matadouros-frigoríficos de Mato Grosso do Sul, para estudos bacteriológicos e moleculares;
- b. Rastrear novos focos de tuberculose por meio do estudo retrospectivo de rebanhos a partir das lesões detectadas ao abate;
- c. Ampliar a amostragem de leite obtido de vacas em lactação oriundas de rebanhos suspeitos de tuberculose em Mato Grosso do Sul, para estudos bacteriológicos e moleculares;
- d. Realizar novos estudos bacteriológicos e moleculares para confirmar a presença de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e outras micobactérias nos tecidos e no leite de bovinos de rebanhos suspeitos de tuberculose;
- e. Em conjunto com o Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), examinar amostras biológicas humanas com suspeita de tuberculose por meio do cultivo em meio de cultura de Stonebrink, ideal para o isolamento de *M. bovis*, com o objetivo de diagnosticar tuberculose zoonótica;
- f. Fomentar a introdução do meio de cultura de Stonebrink na rotina laboratorial para o diagnóstico de tuberculose humana com o objetivo de conhecer a contribuição de *M. bovis* na prevalência dessa enfermidade no Mato Grosso do Sul.

g. Discriminar os espoligotipos dos isolados micobacterianos por meio das técnicas de Spoligotyping (*Spacer Oligonucleotide Typing*) e Unidades Repetitivas de Interespaçadores Micobacterianos (*mycobacterial interspersed repetitive unit* (MIRU)).

REFERÊNCIAS

Abalos P, Retamal P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev sci tech Off int Epiz. 2004; 23(2):583-594.

Abanto SMH, Hirata MH, Hirata RDC, Mamizuka EM, Schmal M, Hoshino-Shimizu S. Evaluation of henes-PCR assay for *Mycobacterium* detection in different clinical specimens from patients with or without tuberculosis-associated HIV infection. J Clin Lab Anal. 2000; 14:238-245.

Abernethy DA, Denny GO, Menzies FD, McGuckian P, Honhold N, Roberts AR. The Northern Ireland programme for the control and eradication of *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol. 2006; 112:231-237.

Abrahão RMCM. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. Arch Vet Scienc. 1999; 4(1):5-15.

Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Parte I: Bacteriosis – Tuberculosis zoonótica. Organization Mundial de la Salud. 1986; 2º edicion: 174–185.

Alfinito JW, Oliveira FR. Estudo Epidemiológico da Tuberculose Bovina na Ilha de Marajó. In: Anais do 20º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Cuiabá. Sociedade Matogrossense de Medicina Veterinária. 1986. p. 216-217.

ALLIX-BÉGUEC C, HUBANS C, FERREIRA S, SUPPLY P. New, easy-to-use tools for standardised and quality-controlled genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Rev Port Pneumo. 2010; XVI:285-289.

Andrade GB, Riet-Correa F, Mielke PV, Méndez MC, Schild AL. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares á tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. Pesq Vet Bras. 1991; 11 (3-4):81-86.

Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden JDA, Cousins D. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strain from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1996; 34:2734-2740.

Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, Blazquez J, Baquero F, Mateos A, Suarez G, Dominguez L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49:1263–1273.

Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53: 1785-1789.

Araújo CP. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cultura e sua identificação pela reação da polimerase em cadeia. [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2004.

Araújo CP, Leite CQF, Prince KA, Jorge KDG, Osório ALAR. *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. 2005; 100(7):749-752.

Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int J Tuberc Lung Dis. 2004; 8(8):924–37.

Baptista F, Moreira EC, Santos WLM, Naveda LAB. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais Arq Bras Med Vet Zootec. 2004; 56:577-580.

Barrera L. The Basis of Clinical Bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. Tuberculosis Textbook.com. 2007. p. 93-112. Disponível em :
<http://www.tuberculosistextbook.com/tuberculosis2007.pdf>

Barrera L, Kantor IN. Possibilities of the immunoenzyme assay (ELISA) in the diagnosis of tuberculosis. Medicina (Buenos Aires). 1986; 46(5):636-638.

Belchior APC 2001. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais. [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Bernhagen J, Bacher M, Calandra T, Metz CN, Doty SB, Donnelly T, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. J Exp Med. 1996; 183:277–282.

Biet F, Boschirolu ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet Res. 2005; 36:411-436.

Bloch H, Segal W. Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and in vitro. J Bacteriol. 1956; 72: 132-41.

Brasil. Instrução Normativa 2/2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose. 2001.

Brasil. Instrução Normativa 6/2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose. 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 6ª edição: 816 p.2005.

Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas- Coordenação de Agropecuária. Produção da Pecuária Municipal; 2010 [atualizada em: 24 de novembro de 2010; acesso em: 29 de novembro de 2010]. Disponível em:
<http://www1.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/0000000222.pdf>

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, van Soolingen D, Cole ST. A new

evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS. 2002; 99 (6):3684-3689.

Brow C. Emerging zoonosis and pathogens of public health significance – an overview. Rev sci tech Off int Epiz 2004; 23(2):435-442.

Caffrey JP. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. Vet Microbiol. 1994; 40 (1-2):1-4.

Cagiola M, Feliziani F, Severi G, Pasquali P, Rutili D. Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11:952-956.

Carvalho IA, Silva A Jr, Campos VE, Moreira MA. Short communication: detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis by polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. J Dairy Sci. 2009; 92(11):5408-10.

Cassidy JP, Bryson D G, Pollock J M, Evans R T, Forster F, Neill SD. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis* - inoculated Calves. J Comp Path. 1999; 121:321–337.

Cataldi A, Romano MI. Tuberculosis caused by Other Members of the *M. tuberculosis* Complex. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. Tuberculosis Textbook.com. 2007. p. 283-314. Disponível em : <http://www.tuberculosisistextbook.com/tuberculosis2007.pdf>

Chalmers, JWT, Jamieson AF, Rafferty P. An outbreak of bovine tuberculosis in two herds in south west Scotland: veterinary and human public health response. J Public Health Med. 1996; 18:54-8.

Corner LA. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet Microbiol. 1994; 40:53-63.

Corner LA. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. Vet Microbiol. 2006; 112:303-312.

Corrêa WM, Corrêa CNM. Tuberculose. In: Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2º edição. Edit Médica e Científica; 1992. 317-337.

Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fukujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HFAK, Kantor I, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis. 1998; 4:59-70.

Cousins D, Williams S, Liébana E, Aranaz A, Bunschoten A, van Embden J, Ellis T. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigation of bovine tuberculosis. J clin Microbiol. 1998; 36:168-178.

Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. In: Infecciones micobacterianas em animales domésticos y salvajes. EJB Manning & MT Collins Edit. Rev sci tech Off int Epiz. 2001; 20(1):71-85.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodríguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53: 1305-1314.

Daborn CJ, Grange JM, Kazwala RR. The bovine tuberculosis cycle: an African perspective. *J Appl Bacteriol*. 1996; 81(Suppl.):27S-32S.

Davies PDO. Tuberculosis in humans and animals: are we a threat to each other? *J R Soc Med*. 2006; 99:539–540.

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*. 2006; 86:77-109.

Driemeier D, Cruz CEF, Gomes MJ, Corbellini PG, Loretto AP, Colodel EM. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras*. 1999; 19:109-115.

Dunn JR, Kaneene JB, Grooms DL, Bolin SR, Bolin CA, Bruning-Fann CS. Effects of positive results for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon-gamma assay for tuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 2005; 226:429-435.

Essey MA, Koller MA. Status of bovine tuberculosis in North America. *Vet Microbiol*. 1994; 40 (1-2):15-22.

Etchechoury I, Echeverría Valencia G, Morcillo N, Sequeira MD, Imperiale B, López M, Caimi K, Zumárraga MJ, Cataldi A, Romano, MI. Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates in Argentina: First Description of a Person-to-Person Transmission Case. *Zoonoses Public Health*. 2009; 57:375-381.

Ferreira R, Fonseca LS, Lilenbaum W. Detection of anti-*Mycobacterium paratuberculosis* antibodies in herds from Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Vet Med*. 2001; 23:166–171.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Microbiology*. 2003; 100(13):7877-7882.

Gonçalves VSP. Programa de controle e erradicação da tuberculose bovina. In: Lage AP. Atualização em tuberculose bovina. Belo Horizonte: FEPMVZ; 1998. p.53-60.

Gormley E, Collins JD. The development of wildlife control strategies for eradication of tuberculosis in cattle in Ireland. *Tubercle and Lung Disease*. 2000; 80 (4-5):229-236.

Gormley E, Doyle MB, McGill K, Costello E, Good M, Collins JD. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 28:413-20.

Griffin JF, Buchan GS. Aetiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. *Vet Microbiol*. 1994; 40 (1-2):193-205.

Gutierrez M, Tellechea J, Garcia Marin JF. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. Vet Microbiol. 1998; 62 (4):281-290.

Haddad N, Masselot M, Durand B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. 2004; 76:1-18.

Harrington NP, Surujballi OP, Waters WR, Prescott JF. Development and Evaluation of a Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Quantification of Gamma Interferon mRNA To Diagnose Tuberculosis in Multiple Animal Species. 2007; 14 (12):1563-1571.

Jorge KSG. Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil [Dissertação] Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2001.

Jorge KSG, Almeida RFC, Soares CO, Araújo FR, Madruga CR, Osório ALA. Tuberculose bovina: epidemiologia e controle. In: Almeida RFC, Soares CO, Araújo FR. Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; 2004. p:45-59.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. J Clin Microbiol 35(4):907-914.

Kaneene JB, Miller RA, Meyer RM. Abattoir surveillance: The U.S. experience. Vet Microbiol. 2006; 112:273-282.

Kantor IN, Ritacco V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet Microbiol.* 1994; 40 (1-2): 5-14.

KantorIN, Ritacco V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol.* 2006; 112:111–118.

Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech.* 2001; 53(4):241-5.

Koo HC, Park YH, Ahn J, Waters WR, Hamilton MJ, Barrington G, Mosaad AA, Palmer MV, Shin S, Davis WC. New latex bead agglutination assay for differential diagnosis of cattle infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11:1070-1074.

Kumar P, Nath K, Rath B, Sen MK, Vishalakshi P, Chauhan DS, Katoch SS, Tyagi S, Sreenivas V, Prasad H. Visual format for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* in clinical Samples Using Molecular Beacons. *J Mol Diag.* 2009; 11 (5):430-438.

Latini MDS, Latini OA, Lopez ML, Cecconi JO. Tuberculosis bovina en seres humanos. *Ver Argent Torax.* 1990; 51:13-16.

Leite CQF, Anno IS, Leite RSA, Roxo E, Morlock GL, Cooksey RC. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98:319-323.

Leite CQF, Souza CWO, Leite SRA. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93:801-805.

Lutze-Wallace C, Turcotte C. Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis in Canada for calendar year 2005. *Can Vet J*. 2005; 47:871-873.

Marshall RB, Wilton BE, Robinson AJ. Identification of leptospira serovars by restriction endonuclease analysis. *J Medical Microbiol*. 1981; 14:163-166.

McIlroy SG, Neill SD, McCracken RM. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet Rec*. 1986; 118 (26):718-721.

Mendes Luz MA, Zancheta Neto D. Histoquímica e imunohistoquímica. Sociedade Brasileira de Histotécnicos. São José do Rio Preto-SP. 2002.

Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J*. 2000 160 (2):92-106.

Michel AL, Bengis RG, Keet DF, Hofmeyr M, Klerk LM, Cross PC, Jolles AE, Cooper D, Whyte IJ, Buss P, Godfroid J. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: Implications and challenges. *Vet Microbiol*. 2006; 112:91–100.
Michel AL, Muller B, van Helden PD. *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? *Vet Microbiol*. 2010; 140:371-378.

Monaghan M, Doherty ML, Collins D, Kazda JD, Quinn PJ. The tuberculin test. *Vet Microbiol.* 1994; 40:111-124.

Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol.* 1994; 40 (1-2):153-177.

Morrison WI, Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA, Gettynby G, McInerney JP, Woodroffe R. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Vet Rec.* 2000; 146:236-242.

Mota PMPC, Lobato FCF, Assis RA, Lage AP, Parreiras PM. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001; 53(4): 1-3.

Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol.* 1994; 40 (1-2):41-52.

Neill SD, Skuce RA, Pollock JM. Review Tuberculosis – new light from an old window. *J Appl Microbiol.* 2005; 98:1261-1269.

Neyrolles O, Hernandez-Pando R, Pietri-Rouxel F, Fornes P, Tailleux L, et al. Is Adipose Tissue a Place for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence? *PLoS ONE* 2006; 1(1): e43.

Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (1):152-157.

Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (Approved Lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52:433-436.

Nolan A, Wilesmith JW. Tuberculosis in badgers (*Meles meles*). Vet Microbiol. 1994; 40(1-2):179-191.

Oliveira PR, Reis DO, Ribeiro SCA, Coelho HE, Lúcio WF, Barbosa FC, Silva PL. Prevalência da tuberculose em carcaças e vísceras de bovinos abatidos em Uberlândia. Arq Bras Med Vet Zootec. 1986; 38:965-971.

Olmstead AL, Rhode PW. An impossible undertaking: the eradication of bovine tuberculosis in the United States. The Journal of Economy History. 2004; 64 (3):01-39.

OIE – World Organization for Animal Health. Bovine Tuberculosis; 2005 [last updated: July 2009; accessed november 2010]. Available at: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf.

Pan American Health Organization (PAHO/WHO). Proceedings of the Inter American Meeting at the Ministerial Level on Health and Agriculture. Working Document RIMSA 12/15, São Paulo, Brazil, May 2001; [acesso 28 de Julho de 2010]. Disponível em: <http://www.paho.org/English/ad/dpc/vp/rimsa12index-e-htm>.

Pardo RB, Langoni H, Mendonça LJP, Chi KD. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. Braz J Vet Res Anim Sci. 2001;38(6):284-287.

Pinto PSA, Faria JE, Viloria MIV, Bevilacqua PD. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. Rev Bras Saúde Prod Anim. 2002; 3 (1):10-15.

Pollock JM, McNair J, Bassett H, Cassidy JP, Costello E, Aggerbeck H, Rosenkrands I, Andersen P. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. J Clin Microbiol. 2003; 41: 1856-1860.

Pollock JM, Neill SD. Review *Mycobacterium bovis* infection and Tuberculosis in Cattle. The Vet J. 2002; 163:115-127.

Prinsk BA, Banaei N. Multiplex Real-Time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. J Clin Microbiol. 2008; 46 (7):2241-2246.

Pritchard DG. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. J Comp Pathol. 1988; 99 (4):357-399.

Reviriego Gordejo, FJ, Vermeersch, JP. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. Vet. Microbiol. 2006;112:101–109.

Riccetti RV. Investigação epidemiológica sobre as zoonoses de maior constatação em matadouros. II. Bovinos. Rev Fac Med Vet Zootec da Universidade de São Paulo. 1989; 26:61-38.

Ristow P, Marassi CD, Rodrigues ABF, Oelemann WMb, Rocha F, Santos AS O, Carvalho ECQ, Carvalho CB, Ferreira R, Fonseca LS, Lilenbaum W. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. *The Vet J.* 2007; 174:432–434.

Ritelli M, Amadori M, Tagliabue S, Pacciarini ML. Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples. *Vet Microbiol.* 2003; 94:105-120.

Rocha A, Elias AR, Sobral LF, Soares DF, Santos AC, Marsico AG et al. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. *Tuberculosis.* 2011; 91(1):14-21.

Rodriguez JG, Mejia GA, Del Protillo P, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 1995; 141:2131-2138.

Roxo E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. *Revista de Ciências Farmacêuticas.* 1997; 18:101-108.

Sauret J, Jolis R, Ausina V, Castro E, Cornudella R. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tuber Lung Dis.* 1992; 73:388-91.

Schenk MAM, Schenck JAP. Prevalência de tuberculose, cisticercose e hidatidose em bovinos abatidos nos matadouros frigoríficos do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (1974/1979). *A Hora Veterinária.* 1982; 1(5):28-31.

Smith NH, Gordon SV, de La Rua-Domenech R, Clifton-Hadley RS, Hewinson G. Bottleneck and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. Nature. 2006; 4:670-681.

Srivastava K, Chauhan DS, Gupta P, Singh HB, Sharma VD, Yadav VS, Sreekumaran, Thakral SS, Dharamdheeran JS, Nigam P, Prasad HK, Katoch VM. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India - Possible relevance in human health. Indian J Med Res. 2008; 128:26-31.

Supply P, Mazara E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol; 36:762-771.

Taylor MJ, Hughes MS, Skuce RA, Neill SD. Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Clinical Specimens Using Real-Time Fluorescence and luorescence Resonance Energy Transfer Probe Rapid-Cycle PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39 (4):1272-1278.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993; 31:175-178.

Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Lévy-Frébaut V, Nguyen S, Guedson JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. J Clin Microbiol. 1990; 28 (12):2668-2673.

Thoen C, LoBue P, Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet Microbiol. 2006; 112:339-345.

Tweddle NE, Livingstone P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. Vet Microbiol. 1994; 40 (1-2):23-39.

Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. J Clin Microbiol. 1998; 36(4):1050-1055.

Walravens K, Marché S, Rosseels V, Wellemans V, Boelaert F, Huygen K, Godfroid J. IFN- γ diagnostic test in the context of bovine micobacterial infections in Belgium. Vet Immunol Immunopathol. 2002; 87:401–406.

Wood PR, Rothel JS. In vitro imunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. Vet Microbiol. 1994; 40:125-135.

Zumarraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, Abdala A, Tarabla H, Romano MI, Cataldi A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. J Vet Diagn Invest. 2005;17:232-238.