

RENATA GOMES REVORÊDO

**Identificação do *M. bovis* em amostras sorológicas pela PCR em rebanhos
de bovinos leiteiros de Pernambuco.**

RECIFE, 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

Renata Gomes Revorêdo

Identificação do *M. bovis* em amostras sorológicas pela PCR em rebanhos de bovinos leiteiros de Pernambuco.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

RECIFE, 2016

Ficha catalográfica

R454i Revorêdo, Renata Gomes
Identificação do *M. bovis* em amostras sorológicas pela
PCR em
rebanhos de bovinos leiteiros de Pernambuco / Renata Gomes
Revôredo. – Recife, 2016.
59 f. : il.

Orientador: Lucio Esmeraldo Honório de Melo.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –

Universidade

Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2016.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Bovinos 2. Gado 3. Diagnóstico 4. Tuberculose I.

Melo,

Lucio Esmeraldo Honório de, orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**Identificação do *M. bovis* em amostras sorológicas pela PCR em rebanhos
de bovinos leiteiros de Pernambuco.**

Dissertação de Mestrado por:

Renata Gomes Revorêdo

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo (Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Artur Cezar de Carvalho Fernandes

Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima

Recife, ___/___/___.

*“Dedico esta dissertação aos meus pais, Raquel e Regivaldo
e a minha tia-mãe Edna.”*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter guiado meus passos, e aos Animais, pois com um olhar desconfiado, um pedido de carinho ou ajuda tomaram meu coração, foram meus maiores professores, ensinando através de gestos e olhares, a ter paciência e principalmente, a ter humildade, me mostraram o que não estava escrito nos livros, o imprevisível! Obrigado por me capacitar um pouco mais para a vida e por ser o maior, melhor e mais lindo motivo para eu ter chegado até aqui.

Depois, ao homem da minha vida, ao meu “papis lindo”, Jose Regivaldo Barros Revorêdo que sempre foi meu maior torcedor; a minha “mamis” Raquel Gomes Revorêdo, que me deu todos os incentivos, passou toda tranquilidade que eu precisava; e a minha “tia-mãe”, Edna Gomes, que sempre cuidou de mim com tanto carinho e dedicação, e ainda, nas horas vagas se preocupava com o tamanho do meu curriculum (kkk...), nunca conseguirei retribuir a intensidade desse cuidado.

À Rafael Gomes Revorêdo (meu irmão preferido!), que mesmo sem dizer uma palavra (kkk...), sempre me apoiou;

À minha priminha querida, Carla Paixão, que aguentou minha ansiedade durante a elaboração da dissertação e pré-defesa, e, AINDA engordou junto comigo (kkk...), me fazendo companhia e comendo, tudo em prol de saciar essa bendita ansiedade.

À Todos meus familiares, que algumas vezes ao longo desta jornada deixei de lado. Em especial aos meus tios/tias, que sempre cuidaram de mim com muito carinho; a meus primos; Às minhas avós Hilda e Arlinda, que amo muito, e à meus avôs Luiz e Cicero (in memoriam), que tenho certeza que estão orgulhosos e olhando por mim;

Ao Professor Dr. Lucio Esmeraldo Honório de Melo, pela orientação, ensinamentos, ajuda e dedicação ao meu aprendizado, além de seu Carinho;

À Tamyres Izarely Barbosa da Silva, Daniel Dias da Silva e Julia Elisabete da Silva, AMIGOS-IRMÃOS-PARCEIROS que Deus me deu de presente;

À Michael Ricardo, meu anjinho, surgido repentinamente para quebrar minha rotina e alegrar os meus dias, sempre disposto a me ouvir e me aconselhar;

Aos meus amigos, pessoas a quem quero muito bem e que com certeza também querem a mim, que trazem sorrisos aos meus dias, Anathalia; Lili; Mychelle; Paulinho; Victor; Lucas; Natalia; Marília; Stefani; Arthur; Luiz Carlos...

À Diogo Silva, pela ajuda, disponibilidade, ensinamentos ..., enfim, pelo imenso apoio e pela amizade que fizemos, levarei você para sempre no coração;

À Dr. Vicente, Norma e Cícera, que mesmo sem me conhecer, me deram muito amor e defenderam com unhas e dentes um sonho que era meu;

Aos professores de Graduação Dr. Coutinho, Dra Érika Christina, Dra Rita Maia, Dra. Andréa Barreto, Dr. Gileno Xavier, Dra. Martha Vasconcelos, Dr. Moacir, Dra. Miriam, Dr. Rinaldo Mota, Dr. Leonildo, Dra. Andréa Alice e Dr. José Wilton Junior.

Aos colegas de turma e aos de trabalho (Amigas da Maternidade Barros Lima), pois vocês caminharam junto comigo;

A todos os funcionários da UFRPE, pois contribuíram direta ou indiretamente durante todo este caminho;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade que me foi dada durante meu curso;

A coordenação do programa de pós-graduação em Ciência Veterinária/UFRPE;

Ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV) pelos ensinamentos e aulas ministradas, com professores excelentes;

MUITO OBRIGADA A TODOS.

RESUMO

O *Mycobacterium bovis* integra o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e é responsável pela tuberculose nos bovinos e bubalinos (TB), entre outras espécies, inclusive a humana. Objetivou-se com este estudo realizar ensaios biomoleculares investigativos usando PCR para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em amostras séricas de bovinos previamente submetidos ao teste da tuberculina. Foram examinadas 100 amostras séricas para identificação genômica do *M. bovis*, escolhidas ao acaso por conveniência não probabilística e distribuídas em seis grupos experimentais, provenientes de bovinos aparentemente hígidos e previamente submetidos ao Teste da Tuberculina, criados em seis propriedades de diferentes municípios do estado de Pernambuco. Das 100 amostras de soro sanguíneo submetidas à PCR, 5% (05/100) apresentaram positividade ao *M. Bovis*. Quanto ao Teste da Tuberculina, 19% (19/100) dos animais apresentaram reação positiva. Concluiu-se que a PCR em tempo real, quando aplicada diretamente em amostras de soro sanguíneo, demonstrou baixa sensibilidade para ser empregada como ferramenta na rotina diagnóstica da tuberculose em bovinos.

Palavras-chave: Bovinos, Gado, Diagnóstico, Tuberculose.

ABSTRACT

The *Mycobacterium bovis* belongs to the *Mycobacterium tuberculosis* Complex and is responsible for tuberculosis in bovines and buffaloes, as well as in humans. This study aimed to carry out biomolecular assays using PCR for investigate *M. bovis* in serum samples of bovine subjected to the tuberculin test. A hundred samples, from seemingly healthy bovines and previously submitted to the tuberculin test, raised in six properties from different cities of the State of Pernambuco, were examined for Genomic identification of *M. bovis*. The samples were chosen at random by non-probability convenience and distributed in six groups. From the samples subjected to PCR, 5% (100/05) resulted positive for *M. Bovis*. The tuberculin test showed a positive reaction on 19% (19/100) of the animals. Was possible to conclude that the real time PCR, when applied directly in blood serum, showed low sensitivity to be used as a tool in routine diagnosis of tuberculosis in bovine.

Keywords: Bovines, Cattle, Diagnosis, Tuberculosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR - bacilo álcool-ácido-resistente

DNA - deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucléico

FAO - Food and Agriculture Organization – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MDR - multidrogaresistentes

OIE - Organização Internacional de Epizootias

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - pares de base

PNCEBT - Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal

PPD - purificado proteico derivado

TB - Tuberculose

TBZ - Tuberculose Zoonótica

PCR - polimerase chain reaction - reação em cadeia da polimerase

RAPD - random amplification of polymorphic DNA - amplificação aleatória de DNA polimórfico

RFLP - restriction fragment length polymorphisms - polimorfismos dos fragmentos de restrição

RNA - ribonucleic acid - ácido ribonucléico

RT-PCR - reverse transcriptase chain reaction- reação em cadeia da transcriptase reversa

SINAN - Sistema Nacional de Agravos de Notificação

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição das amostragem.	Pág.
TABELA 2: Gene alvo, sequência de primers e comprimento do fragmento amplificado para o <i>M. bovis</i> .	42 43
TABELA 3: Identificação dos animais positivos.	45
TABELA 4: Testes Estatísticos.	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

• <u>Revisão de Literatura:</u>	Pág.
FIGURA 1: Indicação das características diferenciais de Micobacterias do complexo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> .	53
FIGURA 2: Incidência de Tuberculose por município em PE (2012)	53 54
FIGURA 3: Diferentes tipos da Tuberculose.	54
FIGURA 4: Percentual de abandono do tratamento da Tuberculose.	55
FIGURA 5: (A) Paciente bovino Tuberculoso, (B) Paciente humano tuberculoso.	55
FIGURA 6: (A) Cutimetria, (B) Tuberculinização e (C) Leitura da Tuberculinização.	55
FIGURA 7: Pulmão bovino apresentando lesões sugestivas de Tuberculose.	56
FIGURA 8: (A), (B) e (C) Linfonodo bovino apresentando lesões Tuberculosas.	56
FIGURA 9: (A) Estufa com Culturas para Micobacterias, (B) colônias de micobacterias .	
• <u>Artigo:</u>	57
FIGURA 1: (A) Amostras de soro sanguíneo bovino, (B) Amostras de DNA extraído de soro sanguíneo	57
FIGURA 2: Curva padrão.	58
FIGURA 3: (A) e (B) Resultados Positivos na PCR em tempo real para identificação de <i>Mycobacterium bovis</i> , (C) e (D) Resultados Negativos na PCR em tempo real para identificação de <i>Mycobacterium bovis</i> .	

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO	13
1. OBJETIVOS	15
1.1 Geral	15
1.2 Específicos	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos históricos da tuberculose bovina	16
2.2 Aspectos conceituais, microbiológicos e clínico-epidemiológicos da tuberculose bovina	17
2.3 Aspectos relacionados ao diagnóstico	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4. ARTIGO CIENTÍFICO: Identificação do <i>M. bovis</i> em amostras sorológicas pela PCR em rebanhos de bovinos leiteiros de Pernambuco.	40
ANEXOS	53

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) animal é uma doença de evolução crônica, causada pelo *Mycobacterium bovis*, que acomete principalmente bovinos e bubalinos, sendo também relatada em caprinos (MELO *et al.*, 2012), e pode ser transmitida aos seres humanos por meio da ingestão de produtos de origem animal contaminados (ROXO, 1996; ABRAHÃO, 2005).

A situação da tuberculose bovina no Brasil não está bem delineada: embora sua prevalência seja estimada em 1,3% (BRASIL, 1994), há registros de valores regionais superiores, como 5,7% em Pernambuco, aferidos nos catálogos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2006).

Estudos realizados por Mendes *et al.* (2008) e por Melo *et al.* (2010), usando o Teste da Tuberculina, estimaram prevalências de 15,2% e 11,5%, respectivamente, bem superiores às notificadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A ocorrência da tuberculose também foi registrada pioneiramente em rebanhos caprinos do estado de Pernambuco, sendo aferida positividade em 3,4% dos animais examinados (MELO *et al.*, 2012).

Desta forma, a realidade da tuberculose bovina no Brasil, em meio ao comércio clandestino de carne e leite, associados à falta de dados estatísticos confiáveis, torna-se uma grande ameaça à saúde pública (ABRAHÃO, 2005; ANTORE, 1998). A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem alertado que uma proporção significativa dos casos de tuberculose humana, entre 2 a 8%, ocorre em pessoas infectadas pelo *Mycobacterium bovis*, agente primário da doença em bovídeos e caprinos, na chamada Tuberculose Zoonótica (TBZ), considerada uma doença infecciosa emergente (COSIVE *et al.*, 1998; MELO, 1999; MELO *et al.*, 1999; MAPA, 2001; MELO *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2008).

A epidemiologia da Tuberculose Zoonótica é ancorada em um cenário em que coexistem fatores de risco, como a presença de bovinos infectados em pequenas criações consorciadas com caprinos, em que pessoas vinculadas à família dos produtores, principalmente, mantêm contato insalubre e em conexão com o hábito social, econômico e cultural da população, especialmente a da Região Nordeste, de consumir de forma *in natura* o leite de vaca ou de cabra, ou de seus produtos derivados, como o queijo coalho.

Estima-se que 42 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* e que ocorreram, na última década, cerca de 50 mil óbitos no país. O Brasil está entre os 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo, com quase 70 mil registros só em 2011 e cerca de 4,6 mil mortes anuais (BRASIL, 2012). Dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) demonstram que Pernambuco destaca-se negativamente no cenário da tuberculose humana no Brasil, sendo o quarto estado com maior incidência da doença, com 46,2 casos a cada 100 mil habitantes, e ocupa a segunda colocação em mortes causadas pela enfermidade. Dentre as capitais do Brasil, Recife é a que apresenta maior número de óbitos registrados (BRASIL, 2012).

A ocorrência da tuberculose animal, portanto, além de ser um entrave primário à produtividade dos rebanhos leiteiros infectados, bovinos ou caprinos, repercute na saúde pública, pois representa uma ameaça as pessoas. Neste sentido, a realização deste estudo justifica-se como contribuição para o aperfeiçoamento do diagnóstico da tuberculose animal, usando amostras sorológicas para a pesquisa de *M. bovis* através da PCR, em bovinos submetidos a Tuberculização.

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar o uso do soro sanguíneo como espécime biológico para pesquisa de *Mycobacterium bovis* segundo a Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

1.2 Específicos

- Identificação do *Mycobacterium bovis* em soro sanguíneo de bovinos, por meio da PCR em tempo real;
- Determinar sensibilidade da técnica da PCR, considerando o Teste da Tuberculina como teste padrão-ouro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos da tuberculose

Tuberculose designa uma das doenças infectocontagiosas mais populares do mundo e os primeiros registros em bovinos apontam sua origem para a Inglaterra e Europa Continental e datam de 384-322 a.C, sendo escritos por Hipocrates, Celsus e Avicena, porém naquela época nada era muito claro e costumava-se atribuir as lesões encontradas a diversas outras doenças (FAPEMIG , 2004).

Em relação ao caráter zoonótico da Tuberculose Bovina, desde tempos remotos, em meio ao processo de domesticação dos bovídeos, ocorrido entre 8000-4000 a.C., surgem evidências arqueológicas de infecção humana, havendo relatos em múmias, datados da pré-história, nas quais foram encontradas lesões que indicavam a doença (DANKNER *et al*, 1993; ROSEN, 1994; CAMPOS *et al* 2001; DORMANDY, 2002; REICHMAN & TANNE, 2003).

Há registros de interesse pelo assunto desde os períodos bíblicos, onde no fim do século II os rabinos proibiam ao povo hebreu de consumir carne de bovinos em cujos pulmões houvesse lesões ulcerosas. E, mais tarde, na Alemanha, em 1307, lei equivalente foi promulgada (FELDMAN, 1955).

A descoberta da natureza infecciosa da doença para humanos se deve a Villemin e a Koch, que deram um passo primordial para o controle da doença ao descobrirem sua natureza infecciosa (GRIFFITH *et al*, 1930 citado por ABRAHÃO, 1998).

Na Europa e no Brasil rapidamente a doença se tornou um grave problema de saúde pública, a epidemia tornou-se corriqueira nas cidades mais populosas (LEITE & TELAROLLI JR, 1997).

Há controvérsias quanto ao surgimento dessa insidiosa infecção: nas Américas, especula-se que tenha surgido antes da colonização, já outros afirmam que a mesma chegou com os europeus durante as suas expedições (LEITE& TELAROLLI JR, 1997).

No Brasil, acredita-se que a entrada da mesma deu-se através dos colonizadores jesuítas (HIJAR, 1994; CAMPOS *et al* 2001; LEITE & TELAROLLI JR, 1997).

2.2 Aspectos conceituais, microbiológicos e clínico-epidemiológicos da tuberculose

Tuberculose Bovina é uma micobacteriose infecto-contagiosa de evolução crônica e caráter zoonótico, causada pelo *Micobacterium bovis* e caracterizada clinicamente por emaciação, queda na produção e lesões nodulares nos linfonodos e pulmões, podendo acometer outras espécies, como cães, gatos e humanos (RADOSTITS, 2002; MELO *et al.*, 2012)

Sua importância econômica está relacionada aos prejuízos que a infecção causa nos rebanhos, caracterizados pela queda no ganho de peso, diminuição na produção de leite, descarte de animais de alto valor zootécnico, condenação de carcaças, morte de animais e perda de credibilidade do rebanho criação.

O *Mycobacterium bovis* é um parasita bacilar intracelular facultativo, aeróbio e de crescimento lento em meio de cultura, corando-se pelo método de Ziehl-Neelsen, pertence à família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* e gênero *Mycobacterium* e constitui com as espécies *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. microti* o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, nas chamadas micobactérias tuberculosas (KANTOR, 1979; BIER, 1984; ROXO 1996; LAGE *et al.*, 1998; LAGE *et al.*, 1998; MURRAY, 1999).

Em bovinos, sua patogenia é similar à infecção tuberculosa, sendo caracterizada por uma pequena lesão, geralmente única e pequena no local da infecção e um apreciável aumento dos linfonodos (THOEN & HIMES, 1986; HANCOX, 1995; ABRAHÃO, 1998). A doença é crônica, progressiva e tendo como porta de entrada principal as vias aéreas superiores (COLLINS & GRANGE 1983; MOTA & NAKAJIMA, 1992; ABRAHÃO, 1998.), entretanto, pode também ocorrer por via digestiva (MORRIS *et al.*, 1994).

Os tipos de bacilos - humano, bovino ou aviário, podem ser diferenciados facilmente pelas características da cultura, bioquímicas e de sua patogenicidade a animais de laboratórios, em conformidade com a Fig. 1 (BIER, 1984).

O *Mycobacterium bovis* possui um grande número de hospedeiros e um complexo padrão epidemiológico, envolvendo animais domésticos e selvagens e seres humanos (MORRIS *et al.*, 1994). Acredita-se que a doença é relativamente rara em animais selvagens, porém, existe a possibilidade de acometer estes animais (NEILL *et al.*, 1994).

Entre os animais domésticos que podem ser infectados pelo *M. bovis*, destacam-se cães, gatos, suínos, equinos, caprinos e ovinos, quanto aos mamíferos exóticos e silvestres; animais de zoológicos e parques e animais selvagens, citam-se: macacos, elefantes, girafas, leões, tigres, leopardos, raposas, camelos, lhamas, alpacas, lebres, javalis, búfalos, texugos, cervos, gambás,

porcos selvagens, roedores, lontras, bisões, esquilos, corvos, furões e focas (ABRAHÃO, 1998). A importância dada a estas fontes de infecção é relativamente pouca, porém deve-se levar em consideração que animais infectados significam a perpetuação da doença e que, qualquer reservatório pode ser responsável por casos esporádicos de tuberculose bovina (MODA *et al*, 1996).

Na espécie humana, a infecção pelo *M. bovis* expressa-se por uma síndrome clínica semelhante a que envolve o *M. tuberculosis*, incluindo a formação de escrófulas, na chamada Tuberculose Zoonótica. Diferentemente, parece que a infecção pelo *M. tuberculosis* não causa doença em bovinos, sendo considerada autolimitante por alguns pesquisadores, que afirmam que a infecção leva apenas a sensibilização alérgica, que desaparece logo após o afastamento da fonte da infecção (LAGE *et al*, 1998), fato que não ocorre com outras espécies, com exemplo: primatas, cães, gatos, papagaios e suínos (ROXO, 1996).

Aspecto epidemiologicamente relevante, pois interfere no saneamento dos rebanhos, está relacionado à resistência do *M. bovis*: 1) ao abrigo da luz solar e com umidade permanece viável por longos períodos, é relativamente resistente ao calor e a diversos desinfetantes, mantém sua viabilidades por até dois anos em estábulos, pastagens e dejetos, sobrevive por até 1 ano na água e até 10 meses em produtos de origem animal contaminados (ROXO, 1996); 2) Desinfetantes, tais como, hipoclorito de sódio a 5%, formaldeído a 3%, fenóis e álcool são eficientes, porém deve-se levar em consideração o tempo de exposição, a temperatura, a concentração e a presença de matéria orgânica para que a atividade do desinfetante seja eficaz (ROXO, 1996; LAGE *et al*, 1998); 3) As amônias quaternárias e o clorexidine são ineficazes, já o calor úmido a 60°C e a luz solar direta em ambiente seco mostra-se bastante eficientes (ROXO, 1996); 4) A pasteurização á temperatura de 71,1°C por 15 segundos ou 62,8°C a 65,6°C por 30 minutos, seguido de rápido resfriamento é eficiente contra as micobactérias (Senai/DN, 1999).

Quanto à virulência, quanto maior a quantidade de glicopeptídeos na parede celular maior a virulência, esta substância é importante na síntese do fator que determina o crescimento filamentosos, em forma de corda das micobactérias (DUNGWORTH *et al*, 1992; JORGE, 2001).

Em relação à epidemiologia da tuberculose bovina no Brasil, a situação não se encontra bem delineada, com escassos estudos. Estima-se que a prevalência nacional da doença é de 1,3%, em levantamento realizado no período de 1989 a 1998, já em Pernambuco, a prevalência divulgada foi de 5,7% (BRASIL, 1994), bem inferior aos 11% encontrados em recente estudo (BAPTISTA FILHO, 2012).

A gênese da infecção pelo *M. bovis* em caprinos vem sendo estreitamente associada à tuberculose bovina, sendo sua ocorrência pioneira identificada em rebanhos criados em Pernambuco, com 3,4% dos caprinos positivos (MELO *et al.*, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), atenta aos registros de infecção humana de origem bovina (Tuberculose Zoonótica) e preocupada com a impactação dessa insidiosa infecção animal na saúde pública, vem alertando para a possibilidade, em países em desenvolvimento, de uma proporção significativa dos casos, entre 2 a 8%, ter como agente causador o *M. bovis* (COSIVE *et al.*, 1998).

A caracterização da epidemiologia da Tuberculose Zoonótica perpassa pelo reconhecimento prévio da magnitude da tuberculose humana, em meio à ocorrência significativa da tuberculose bovina como fator de risco primário e a identificação de hábitos sociais, culturais e econômicos da população, como a ingestão de leite de vaca e/ou cabra *in natura* ou produtos derivados. Neste sentido, estima-se que 1/3 da população mundial estejam infectadas pelo *Mycobacterium tuberculosis*, estando o Brasil entre os 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo, com quase 70 mil registros em 2011 e 4,6 mil mortes anuais (BRASIL, 2012).

Dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) demonstram que Pernambuco destaca-se negativamente no cenário da tuberculose humana no Brasil, sendo o quarto estado com maior incidência da doença, com 46,2 casos a cada 100 mil habitantes, e ocupa a segunda colocação em mortes causadas pela enfermidade. Entre os 10 primeiros municípios do estado com maiores incidências da doença, Recife é o primeiro (Fig. 2). Dentre as capitais do Brasil, Recife é a que apresenta maior número de óbitos registrados (BRASIL, 2012).

De acordo com dados do sistema de informação de agravos de notificação (SINAN, 2013), nos anos de 2010, 2011 e 2012, Pernambuco contou com 1058 casos novos de tuberculose extrapulmonar, 11030 casos novos de tuberculose pulmonar e 442 casos associados de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, totalizando nos 3 anos 13.052 casos novos de tuberculose no estado (Fig. 3).

Em contrapartida, nos registros oficiais (SINAN, 2010, 2011 e 2013) consta que Pernambuco contou com uma relativa diminuição nos casos de abandono de tratamento no estado, onde em 2010 o percentual de abandono foi de 13,85%, em 2011 de 10,67%, já em 2012 esta taxa foi de 9,26% (Fig. 4).

Conhecendo-se a magnitude de ocorrência da tuberculose humana, em conexão com a prevalência expressiva da tuberculose bovina, criam-se as condições favoráveis à transmissibilidade da infecção dos animais para os humanos: diretamente pela via aerógena, por inalação do *Mycobacterium bovis*, e indiretamente, pelo consumo de leite e de produtos lácteos não fervidos ou pasteurizados, e com menor frequência pela ingestão de produtos cárneos contaminados, (WHO, 1993; GRANGE & YATES, 1994; ABRAHÃO, 1998).

A Tuberculose é considerada uma zoonose ocupacional, estando incluídos como grupos de risco as comunidades rurais, os criadores e tratadores de gado, trabalhadores da indústria da carne, veterinários e funcionários de zoológicos (O' REILLY & DABORN, 1995; ROXO, 1996; FIGUEIREDO *et al*, 2008). Enquadra-se entre as enfermidades integrante da lista B da Organização Internacional de Epizootias (OIE), lista esta, que trata das doenças transmissíveis importantes do ponto de vista socioeconômico e sanitário (ACHA & SZYFRES, 2001).

Desta forma, a tuberculose como zoonose é preocupante, principalmente nos países em desenvolvimento, onde o conhecimento do problema é escasso. São necessárias, pois, melhorias nos aspectos de saúde pública veterinária em relação à infecção pelo microrganismo, especialmente nas populações de risco (O' REILLY & DABORN, 1995; COSIVE *et al*, 1998; FIGUEIREDO *et al*, 2008).

Embora os registros sejam pequenos e pontuais, é bastante relevante o percentual dos casos de tuberculose registrados em seres humanos tendo como agente o *Mycobacterium bovis* (RIVAS 2012; ALVES 2013). Mesmo ocasionais os casos de infecções pelo *M. bovis* nos humanos, não devem ser negligenciados, como ocorre na maioria dos países desenvolvidos. A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO) juntamente com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization – FAO) e a Organização Internacional de Epizootias (World Organisation for Animal Health – OIE) classificaram a tuberculose causada pelo *M. bovis* como uma zoonose negligenciada nos países em desenvolvimento (MICHEL; MÜLLER; VAN HELDEN, 2010). Nos países em desenvolvimento, as comunidades enfrentam um maior risco de infecção pelo *M. bovis*, devido ao maior grau de exposição dos seres humanos aos animais, particularmente no que concerne ao consumo frequente de leite não pasteurizado e de produtos lácteos derivados de rebanhos que não possuem controle da tuberculose bovina. Ao mesmo tempo, essas populações estão inclusas no grupo onde as taxas de infecção HIV/AIDS são as mais altas do mundo e estão associadas ao aumento de suscetibilidade à co-infecção com o *M. tuberculosis*, principal causador de tuberculose nos humanos (BERG *et al.*, 2011).

Investigação epidemiológica realizada em pacientes em tratamento em hospital do serviço de referência para o tratamento da tuberculose em Pernambuco-BR, revelou que 39% dos pacientes em tratamento no serviço são moradores de zona rural, 25% afirmaram ter como ocupação a agricultura/pecuária e 50% dos entrevistados afirmaram consumo de leite *in natura* rotineiramente (REVOREDO,2014), levando a ideia de que a possibilidade da tuberculose zoonótica não está tão distante e que pode estar sendo subnotificada no nosso estado.

Nesse contexto, a TBZ não está bem delineada no Brasil, pois não existem dados específicos sobre a sua prevalência, apenas sabe-se que nas primeiras décadas do século passado a incidência era elevada (ANDRADE *et al*, 1991; FELDMAN, 1955; ABRAHÃO, 1998). Estima-se que 70 a 80% dos casos de tuberculose dos gânglios cervicais em crianças e 20% dos casos de tuberculose renal do homem sejam causados pelo *M. bovis* (WIESNER, 1973; ABRAHÃO, 1998). Em 1974 Corrêa e Corrêa citam um trabalho de estatística geral de 1966, em que se afirmam as seguintes incidências do bacilo bovino no homem: Alemanha, 10,5%; Inglaterra, 4,7%; Dinamarca, 5,6%; França, 4,3%; Polônia, 1,1%; Hungria, 9,9%; Suíça, 2,6%; Checoslováquia, 7,8%; Turquia, 7,1%; Congo, 2,2%; África do Sul, 7,2% e Venezuela, 5,4% (CORRÊA & CORRÊA, 1974). Recentemente, em 2012, no Uruguai, houve o relato de três casos de tuberculose onde o agente causador foi o *M. bovis* e em 2013, em Goiás-Brasil, também houve o isolamento do *M. bovis* em material biológico humano de três pacientes, demonstrando assim a existência de casos recentes de infecção zoonótica. (RIVAS 2012; ALVES 2013).

Vale ainda destacar na epidemiologia da Tuberculose Zoonótica que a identificação da espécie *M. bovis* em rebanhos consorciados de bovinos e caprinos criados no estado de Pernambuco evidencia a intercorrência da doença nas duas espécies ruminantes e as coloca no mesmo patamar de importância como fator de risco da Tuberculose Zoonótica (MELO *et al*. 2012).

A identificação da tuberculose, em animais ou em pessoas, está associada ao reconhecimento da expressão clínica da doença e uso de técnicas diagnósticas. Clinicamente, a doença nos bovinos não tem uma síndrome bem definida, pois o animal acometido não apresenta alterações no estado geral e nutricional, somente nos estágios terminais da enfermidade as evidências clínicas da doença são aparentes, pois se trata de uma doença de evolução lenta. Evolui para anorexia (Fig 5A.), hipertermia moderada, tosse dolorosa e intermitente e respiração torna difícil e dispneica. O agravamento do quadro inclui febre alta e contínua, tosse débil e úmida, expectoração mucopurulenta, dificuldade respiratória, os animais assumem a atitude de abaixar a cabeça, sacar a língua, emitem gemidos ou ruídos ao respirar e

desviam para fora os membros torácicos com aumento dos gânglios linfáticos pulmonares e este levar ao impedimento da eructação e conseqüentemente a um acúmulo de gás e meteorismo no ventre (WIESNER, 1973; ABRAHÃO, 1998; RADOSTITS, 2002). Quando a tuberculose encontra-se generalizada, o quadro clínico caracteriza-se por transtorno geral inespecífico e os pacientes morrem em consequência da debilidade geral (NAZÁRIO *et al*, 1987; ABRAHÃO, 1998).

Em cães e gatos quando ocorrem sinais clínicos, estes refletem o sítio primário da infecção (CLERCX *et al*, 1992), são mais comumente observados broncopneumonia, formação de nódulo pulmonar, enfartamento de linfonodos, febre, perda de peso, tosse, dispnéia, apatia e anorexia (KAVINSKI & KLEINER, 1984; CLERCX *et al*, 1992; MEGID *et al* 1994; ABRAHÃO, 1998; SOUZA, 2008).

Nos primatas não humanos, não existem sinais clínicos característicos, observa-se, algumas vezes, pêlos ralos, secos e sem brilho; inatividade e perda de peso. Alguns animais não apresentam sintomas até a morte (ABRAHÃO, 1998; SOUZA, 2008).

Em humanos, independente da infecção tuberculosa ter como agente causador o *M. bovis* ou *M. tuberculosis*, as manifestações clínicas e as lesões patológicas são basicamente as mesmas, assemelhando-se com uma doença crônica infecciosa, marcada por febre, emagrecimento, astenia, tosse com expectoração que pode evoluir para escarros sanguinolentos e hemoptise (Fig 5B.) (BRASIL, 2001).

Em meados da década de 40, na Dinamarca, relatos humanos do quadro clínico da infecção tuberculosa pelo *M. bovis* incluíram inicialmente febre, dor de garganta, inflamação das amígdalas e linfonodos cervicais, sintomas estomacais, alargamento dos linfonodos mesentéricos, esporadicamente conjuntivites e muitas vezes eritema nodoso (PRITCHARD, 1988; ABRAHÃO, 1998).

Reconhecida a expressão clínica da tuberculose e estabelecendo-se o diagnóstico, incluindo para isso o uso dos exames complementares, com vistas ao controle e erradicação da micobacteriose. O controle da tuberculose bovina e sua impactação na saúde pública refere-se as medidas sanitárias nos rebanhos e nas comunidades onde coexistam fatores de risco, bem como ações sócio-educativas e terapêuticas relativas ao repercussão da doença em humanos (BRASIL, 2001).

Nos bovinos, preconizam-se para o controle ou erradicação da tuberculose e outras doenças infecciosas em geral a aplicação simultânea de medidas de combate às fontes de infecção, aos animais susceptíveis e também às vias de transmissão (PINHEIRO, 1990). Neste

sentido, faz-se o bloqueio dos pontos críticos da doença incluindo a tuberculinização dos animais uma boa alimentação, a eliminação de portadores da infecção e um manejo adequado do rebanho, visando evitar contato entre animal sadio e infectado. É necessária também a observação constante do comportamento dos animais, avaliando os que apresentam algum sintoma clínico; proceder a higiene e desinfecção dos estábulos, bebedouros e currais usados por animais doentes; aleitar os bezerros com leite de vacas sadias e aquisição de animais somente com atestado negativo de tuberculinização (ABRAHÃO, 1998).

Em relação à Tuberculose Zoonótica, a investigação epidemiológica direcionada à percepção de contato entre indivíduos e/ou animais tuberculosos é importante para a hipótese diagnóstica (BRASIL, 1994). O grande entrave na caracterização da Tuberculose Zoonótica, contudo, é o emprego de métodos não adequados de isolamento e identificação do *M. bovis* em espécimes biológicas humanas e isso anula ou impede o estabelecimento do diagnóstico (THOREL, 1994; GRANGE, 1996; HANCOX, 1996).

As principais medidas para o controle da tuberculose humana no Brasil consistem em: busca ativa de casos, tratamento correto dos bacilíferos, vacinação BCG e quimioprevenção (BRASIL, 1994; BRASIL, 2001). Adicionalmente, medidas profiláticas e de combate devem ser implementadas contra a infecção animal, consistindo principalmente no saneamento dos rebanhos infectados e eliminação de contato prolongado com animais doentes, bem como proibição do consumo de leite não fervido ou não pasteurizado (SOOLINGEN *et al*, 1994).

Em relação à possibilidade do tratamento da tuberculose, nos bovinos é uma medida impraticável, principalmente devido à possibilidade de desenvolvimento de cepas multidrogaresistentes (MDR) de *M. bovis*, tempo de duração e alto custo (FLAMAND *et al*, 1994). Neste sentido, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, junto ao Ministério da Saúde - PNCBT (BRASIL, 2001) referenda esta tese ao proibir procedimentos terapêuticos de qualquer natureza, sendo condenável o uso de referidas práticas em bovinos tuberculosos, mesmo no âmbito da pesquisa ou envolvendo valor zootécnico, como relatado em trabalhos publicados (LANGENEGGER *et al*, 1999; GRETH *et al*, 1994, THOREL & MOUTOU, 1994).

Diferentemente da bovina, a tuberculose humana é curável, sendo de notificação compulsória e a medicação mais utilizada, à base de rifampicina (R), isoniazida (H), Etambutol (E) e pirazinamida (Z), é fornecida exclusivamente pelo Ministério da Saúde, sendo a associação medicamentosa adequada e o uso regular por tempo suficiente eficaz para evitar a resistência e a persistência bacteriana (BRASIL, 1994; BRASIL, 1995), bem como interrompe

a contagiosidade, que ocorre após um mês do início do tratamento (VERONESI & FOCACCIA, 1996; HONE, 2002; PORRAS *et al*, 2002). No tratamento dos pacientes imunocomprometidos, portadores de HIV/AIDS, faz-se necessário um período de tratamento maior (9 meses), onde a 2ª fase tem a duração de 7 meses (HADAD, 1994; BRASIL, 1995; GARCIA *et al.*, 2004). Uma vez iniciado o tratamento, este não deve ser interrompido, pois permite a multiplicação do microorganismo, levando a recidiva da doença e resistência bacteriana (ROSEMBERG *et al*, 1990). A quimioprofilaxia, que nada mais é do que o uso de drogas capazes de prevenir a infecção ou impedir que o indivíduo infectado adoça, consiste na administração de isoniazida em pessoas não infectadas, quimioprofilaxia primária, e também em pessoas infectadas, mas sem sinais de doença, quimioprofilaxia secundária, na dosagem de 10mg/kg de peso diariamente, durante 6 meses, não excedendo a dose de 400mg (ALMEIDA, & MAGARÃO, 1969; SUCCI, 1976 citado por ABRAHÃO, 1998; BRASIL, 1995;). A eleição da isoniazida para quimioprofilaxia se deu pelo seu alto poder bactericida, baixos efeitos colaterais e baixo custo. (ROSEMBERG *et al*, 1990).

Especificamente sobre a infecção zoonótica, deve-se levar em consideração que o *M. bovis* é naturalmente resistente pirazinamida (CUNHA, 2011), logo, esta deverá ser substituída por outra droga de 1ª linha, para o correto tratamento dos contaminados por esse agente (DANKNER *et al*, 1993).

2.3 Aspectos relacionados ao diagnóstico

O diagnóstico clínico da tuberculose bovina, baseado na avaliação do estado geral do animal e caracterização da síndrome clínica, tem valor relativo por tratar-se de uma bacteriose crônica (RADOSTITS, 2002).

Atualmente, no Brasil, os procedimentos de referência para o estabelecimento do diagnóstico da tuberculose bovina estão contidos no Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT, sendo o teste da tuberculina (Fig. 6) e a detecção de lesões nos matadouros (Fig 7 e 8) os métodos diagnósticos mais utilizados, em conexão, quando for possível, com os exames bacteriológicos (Fig. 9) (BRASIL, 2006).

O teste da tuberculina é considerado o método padrão ouro pelo Ministério da Agricultura (MAPA) para o diagnóstico de rotina da Tuberculose Bovina, uma vez que, embora laborioso em sua execução, é simples em sua concepção e confiável como teste de triagem, quer na modalidade da prega caudal, cervical simples ou cervical comparativo, sendo este, por usar as

PPD bovina e aviaria e conferir maior especificidade, o teste de eleição quando se desconhece ou estima-se como expressiva a frequência de bovinos positivos (BRASIL, 2006).

O diagnóstico anatomopatológico baseia-se na avaliação post-mortem da carcaça e a identificação de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, em conexão com a investigação histopatológica em fragmentos desses tecidos lesados, adequadamente preparados e corados por HE, Ziehl-Neelsen, modificado por Faraco e Wade ou ainda pela coloração de Kinyoun (MICHALANY, 1980; LEMOS, 1998; BRASIL, 2006).

Apesar do cultivo microbiológico ser indicado como teste confirmatório (BRASIL, 1994), o crescimento bacteriano demasiadamente lento, em consequência da reduzida quantidade de bacilos nas amostras (CORRÊA & CORRÊA, 1992), a utilização de meios de cultura inapropriados, o manuseio inadequado e a possível contaminação da mesma, são fatores que dificultam o isolamento da bactéria e podem levar a resultados falso-negativos (ROXO, 1996), ratificando-se a necessidade de sua utilização associada a outros métodos diagnósticos (MEDEIROS *et al* 2010). Portanto, o isolamento específico do *Mycobacterium bovis* bastante laborioso, devendo-se levar em consideração para a obtenção de resultados satisfatórios as condições de colheita da amostra, estocagem e envio ao laboratório (CORNER, 1994).

O meio recomendado para o cultivo deve ser à base de ovo e piruvato, tendo preferência o Stonebrink, seguido do lowestein-Jensen (SALAZAR, 2005). Para o isolamento do complexo, hoje, os laboratórios de saúde pública do estado de Pernambuco utilizam preferencialmente na sua rotina como meio para cultivo, o Ogawa-kudoh, seguido do lowestein-Jensen.

Sorologicamente, métodos indiretos como Elisa têm sido experimentados em ensaios imunossorológicos com vistas à padronização (BAPTISTA FILHO *et al*, 2013).

Os bovinos responderem à infecção causada pelo *M. bovis* com a produção de anticorpos específicos, sobretudo em estágios mais avançados. Ensaios imunossorológicos usando Elisa apresentou resultados promissores para a identificação de bovinos portadores de estado imunitário tardio, ocasionalmente anérgicos, sendo um método de rápida execução, porém, exigindo operador capacitado e que ainda encontra-se em fase de padronização (LILENBAUM, 2006).

Métodos diretos biomoleculares representam uma revolução, especialmente após o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), cujo princípio básico é a detecção de um fragmento de DNA espécie-específico ou do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (BRASIL, 2006).

No campo da engenharia genética, a biologia molecular, desde a década de 50, vem se mostrando uma das áreas de grande potencial para se investir em pesquisas na medicina (PINHO, 2006), sendo considerada uma ferramenta diagnóstica inovadora na saúde animal (ÇENTIKAIA *et al.*, 2002; CARMINATI, 2005; PACHECO *et al.*, 2007).

Há poucos anos surgiram novas técnicas moleculares com capacidade de identificar determinada sequência do genoma de qualquer organismo, mesmo que a amostra possua um pequeno volume. O mérito se deve à possibilidade da reprodução *in vitro* da replicação das fitas de DNA ou RNA, através da PCR, formando diversas cópias de um fragmento gênico específico, contendo poucos ou milhares pares de base (pb) (KRITSKI *et al.*, 1997; TURNER *et al.*, 2004).

As técnicas de biologia molecular para amplificação de ácido desoxirribonucleico (DNA), como no caso a reação em cadeia da polimerase (PCR), baseia-se na síntese enzimática orientada por oligonucleotídeos iniciadores, denominados primers (OIE, 2005).

Mesmo já comprovadamente bastante eficiente, ainda existem alguns entraves relacionados à técnica, definidos pelo seu elevado custo, relativa complexidade e falta de padronização das técnicas de acordo com as amostras utilizadas, levando à certa variabilidade na sensibilidade e especificidade, o que restringe em parte o seu uso (MARTIRE, 2009).

A utilização da PCR exige o conhecimento prévio da sequência de genes a que se deseja amplificar e, assim, produzir uma sequência de oligonucleotídeos iniciadores, também chamados de primers, para dar início às reações. Os primers e, mais especificamente, a confecção deles, é o ponto crítico e limitante da reação da PCR. Estas estruturas devem apresentar temperatura de anelamento ideal, de acordo à segunda fase do ciclo de amplificação, permitindo a hibridização eficiente destas estruturas e extensão dos fragmentos pela DNA polimerase (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Atualmente, existem programas de computador que disponibilizam desenhos de primers com maior eficácia (BROWNIE *et al.*, 1997; BRASIL, 2000; TURNER *et al.*, 2004).

A amplificação do material é realizada até que se obtenha uma solução com elevada quantidade de DNA, a ponto de ser detectável facilmente por métodos simples e tradicionais de identificação de moléculas (MULLIS, 1990; KALIA *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 2004).

Inicialmente, é realizada a extração do DNA, utilizando para isto diferentes substâncias, a depender do material biológico de que se deseja extrair, o qual posteriormente é submetido a uma série de reações cíclicas. Cada ciclo consiste de três fases (MULLIS, 1990; BRASIL, 2000):

- Fase de desnaturação: É a fase na qual ocorre o desenrolamento da fita dupla do DNA, dando origem a duas fitas simples;
- Fase de anelamento: É a fase de pareamento dos primers ao DNA alvo;
- Fase de extensão: É a fase na qual ocorre a polimerização de uma nova fita.

As três etapas ocorrem em um termociclador, e o produto final será utilizado como substrato para o próximo ciclo de amplificações, gerando assim uma reação exponencial. O ponto da reação que caracteriza a fase final depende da quantidade de DNA amplificado, fatores como exaustão de primers ou de nucleotídeos, inativação da polimerase, excesso de substrato e competições com produtos não específicos irão possibilitar a entrada precoce nesta fase (BRASIL, 2000; TURNER et al., 2004). A maioria das reações da PCR necessita, em média, de 30 a 40 ciclos para que um único fragmento gênico apresente mais de 1.000.000.000 de cópias (MELLO & FONSECA-COSTA, 2005).

Os componentes básicos para uma reação de PCR incluem a Taq polimerase, os primers, o tampão fosfato, magnésio, nucleotídeos e o DNA, o qual se deseja amplificar (WIEDBRAUK & FARKAS, 1995; TURNER *et al.*, 2004).

Existem distintos tipos de reações de PCR, sendo estes: *Reverse Transcriptase Chain Reaction* (RT-PCR); *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP-PCR); *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD-PCR); *PCR Competitiva*; *Multiplex PCR*; *Nested PCR* e a *Real Time PCR*, que foi a técnica utilizada no experimento desta dissertação. Técnica esta que apresenta um dos maiores níveis de sensibilidade, baseia-se em uma amplificação convencional de DNA e o resultado da reação é gerado ao longo dos ciclos através da emissão e análise de fluorescência (MOLINA & TOBO, 2004; OTTO, 2006; VIEIRA, 2011). A captura da fluorescência faz-se através de em um sistema óptico fechado, um termociclador, e os resultados são convertidos em um gráfico de amplificações.

A amplificação na PCR em tempo real conta com dois sistemas precursores, SybrGreen® e TaqMan®. A diferença entre os dois sistemas é a seguinte: na TaqMan®, adiciona-se na reação oligonucleotídeos, designados sonda, complementares a uma determinada sequência gênica do DNA alvo e marcados com um fluoróforo ligado na extremidade 5', também conhecido por reporter (R). A cada ciclo de amplificação ocorre liberação de fluorescência, sendo a reação de amplificação diretamente proporcional à fluorescência emitida (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Já no sistema SybrGreen®, os fluoróforos presentes no reagente se ligam em toda a dupla fita de DNA formada, emitindo, assim, a fluorescência. Ao término da termociclagem, os resultados serão gerados sob a forma de curvas de amplificação, as quais devem ser analisadas em

associação (NASCIMENTO *et al.*, 2010), e independente do regente utilizado, para PCR em Tempo Real a leitura do resultado realiza-se no próprio aparelho (MARTIRE, 2009).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. (Dissertação) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; São Paulo, 1998.
- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco de transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. *Archives of Veterinary Science*, v.10, n.2, p.1-17, 2005.
- ACHA, P. N. & SZYFRES, B. Tuberculosis Zoonótica. In: *Zoonosis y Enfermedades Transmissibles Comunes al Hombre y a los Animales*, v.1. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001.
- ALMEIDA, A.P. & MAGARÃO, M.F. Situação do problema da tuberculose no Brasil. *Rev. Serv. Nac. Tuberc.*, 13 (51): 219-34, 1969.
- ALVES S. L. A; SANTANA I. G; OLIVEIRA H. A; CARVALHO M. G; GUIMARÃES A. C; TAVARES A; DIAS D.X. R; PEREIRA R. B, CAMPOS C. E. D. Relato de isolamentos de *Mycobacterium bovis* em humanos, a partir de meios de Löweinstein-Jensen e Ogawa-Kudoh, sem piruvato, no estado de Goiás. Seminário Nacional de Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose 201 2013. Apresentação de Pôsteres.
- ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.R.; MIELKE, P.V. *et al.* Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, 11(3/4): 81-6, 1991.
- ANTORE, A. 41% da produção de leite é clandestina. Folha de São Paulo, São Paulo, 30 ago. 1998. Caderno 3, p.1-4.
- ARAUJO C. P. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cultura e sua identificação por reação de polimerase em cadeia. (Dissertação) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul;2004
- BAPTISTA FILHO, L.C.F. Análise leucométrica em bovinos Tuberculinizados e sua aplicação no monitoramento da leucose enzootica em rebanhos do estado de Pernambuco. (Dissertação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco, 2012.

- BATISTA FILHO, L.C.F; ANDRADE, J.M; FERNANDES, A.C.C; SILVA, T.I.B; GALINDO, R.C.G; SILVA, L.G.S; MELO, L.E.H. Avaliação do desempenho do Elisa comercial importado na detecção de anticorpos anti-*Mycobacterium bovis* em bovinos leiteiros criados no estado de Pernambuco. Anais do X Congresso Brasileiro de Buiatria. Belem- Pará, 2013.
- BIER, O. Bacteriologia e imunologia. 19^a ed. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1984. p.585-610: Micobactérias.
- BERG, S.; GARCIA-PELAYO, M. C.; MÜLLER, B.; HAILU, E.; ASIIMWE, B.; KREMER, K.; DALE, J.; BONIOTTI, M. B.; RODRIGUEZ, S.; HILTY, M.; RIGOUTS, L.; FIRDESSA, R.;MACHADO, A.; MUCAVELE, C.; NGANDOLO, B. N.; BRUCHFELD, J.; BOSCHIROLI, L.; MÜLLER, A.; SAHRAOUI, N.; PACCIARINI, M.; CADMUS, S.; JOLOBA, M.; VAN SOOLINGEN, D.; MICHEL, A. L.; DJØNNE, B.; ARANAZ, A.; ZINSSTAG, J.; VAN HELDEN, P.; PORTAELS, F.; KAZWALA, R.; KÄLLENIUS, G.; HEWINSON, R. G.; ASEFFA, A.; GORDON, S. V.; SMITH, N. H. African 2, a Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Epidemiologically Important in East Africa. Journal Bacteriology, v. 193, n. 3, p. 670-678, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, Pernambuco, 1994.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. Manual de normas para o controle da tuberculose . 4^a ed. Brasília, 1995. (Série A: Normas e Manuais Técnicos, 13).
- BRASIL. I Curso de biologia molecular aplicada à saúde animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte, Campo Grande, 2000.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2001. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília, 2006.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico – Especial Tuberculose, v.43, 2012.
- BROWNIE, J.; SHAWCROSS, S.; THEAKER, J.; WHITCOMBE, D.; FERRIE, R.; NEWTON, C.; LITTLE, S. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.16, 1997.
- CAMPOS R.; PIANTA C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. *Bol. da Saúde*, v. 15, n. 1, 2001.
- CARMINATI, R. Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.
- CETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE, T.; VANECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep and goats by PCR. *Veterinary Microbiology*, n.88, p.75-83, 2002.
- CLERCX, C.; COIGNOUL, F.; JAKOVLJEVIC, S. *et al.* Tuberculosis in dogs. A case report and review of the literature. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 28 : 207-11, 1992.
- COLLINS, C.H. & GRANGE, J.M. The bovine tubercle bacillus: a review. *J. Appl. Bacteriol.*, 55: 13-29, 1983.
- CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v.40, p. 45-63, 1994.
- CORRÊA, C.N.M. & CORRÊA, W.M. Tuberculose humana por bacilo bovino em São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 41: 131-4, 1974.
- COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUGIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, v.4, n.1, 1998.
- CUNHA J. Testes de sensibilidade à pirazinamida em todos os isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* --- uma análise crítica. Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Publicado por Elsevier España, S.L.; 2011

- DABORN, C.J.; GRANGE, J.M.; KAZWALA, R.R. The bovine tuberculosis cycle: an African perspective. *J. Appl. Bacteriol.*, 81 (Suppl.): 27S-32S, 1996.
- DAVID, H.; BRUM, L.; PRIETO, E. Manual de micobacteriologia em Saúde Pública. princípios e métodos . Lisboa. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 1994.
- DANKNER, W.M.; WAECKER, N.J.; ESSEY, M.A. *et al.* *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine*, Baltimore, 72: 11-37, 1993.
- DORMANDY T. The white death: a history of tuberculosis. 3 ed London. Hamblendon & London, 2002. 448 p.
- DUNGWORTH, D.L. The respiratory system. In: Kennedy, P.C., Palmer, N. *Pathology of Domestic Animals*, London, Academic Press, Inc, 1992, 4 ed., cap 6., p. 641-652.
- FAPEMIG. Tuberculose Bovina. *Revista Minas faz Ciência*. Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMING), Belo Horizonte, n.12, Disponível em: <http://revista.fapeming.br/12/index.html>. 2004
- FELDMAN, J. Tuberculose humana de origem bovina: contribuição ao seu estudo no Estado de Minas Gerais. Minas Gerais, 1955. (Tese de concurso para catedrático de Tisiologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais.
- FESTENSTEIN, F. & GRANGE, J.M. Tuberculosis and the acquired immune deficiency syndrome: a review. *J. Appl. Bacteriol.*, 71: 19-30, 1991.
- FIGUEIREDO E. E. S, SILVA M. G, FONSECA L. S, SILVA J. T, PASCHOALIN V. M. F. Detecção do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* no Leite pela Reação em Cadeia da Polimerase Seguida de Análise de Restrição do Fragmento Amplificado (PRA). *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 4, p. 1023-1033, out./dez. 2008
- FLAMAND, J.R.B.; GRETH, A.; HAAGSMA, J. *et al.* An outbreak of tuberculosis in a captive herd of arabian oryx (*Oryx leucoryx*): diagnosis and monitoring. *Vet. Rec.*, 134: 115-8, 1994.
- GARCIA RID, CECATTO SB, MENDONÇA RR, BARCELOS CEM, SANTOS RO, RAPOPORT PB. Tuberculose e blastomicose laríngeas: relato de três casos e revisão de literatura. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004; 70(2):255-9.
- GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p. 137-51, 1994.

- GRETH, A.; FLAMAND, J.R.B.; DELHOMME, A. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of arabian oryx (*Oryx leucoryx*): management. *Vet. Rec.*, 134 : 165-7, 1994.
- GRIFFITH, A.S.; TYTLER, W.H.; CUMMINS, S.L. *et al.* *Bacillus tuberculosis*. In: Fildes, P. & Ledingham, J.C.G, (ed.) *A system of bacteriology in relation to medicine*. London, Medical Research Council / His Majesty's Stationery Office, 1930. v.5, chap.4: 151-325.
- GRIFFIN, J.F.T.; HESKETH, J.B.; MACKINTOSH, C.G. *et al.* BCG vaccination in deer: distinctions between delayed type hypersensitivity and laboratory parameters of immunity. *Immunol. Cell Biol.*, 71: 559-70, 1993.
- HADAD, D. J. *Micobactérias isoladas de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana na Grande São Paulo: aspectos microbiológicos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais*. São Paulo, 1994. (Dissertação) - Escola Paulista de Medicina.
- HANCOX, M. Cattle TB: 'VL, open' cases...or 'NVL, non-infectious' cases?. [Letter] *Respir. Med.*, 89: 712, 1995.
- HIJJAR, M. A. Controle das doenças endêmicas no Brasil: tuberculose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v. 27, p. 23-36, 1994. Suplemento.
- HONE CS. *Alterações otorrinolaringológicas da tuberculose: revisão de literatura*. [Monografia] Rio de Janeiro (RJ): Universidade do Grande Rio Professor José de Sousa Herdy; 2002.
- JORGE, K. S. G. *Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da Tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso de Sul, Brasil*. 2001. 69 p. (Dissertação)- FIOCRUZ/UFMS, Campo Grande, 2001.
- KALIA, A.; RATTAN, A.; CHOPRA, P. A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. *Analytical Biochemistry*, n.275, p.1-5, 1999.
- KANTOR, I.N. *Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal*. OPAS/OMS. Nota Técnica N° 11, 1979, 63 P.
- KAVINSKI, L.C. & KLEINER NETO, J. Tuberculose em cães e gatos. *Inf. CRMV-3*, Curitiba., 1(4):iv, 1984.

- KRITSKI, A.L.; ROSSETTI, M.L.; BONFIM, G.; CASTELO, A.; QUEIROZ MELO, F.C. Técnica da reação em cadeia da polimerase. *Jornal de Pneumologia*, São Paulo, n.23, v.1, 1997.
- LAGE, A. P.; LOBATO, F. C. F.; MOTA, P. M.P. C.; GONÇALVES, V. S. P. Atualização em Tuberculose Bovina. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998, 65 P.
- LANGENEGGER, J.; LEITE, G.O.; OLIVEIRA Jr., J. Tratamento intermitente da tuberculose bovina com isoniazida. *Pesq. Vet. Bras.*, 11 (3/4): 55-9, 1991.
- LEITE, C. Q. F.; TELAROLLI JR., R. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v.18, n.1, p. 17-28, 1997.
- LEMONS, R. A. A. Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico. Campo Grande: Editora UFMS, 1998. 536 P.
- LILLENBAUM, W.; FONSECA, L. S. O uso de Elisa como ferramenta complementar para o controle da tuberculose bovina no Brasil. *Revista USP*, São Paulo, v.43, n.2, 2006.
- MARTIRE, T.M. Diagnóstico laboratorial da tuberculose na infância: métodos convencionais e métodos rápidos. *Publicação Oficial da Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. Pulmão RJ, Suplemento de Pneumopediatria*, Rio de Janeiro, n.1, p.20, supl.27, 2009.
- MEGIDI J.; BRACARENSEII A.P.F.R.L; REISII A. C. F.; STURIONIII D. J; MARTIN L.M.M.; PINHEIRO S.R. Tuberculose canina e sua importância em saúde pública. *Rev. Saúde Pública* vol.28 no.4 São Paulo Aug. 1994.
- MELO, L.E.H. Avaliação da Intercorrência entre Leucose Enzoótica, Tuberculose e Leptospirose dos bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo. USP, 1999, São Paulo. (Tese) - Universidade de São Paulo.
- MELO, L E H.; D'ANGELINO J. L.; CASTRO, R.S.; SOARES, P. C.; SCHALCH, U.M.; PACHECO, J.C.G.; BENATTI, L.A.; WANDERLEY, P. A.; SÔNIA, R.P. Prevalência de vacas reagentes à tuberculinização simultânea em rebanhos produtores de leite do tipo C do Estado de São Paulo. *Ciência Veterinária nos trópicos*, Recife-PE, v. 2, n. 2, p. 91-99, 1999.
- MELO, L.E.H.; MELO, M.T.; ALMEIDA, A.V.; SALDANHA, S.V.; EVÊNCIO-NETO, J.; TENÓRIO, T.G.S.; WANDERLEY, E.K; NASCIMENTO, E.T.S.; FERNANDES, A.C.C.; SÁ, L.M.; BARBOSA, D.F.A.; SOUTO, R.J.C.

- Intercorrência entre tuberculose bovina e caprina: um fator de risco da tuberculose zoonótica no Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 1, 2005, Guarapari. Anais... Guarapari : Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2005.
- MELO, L.E.H.; MELO, M.T.; LEITE, J. E. B.; MAIA, F. C. L.; MOTA, R. A.; SCHINDLER, H. C.; LIMA, J. F.C.; CASTRO, R. S.; SANTOS, N. V. M.; SÁ, L. M. Tuberculose Caprina: aspectos nosológicos, radiológicos, anátomo-histopatológicos e presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em caprinos leiteiros do Estado de Pernambuco, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (Conbravet), 35, 2008, Gramado, Anais... Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2008.
- MELO, L.E.H.; FERNADES, A.C.C.; SILVA, T.I.B.; TENÓRIO, T.G.S.; MENDES, E.I.; BAPTISTA FILHO, L.C.F. Estudo retrospectivo e prospectivo da intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. In: Seminário Nacional Sobre Brucelose e Tuberculose Animal (SNBTA). 2010. Belo Horizonte, 2010.
- MELO, L.E.H., MOTA, R.A., MAIA, F.C.L., FERNANDES, A.C.C., SILVA, T.I.B., LEITE, J.E.B., BAPTISTA FILHO, L.C.F., ARAÚJO, F.R. Ocorrência e caracterização da tuberculose em caprinos leiteiros criados no estado de Pernambuco. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.32, n.9, p.831-837, 2012.
- MELLO, F.C.Q.; FONSECA-COSTA, J. A utilidade da biologia molecular no diagnóstico da tuberculose. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v.31, n.3, 2005.
- MENDES, E.I.; FERNADES, A.C.C.; SÁ, L.M.E.; SILVA, T.I.B.; BARROS, A.D.; OLIVEIRA, C.M.M.; ALBUQUERQUE, M.S.; SILVA, F.F.; MELO, L.E.H. Prevalência da leucose enzoótica e da tuberculose dos bovinos em rebanho leiteiros do Estado de Pernambuco. In: 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET). Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 2008.
- MICHALANY, J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. São Paulo: Editora Pedagógica Universal, 1980. 277 p.
- MICHEL, A. L.; MÜLLER, B.; VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animalhuman interface: A problem, or not? Veterinary Microbiology, v. 140, p. 371-381, 2010.

- MODA, G.; DABORN, C.J.; GRANGE, J.M. *et al.* The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tuber. Lung Dis.*, 77: 103-8, 1996.
- MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. *Biologia molecular. Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico.* São Paulo: Hospital Israelita Albert Einstein, 2004.
- MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.*, 40: 153-77, 1994.
- MOTA, P.M.P.C. & NAKAJIMA, M. Tuberculose bovina. In: Charles, T.P. & Furlong, J. *Doenças dos bovinos de leite adultos.* Coronel Pacheco, EMBRAPA - CNPGL, 1992. p. 97-122.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, v.262, p.56-62, 1990.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H.; *Manual of clinical microbiology*, 7a ed., ASM press: Washington D.C., 1999.
- NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Revista Brasileira de Medicina*, São Paulo, v.67 supl. 10, 2010.
- NAZÁRIO, W.; MARTINI, M.; CAMBRIA, A.M. Tuberculose: um poderoso inimigo que deve ser evitado. *Balde Branco*, 22(271): 24-6, 1987.
- NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B. *et al.* Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 40: 41-52, 1994.
- OTTO, P.G. *Genética básica para veterinária.* 4 ed. São Paulo: Roca, 2006.
- O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, v. 76, 1995.
- PACHECO, L.G.C.; PENA, R.R.; CASTRO, T.L.P.; DORELLA, F.A.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; FROTA, M.N.L.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; ALVES, F.S.F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 56, p.480-486, 2007.
- PACKER, R.A. Veterinarians challenge Dr. Robert Koch regarding bovine tuberculosis and public health. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 196: 574-5, 1990.
- PATRICK R. MURRAY; KEN S. ROSENTHAL; MICHAEL A. PFALLER (Abril de 2009). «Capítulo 28: *Mycobacterium*». En Patrick R. Murray. *Microbiología Médica*

- (6a edición). España: Elsevier-Mosby. pp. 277–290. ISBN 978-84-8086-465-7. OCLC 733761359.
- PAULA, A. Tuberculose: ontem, hoje e amanhã. JBM .55 : 74-100, 1988.
- PINHEIRO, S.R. Influência da matéria orgânica na atividade micobactericida de cinco desinfetantes químicos de uso pecuário. São Paulo, 1990. (Dissertação) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].
- PINHO, M.S.L. Pesquisa em Biologia Molecular: como fazer? Revista Brasileira de Coloproctologia, v.26, n.3, p.331-336, 2006.
- PORRAS AE, MARTIN MA, PEREZ-REQUENA J, AVALOS SE. Laryngeal tuberculosis. Rev Laryngol Otol Rhinol 2002; 123:47-8.
- PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. J. Comp. Pathol., 99: 357-99, 1988
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. Editora Guanabara, Rio de Janeiro – RJ, 2002.
- REICHMAN, L. & TANNE, J.H. Timebomb: The global epidemic of mult-drug-resistant tuberculosis. 1 ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 320 p.
- REVOREDO, R. G. Tuberculose Zoonótica: Aspectos epidemiológicos e sua relevância na Saúde Pública. (Monografia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Medicina Veterinária. Recife-PE 2014.
- RIVAS D.C; GREIF G; COITINHO C.; ARAÚJO L; LASERRA P; ROBELLO C. Primeros casos de tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium bovis*. Rev Méd Urug 2012; 28(3): 209-214
- ROSEN, G. Uma história da Saúde Pública. São Paulo: Hucitec, 1994. 423 p.
- ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A.B.; PAULA, A. *et al.* Tuberculose. In: Tarantino, A.B. Doenças Pulmonares. 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1990. p.233-97.
- ROXO, E. Avaliação da resposta imunoalérgica cutânea à tuberculina em bubalinos (*Bubalus bubalis*). São Paulo, 1996. (Tese) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- SALAZAR, F.H.P. Ocorrência de Tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no estado de Mato Grosso, Brasil. (Dissertação) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2005.

- SAURET, J.; JOLIS, R.; AUSINA, V. *et al.* Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tuber. Lung Dis.*, 73: 388-91, 1992.
- SENAI/DN, Métodos de Conservação de Alimentos e seus efeitos sobre os microrganismos. In: Elementos de apoio as sistema APPCC. Serie Qualidade e Segurança Alimentar. Projeto APPCC, convenio CNI/SENAI/SEBRAI, Brasília, 1999, 371 p.
- SILVA, L.G. Estudo anatomo-patológico e laboratorial da tuberculose bovina em matadouros do estado de Pernambuco. (Dissertação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brasil, 2015.
- SOOLINGEN, D. Van; HAAS, P.E.W. de; HAAGSMA, J. *et al.* Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* , 32 : 2425-33, 1994.
- SOUZA G.T. Tuberculose Em Primatas Não Humanos [Monografia Especialização] Universidade Castelo Branco Faculdade De Medicina Veterinária. Brasília 2008.
- SUCCI, R.C.M. Tuberculose. *Clin. Pediatr.* , 2(12): 30-8, 1976.
- THOREL, M.F. Le rôle du laboratoire dans le contrôle de la tuberculose chez les animaux. *Point Vét.* , 26 (159): 35-40, 1994.
- THOREL, M.F. & MOUTOU, F. Tuberculose et animaux sauvages. *Point Vét.* , 26 (159): 27-34, 1994.
- THOEN, C.O. & HIMES, E.M. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.*, 2: 198-214, 1986.
- TURNER, P.C.; MCLENNAN, A.G.; BATES, A.D.; WHITE, M.R.H. *Biologia molecular*. 2ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.
- VERONESI R, FOCACCIA R. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 914-74.
- VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: Aplicações e padronização de rReações. Disponível em: <<http://www.etall.hpg.ig.com.br/aula1b.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2011.
- WIEDBRAUK, D.L.; FARKAS, D.H. *Molecular methods for virus detection*. San Diego: Academic Press, 1995.
- WIESNER, E. *Enfermedades del ganado bovino*. Zaragoza, Acribia, 1973. p. 370-1.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Who meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) with the participation of FAO. Geneva, 1993.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals, 5th edition. 2004: Chapter 2.3.3. Bovine tuberculosis. Disponivel em:

http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00054.htm.

ARTIGO CIENTÍFICO

Identificação do *M. bovis* em amostras sorológicas pela PCR em rebanhos de bovinos leiteiros de Pernambuco.

Renata G. Revorêdo *, Lúcio E. H. Melo²

ABSTRACT

The bovine tuberculosis (TB), caused by the *Mycobacterium bovis*, in Brazil is a dangerous reality leading to severe economic losses and public health issues. Its gold standard diagnosis is based on cellular immune response detection through the tuberculin test. The objective of the study was to evaluate the use of PCR to identify the *M. bovis* in blood serum of bovines subjected to the tuberculin test. A hundred samples, from apparently healthy animals, chosen at random by non-probability convenience were examined for genomic identification of *M. bovis* and distributed in six groups. The PCR showed 5% (100/05) of the samples positive to the *M. Bovis*, while the tuberculin test showed 19% (19/100) of the animals with positive reactions. It was concluded that the real time PCR used in blood serum samples showed low sensitivity to be used as a tool in routine diagnosis of tuberculosis in bovine.

INDEX TERMS: Diagnosis, Blood, Tuberculosis.

RESUMO

A Tuberculose (TB) bovina no Brasil é uma perigosa realidade levando a graves prejuízos econômicos e na saúde pública, tendo como agente responsável o *Mycobacterium bovis*, sendo o diagnóstico regulamentado pelo teste da tuberculina, que detecta a resposta imune celular à infecção. Objetivou-se avaliar o uso da PCR para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em soro sanguíneo de bovinos submetidos ao teste da tuberculina. Foram examinadas 100 amostras séricas para identificação genômica do *M. bovis*, sendo os animais aparentemente hígidos, escolhidos ao acaso por conveniência não probabilística e distribuídas em seis grupos experimentais. As amostras submetidas à PCR apresentaram 5% (05/100) de positividade ao *M. Bovis* e 19% (19/100) ao teste da tuberculina. Concluiu-se que a PCR em tempo real usada em amostras de soro sanguíneos demonstrou baixa sensibilidade para ser empregada como ferramenta na rotina diagnóstica da tuberculose em bovinos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Diagnostico, Sangue, Tuberculose.

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma bacteriose infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium bovis*, de evolução crônica, debilitante e grave (RADOSTITS, 2002). Sua situação epidemiológica no Brasil não está bem descrita, uma vez que a prevalência nacional é estimada em 1,3% (BRASIL, 1994) e no Estado Pernambuco 5,7% (BRASIL, 2006) resultados inferiores a outros estudos realizado no Estado de Pernambuco, como os estabelecidos por Mendes *et al.* (2008) e por Melo *et al.* (2010), respectivamente de 15,2% e 11,5%.

A subnotificação da tuberculose bovina no Brasil, em conexão com o comércio informal de carne, leite e produtos derivados torna a doença uma grande ameaça à saúde pública (ANTORE, 1998; ABRAHÃO, 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 2 a 8% dos casos de tuberculose humana, tenha como agente causal o *Mycobacterium bovis* (COSIVE *et al.*, 1998; MELO, 1999; MELO *et al.*, 1999; MAPA, 2001; MELO *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2008).

Atualmente, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose animal (PNCEBT) preconiza como método diagnóstico oficial para tuberculose bovina o teste da tuberculina, associado à prévia avaliação clínica e exames complementares anatomopatológicos, bacteriológicos e testes de biologia molecular (BRASIL, 2006).

O teste da tuberculina apresenta algumas limitações, pois é um método laborioso e que necessita de profissional habilitado, leva tempo para a confirmação do resultado e detecta apenas a resposta imune celular dos animais à infecção (BRASIL, 1994). A tuberculose se expressa nos bovinos por diferentes configurações clínicas, gerando diferentes tipos de resposta imunológica, tornando possível ou não sua detecção por um teste específico. Além disso, fatores como final de gestação, desnutrição e tratamentos com anti-inflamatórios esteroides podem ocasionar falso-negativos (RADOSTITS, 2002).

Nesse sentido, como previsto no PNCBT (BRASIL, 2006), há a necessidade do aperfeiçoamento do diagnóstico da tuberculose voltado às inovações tecnológicas, incluindo os ensaios biomoleculares e imunoenzimáticos, cujo uso associado ao teste da tuberculina possibilitará, certamente, dimensionar a real situação dessa insidiosa doença nos rebanhos, uma vez que a utilização isolada de um meio diagnóstico não se faz suficientemente eficaz quando o objetivo é o saneamento do rebanho em menor intervalo de tempo possível.

Considerando as diversas lacunas existentes no diagnóstico precoce e preciso da tuberculose, com destaque para a necessidade de associar a facilidade no manuseio do espécime biológico a ser examinado e com a acurácia do teste, o objetivo com a realização deste estudo foi avaliar o uso da PCR para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em soro sanguíneo bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e processamento laboratorial

Foram considerados neste estudo 100 bovinos adultos, saudáveis, fêmeas, de aptidão leiteira, escolhidos ao acaso e submetidos ao exame clínico geral, de seis criatórios localizados nos municípios de Gravatá, Belo Jardim, São Lourenço da Mata e Camaragibe, estado de Pernambuco, representando a amostragem aproximadamente 10% dos rebanhos (Tab.1).

TABELA 1: Distribuição das amostras

	GRUPO	PROPRIEDADES	NUMERO DE AMOSTRAS
	01	A	18
	02	B	12
	03	C	08
	04	D	14
	05	E	17
	06	F	31
TOTAL	06	06	100

Amostras de sangue foram obtidas de cada animal, por venopunção da jugular, e acondicionadas em tubos plásticos, sem anticoagulante e em temperatura ambiente, para posterior processamento e armazenamento de alíquotas de soro sanguíneo a -20°C (Fig. 1) para posterior análise pela PCR em Tempo Real.

Posteriormente, os bovinos foram submetidos ao teste da tuberculina pela técnica cervical comparativa - TCC, em conformidade com os procedimentos de referência contidos no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT (BRASIL, 2006).

Extração de DNA e PCR em Tempo Real

Após a extração, seguindo a técnica de fenol/clorofórmio, de acordo com a metodologia descrita por Maniatis *et al.*, (1989), com modificações nas proporções das soluções, o DNA foi submetido à técnica de PCR em Tempo Real, em duplicatas, no equipamento Rotor-Gene Q (QIAGEN) para amplificação da sequência específica para *Mycobacterium bovis*, utilizando primers convencionais (SALES *et al.*, 2013), (tabela 2).

Tabela 2. Gene alvo, sequência de *primers* e comprimento do fragmento amplificado para o *M. bovis*.

Gene alvo	Sequência de <i>primers</i> 5' à 3'	Fragmento (pares de base)
Mbo RD4	D ^a – CGC CTT CCT AAC CAG	268
	AAT TG	
	R ^b – GGA GAG CGC CGT TGT	
	AGG	

^a Direto, ^b reverso.

Para a amplificação foi utilizado o kit QuantiFast™ SYBR Green PCR com os volumes de: Master Mix (2x) 7,5 µL, H₂O 4,1 µL, primers (Forward e Reverse) 0,2 µL de cada na concentração (2pMol) e DNA 3,0 µL com volume final da reação de 15 µL.

Para determinar a eficiência da curva padrão (Fig. 2), foi solicitado ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-PE), a qual foi determinado a concentração de até 100 nanogramas no espectrofotômetro NanoVue™ GE Healthcare. A amostra foi diluída na escala logarítmica na base 10.

Análise Estatística

Foram determinadas sensibilidade, especificidade e acurácia do teste da PCR com base nas equações de Thrusfield (2004), considerando o teste da tuberculina como padrão-ouro. Para determinar as frequências absoluta e relativa, utilizou-se o método descritivo de acordo com Sampaio (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao exame clínico geral, nenhum animal deste estudo apresentava sinais sugestivos de Tuberculose.

No teste da tuberculina constatou-se um elevado grau de disseminação do *M. Bovis* na população estudada: 16% (16/100) dos bovinos apresentaram positividade e estavam presentes em 67% (4/6) dos rebanhos avaliados, constituindo a maioria deles como focos de TB.

Estes resultados são compatíveis com os estabelecidos por Mendes *et al.* (2008) e por Melo *et al.* (2010), que estimaram prevalências de 15,2% e 11,5%, respectivamente, bem superiores às notificadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Porém, são superiores a prevalência nacional, estimada em 1,3% (BRASIL, 1994) e aos 5,7% aferidos para rebanhos de Pernambuco nos catálogos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2006). Evidenciam que a tuberculose bovina deve ser tratada como uma questão de saúde pública, principalmente pela existência de comércio informal de leite e produtos derivados, associado ao hábito cultural e socioeconômico das pessoas consumirem esses produtos de forma *in natura*, corroborando com os alertas de pesquisadores (ANTORE, 1998; ABRAHÃO, 2005; MELO *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2008) e da OMS (COSIVE *et al.*, 1998) para a possível ocorrência de infecção humana de origem bovina.

Esta situação clínico-epidemiológica crítica da tuberculose bovina, constatada pelo teste da tuberculina em alguns rebanhos do estado de Pernambuco, impulsionou a realização deste estudo.

Os resultados obtidos pela PCR em tempo Real demonstraram a presença de material genético do *M.bovis* no soro de bovinos de três (1, 3 e 6) dos seis rebanhos examinados (50% - 3/6). Considerando a população estudada, foi constatada uma frequência de 5% (5/100) de bovinos que apresentaram positividade à PCR (TABELA 3) (FIGURA 3).

Os resultados obtidos pelo teste da tuberculina demonstraram a presença de bovinos positivos em quatro (1, 4, 5 e 6) dos seis rebanhos examinados (66,7% - 4/6), distribuídos em uma frequência de 16% (16/100). (TABELA 3).

TABELA 3: Identificação dos animais positivos.

GRUPO	AMOSTRAS	TCC	PCR
01	01	POSITIVO	POSITIVO
01	02	POSITIVO	NEGATIVO

01	03	NEGATIVO	POSITIVO
01	12	NEGATIVO	POSITIVO
03	03	NEGATIVO	POSITIVO
04	01	POSITIVO	NEGATIVO
04	02	POSITIVO	NEGATIVO
05	01	POSITIVO	NEGATIVO
05	02	POSITIVO	NEGATIVO
05	03	POSITIVO	NEGATIVO
06	03	POSITIVO	NEGATIVO
06	04	POSITIVO	NEGATIVO
06	05	POSITIVO	NEGATIVO
06	06	POSITIVO	NEGATIVO
06	08	POSITIVO	NEGATIVO
06	09	POSITIVO	NEGATIVO
06	11	POSITIVO	NEGATIVO
06	12	POSITIVO	NEGATIVO
06	25	NEGATIVO	POSITIVO
06	31	POSITIVO	NEGATIVO

Analisados conjuntamente, os resultados obtidos nos dois testes demonstraram que dos seis rebanhos examinados cinco (1, 3, 4, 5 e 6) apresentaram bovinos positivos a um ou a outro teste, mas em dois (rebanhos 1 e 6) foi observada positividade simultânea a ambos os testes e em apenas um (rebanho 2) não foi identificado bovino positivo a nenhum dos testes. Por outro lado, apenas um animal (1%) apresentou positividade simultânea aos dois testes.

Embora não possam ser conclusivos em decorrência do uso incipiente do soro bovino como espécime biológico analisado pela PCR, a alta especificidade do teste da tuberculina na configuração simultânea, referência no Brasil (BRASIL, 2006), em conexão com a inexistência

de bovino positivo em apenas um rebanho, evidenciam que a tuberculose encontra-se disseminada nos rebanhos examinados, devendo a maioria deles, em um processo de saneamento, ser considerada rebanhos-focos de tuberculose.

Reconhece-se o potencial da PCR em tempo Real para identificar infecções precoces em outros espécimes biológicos (SAMPAIO *et al*, 2012; SOUZA, 2013; ARAUJO, 2014; CARVALHO *et al.*, 2014). Neste sentido, o desafio deste estudo foi avaliar a acurácia da PCR em tempo real para pesquisa de *M. bovis* em amostras de soro bovino, comparativamente ao teste da tuberculina, sendo os resultados apresentados na tabela 3.

Desta forma, a sensibilidade e a especificidade da PCR em tempo real, considerando sua aplicação em amostras de soro sanguíneo bovino para a identificação do *M. bovis*, foram de 6% e 95%, respectivamente, resultando em uma acurácia de 81%.

TABELA 4: Testes Estatísticos.

TESTE ESTATISTICO	RESULTADO
SENSIBILIDADE	6 %
ESPECIFICIDADE	95%
VALOR PREDITIVO +	20%
VALOR PREDITIVO -	84%
ACURACIA	81%
FREQUENCIA RELATIVA	5%
FREQUENCIA ABSOLUTA	5/100

Até então nenhum novo método apresentou desempenho suficiente para justificar a substituição do teste da tuberculina, considerado ainda como padrão ouro pelo MAPA para o diagnóstico da TB bovina.

Sabe-se que ocorre a eliminação do *M. Bovis* pelos diversos fluidos corporais (BRASIL, 2006), que após infectar o hospedeiro, as bactérias geralmente progridem pelas vias hematogena ou linfática até alcançar outros sistemas (BIER, 1984). Considerando que o soro sanguíneo constitui a parte do sangue rica em água, proteínas, anticorpos, hormônios, entre outros, e, ainda, é de fácil armazenamento e transporte (LOPES *et al*, 2007), julgou-se necessário avaliar a aplicabilidade da PCR- Tempo Real para pesquisa de *M. bovis* em soro sanguíneo.

Os primers constituem um ponto crítico e limitante da reação da PCR (NASCIMENTO *et al.*, 2010), porém, segundo Sales *et al* (2014), o primer utilizado neste estudo encontra-se validado com sensibilidade e especificidade de 100%.

A baixa detecção da tuberculose por meio da PCR pode ser decorrente de alguns entraves ainda existentes relacionados à técnica, como, por exemplo, a falta de padronização para uso em soro sanguíneo (MARTIRE, 2009).

A PCR, quando aplicada em outros materiais biológicos, tais como secreções respiratórias, tecidos e leite, demonstra uma elevada sensibilidade e especificidade (SAMPAIO *et al*, 2012; SOUZA, 2013; ARAUJO, 2014; CARVALHO *et al.*, 2014), porém, quando usada para análise em sangue total apresenta-se com uma baixa sensibilidade (LIMA *et al*, 2009).

Neste estudo, o fato da maioria dos animais terem apresentado resultados dispare aos testes provavelmente esteja ligado a fase da infecção, os 2 testes detectam resposta aguda, porém há uma variação de tempo, o período de bacteremia por *M. bovis* é curto e raro (WADDELL *et al*, 2001), e o tempo de modulação de uma resposta de hipersensibilidade retardada é superior a um mês, animais infectados a menos de 40 dias, assim como infecções crônicas, não respondem ao teste tuberculínico, e um único teste não garante ausência da infecção (BRASIL, 2001).

Neste contexto, admite-se que a baixa sensibilidade da PCR encontrada possa estar relacionada à fatores ligados a técnica diagnóstica e a própria patogenia da doença (BIER, 1984; MARTIRE, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

O teste da tuberculina, de natureza essencialmente imunoalérgica, apresentou maior confiabilidade mediante a PCR em tempo Real, tendo um maior potencial no diagnóstico na fase aguda da infecção, representando, assim, um ponto crítico na identificação, controle e erradicação da tuberculose nos rebanhos (BRASIL, 2006).

CONCLUSÃO

A ocorrência da tuberculose na maioria dos rebanhos bovinos testados evidencia a importância da inclusão de novos componentes para o diagnóstico precoce desta infecção, mas o uso da PCR em tempo real, apesar do seu reconhecido potencial para identificar a infecção precoce em outros espécimes biológicos, não apresentou sensibilidade confiável no exame de soro bovino para ser empregada como ferramenta na rotina diagnóstica da tuberculose.

Apesar disso, e com a compreensão de que os protocolos de diagnóstico ainda não permitem o saneamento rápido dos rebanhos, a PCR em tempo real possibilitou identificar a presença do *M. bovis* em amostras de soro bovino examinadas, ratificando o teste da tuberculina quanto à ocorrência da tuberculose em criações de bovinos leiteiros de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco de transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. *Archives of Veterinary Science*, v.10, n.2, p.1-17, 2005.
- ANTORE, A. 41% da produção de leite é clandestina. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 30 ago. 1998. Caderno 3, p.1-4.
- ARAUJO, F. Embrapa desenvolve teste que promete melhorar o diagnóstico da tuberculose. Embrapa, Campo Grande, MS, 2014. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/embrapa-desenvolve-teste-que-promete-melhorar-o-diagnostico-da-tuberculose-88599n.aspx>
- ARAUJO, C.P. Desenvolvimento de nested pcr para a detecção de dna de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de bovinos e bubalinos. Tese de doutorado. UFMS, Campo Grande, MS, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, Pernambuco, 1994.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2001. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.
- BAPTISTA FILHO, L.C.F. Análise leucométrica em bovinos Tuberculinizados e sua aplicação no monitoramento da leucose enzootica em rebanhos do estado de Pernambuco. (Dissertação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco, 2012.

- BIER, O. Bacteriologia e imunologia. 19ª ed. São Paulo, Edições Melhoramentos, 1984. p.585-610: Micobactérias.
- CARVALHO, R.C T; CASTRO, V.S; FERNANDES, D.V.G.S; MOURA, G; SOARES, E.S; FIGUEIREDO, E.E.S; PASCHOALIN, V.M.F. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. Uso da PCR para detecção de bacilo da tuberculose bovina em leite de vacas positivas ao teste cutâneo. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. Seção de Publicação do Periódico. Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 51, n. 1, 2014.
- COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUGIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerging infectious Diseases, v.4, n.1, 1998.
- LEMOS, R. A. A. Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico. Campo Grande: Editora UFMS, 1998. 536 P.
- LIMA, J.F.C; MONTENEGRO, L.M.L; MONTENEGRO, R A; CABRAL, M.M.L; LIMA, A.S; ABATH, F.G.C; SCHINDLER, H.C. Jornal Brasileiro de Pneumologia. Desempenho da técnica nested PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. J. bras. pneumol. vol.35 no.7 São Paulo July 2009.
- LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A.P. Manual de Patologia Clínica Veterinária. 3º ed. Santa Maria-UFMS. 2007.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. (Eds.) Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- MARTIRE, T.M. Diagnóstico laboratorial da tuberculose na infância: métodos convencionais e métodos rápidos. Publicação Oficial da Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. Pulmão RJ, Suplemento de Pneumopediatria, Rio de Janeiro, n.1, p.20, supl.27, 2009.
- MELO, L.E.H. Avaliação da Intercorrência entre Leucose Enzoótica, Tuberculose e Leptospirose dos bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo. USP, 1999, São Paulo. (Tese) Universidade de São Paulo.

- MELO, L E H.; D'ANGELINO J. L.; CASTRO, R.S.; SOARES, P. C.; SCHALCH, U.M.; PACHECO, J.C.G.; BENATTI, L.A.; WANDERLEY, P. A.; SÔNIA, R.P. Prevalência de vacas reagentes à tuberculinização simultânea em rebanhos produtores de leite do tipo C do Estado de São Paulo. *Ciência Veterinária nos trópicos*, Recife-PE, v. 2, n. 2, p. 91-99, 1999.
- MELO, L.E.H.; MELO, M.T.; ALMEIDA, A.V.; SALDANHA, S.V.; EVÊNCIO-NETO, J.; TENÓRIO, T.G.S.; WANDERLEY, E.K; NASCIMENTO, E.T.S.; FERNANDES, A.C.C.; SÁ, L.M.; BARBOSA, D.F.A.; SOUTO, R.J.C. Intercorrência entre tuberculose bovina e caprina: um fator de risco da tuberculose zoonótica no Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 1, 2005, Guarapari. Anais... Guarapari : Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2005.
- MELO, L.E.H.; MELO, M.T.; LEITE, J. E. B.; MAIA, F. C. L.; MOTA, R. A.; SCHINDLER, H. C.; LIMA, J. F.C.; CASTRO, R. S.; SANTOS, N. V. M.; SÁ, L. M. Tuberculose Caprina: aspectos nosológicos, radiológicos, anátomo-histopatológicos e presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em caprinos leiteiros do Estado de Pernambuco, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (Conbravet), 35, 2008, Gramado, Anais... Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2008.
- MELO, L.E.H.; FERNADES, A.C.C.; SILVA, T.I.B.; TENÓRIO, T.G.S.; MENDES, E.I.; BAPTISTA FILHO, L.C.F. Estudo retrospectivo e prospectivo da intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. In: Seminário Nacional Sobre Brucelose e Tuberculose Animal (SNBTA). 2010. Belo Horizonte, 2010.
- MENDES, E.I.; FERNADES, A.C.C.; SÁ, L.M.E.; SILVA, T.I.B.; BARROS, A.D.; OLIVEIRA, C.M.M.; ALBUQUERQUE, M.S.; SILVA, F.F.; MELO, L.E.H. Prevalência da leucose enzoótica e da tuberculose dos bovinos em rebanho leiteiros do Estado de Pernambuco. In: 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET). Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 2008.
- NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Revista Brasileira de Medicina*, São Paulo, v.67 supl. 10, 2010.

- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. Editora Guanabara, Rio de Janeiro – RJ, 2002.
- SOUZA, M.A. Tuberculose Bovina: Diagnostico intradermico e exames complementares em propriedade de exploração leiteira. Uberlandia, MG, Brasil, 2013. (Dissertação) – UFU.
- SALES, M.L; FONSECA JR, A.A; ORZIL, L; ALENCAR, A.P; HODON, M.A; ISSA, M.A; SOARES FILHO, P.M; SILVA, M.R; LAGE, A.P; HEINEMANN, M.B. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. *Genetics and Molecular Research* 13 (2): 4607-4616. 2014.
- SAMPAIO I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 221p.
- SAMPAIO J.L.M; GRANATO C; LAZARI C.S. Fleury, Medicina e Saude: Revista Medica. Pesquisa molecular de micobacterias. Fleury. São Paulo- SP, 2012.
- THRUSFIELD M.V. 2004. Epidemiologia Veterinária. 2ª ed. Roca, São Paulo. 556p.

ANEXOS

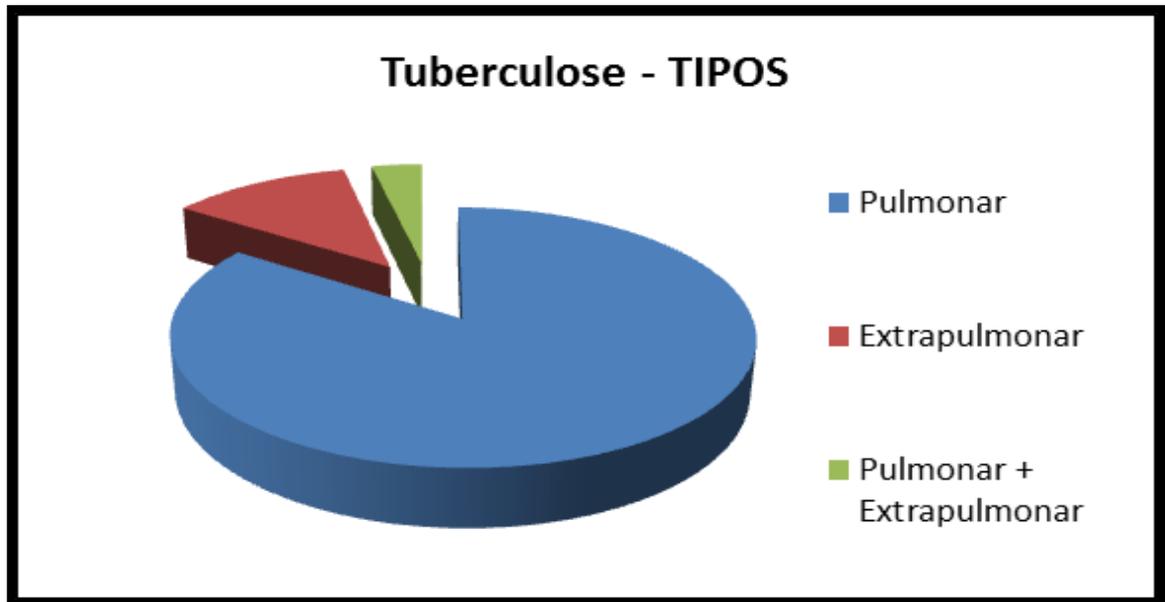


FIGURA 3: Diferentes tipos da Tuberculose.
FONTE: REVORÊDO, 2014.

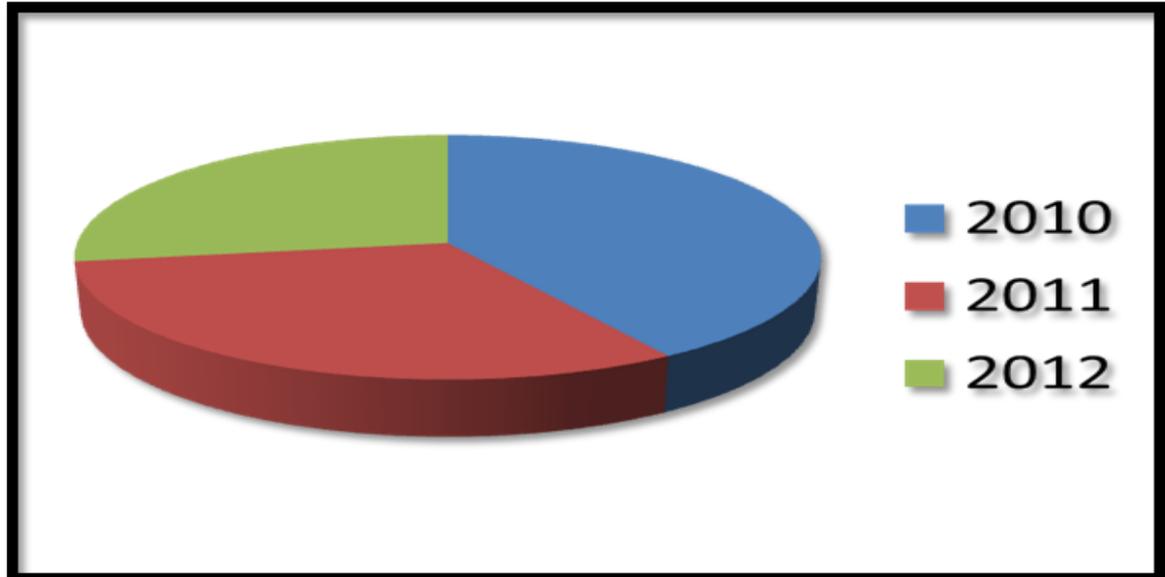


FIGURA 4: Percentual de abandono do tratamento da Tuberculose.
FONTE: REVORÊDO, 2014.

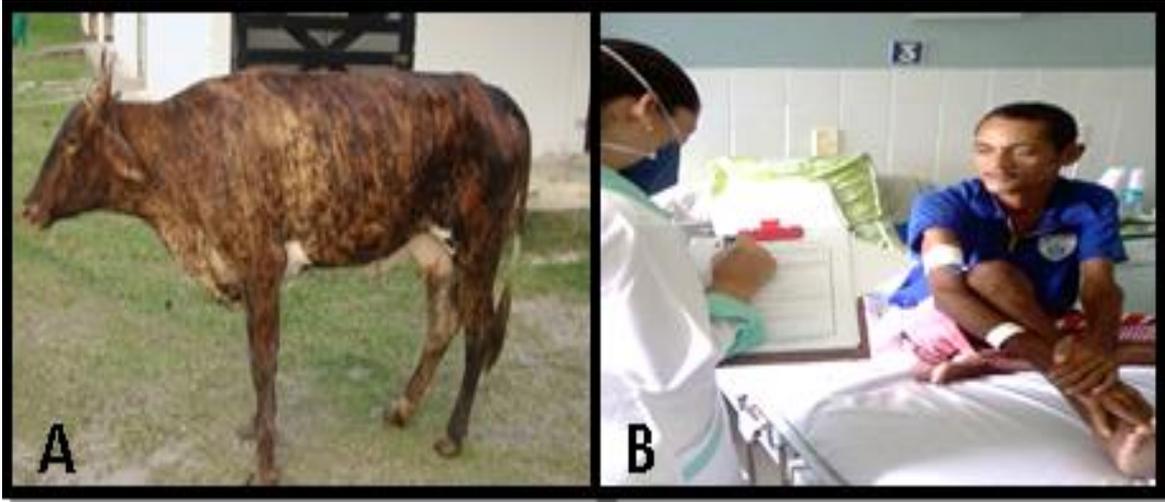


FIGURA 5: (A) Paciente bovino Tuberculoso, (B) Paciente humano tuberculoso.
FONTE: Arquivo Pessoal.



FIGURA 6: (A) Cutimetria, (B) Tuberculinização e (C) Leitura da Tuberculinização.
FONTE: Arquivo Pessoal.

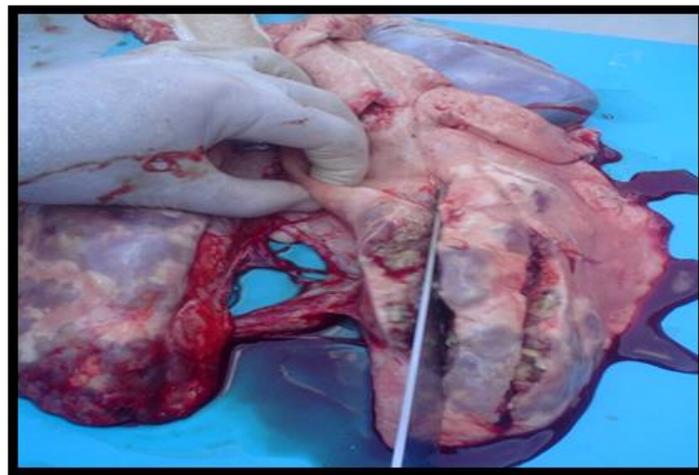


FIGURA 7: Pulmão bovino apresentando lesões sugestivas de Tuberculose.
FONTE: MELO, 2010.

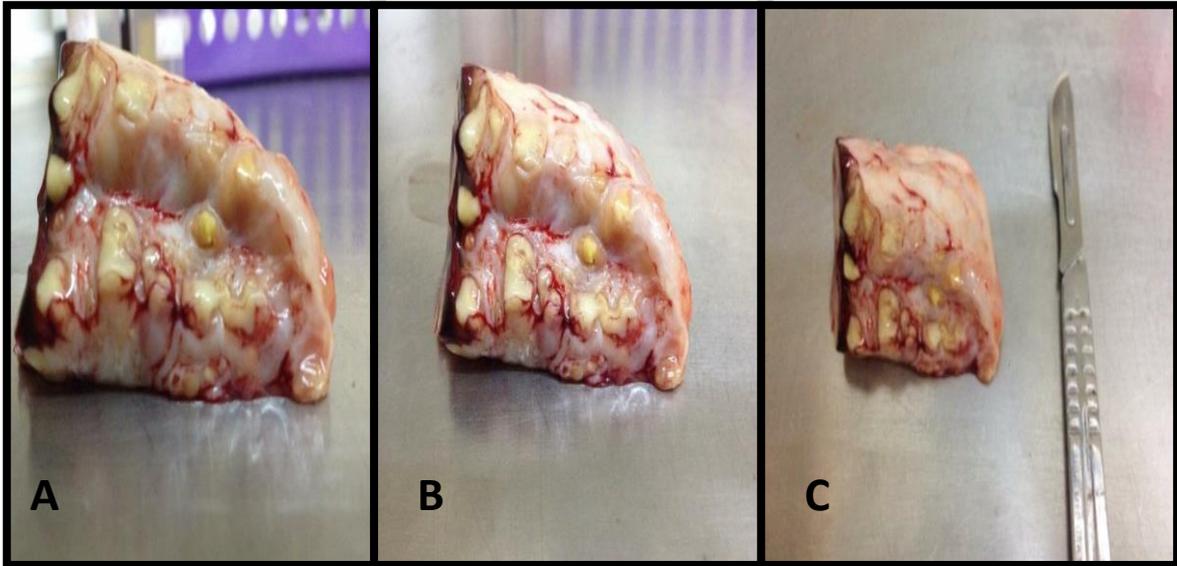


FIGURA 8: (A), (B) e (C) Linfonodo bovino apresentando lesões Tuberculosas.
FONTE: SILVA, 2015.

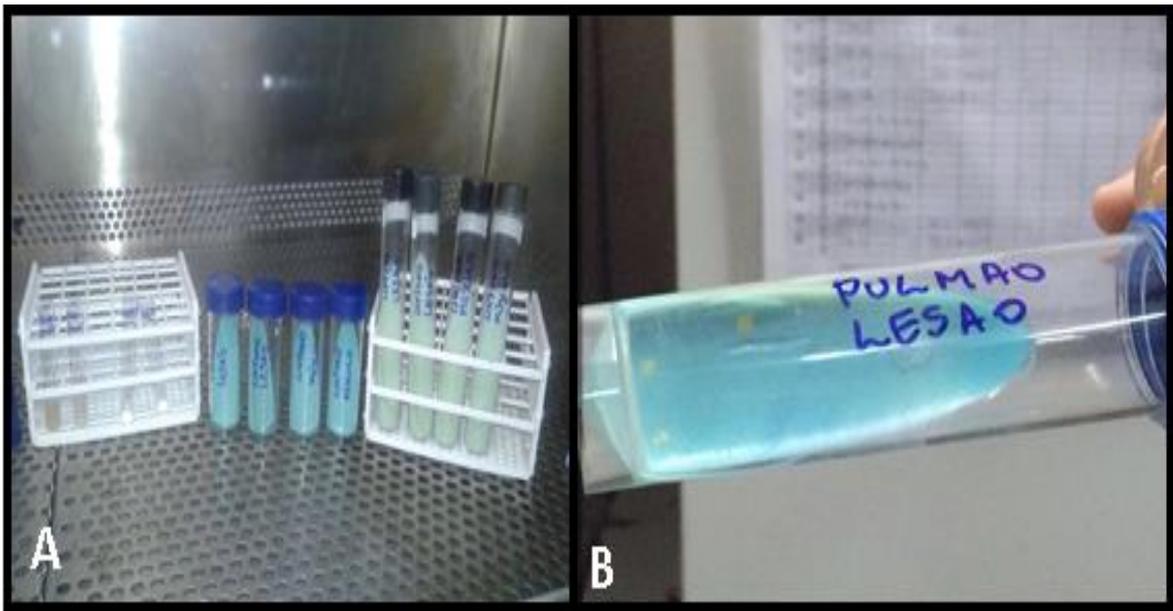


FIGURA 9: (A) Estufa com Culturas para Micobacterias, (B) colônias de micobacterias .
FONTE: SILVA, 2015.

- Artigo:

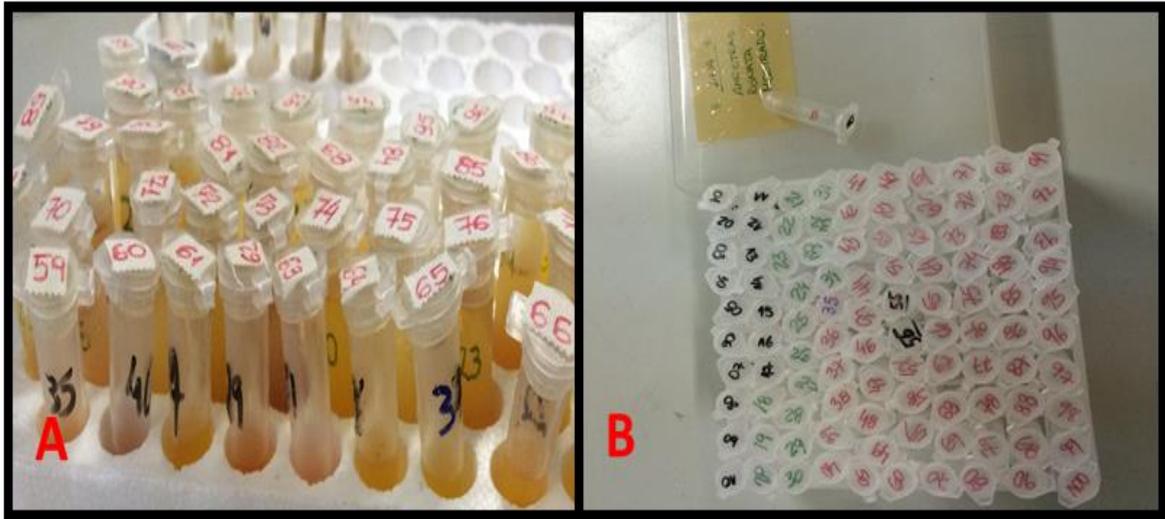


FIGURA 1: (A) Amostras de soro sanguíneo bovino, (B) Amostras de DNA extraído de soro sanguíneo.

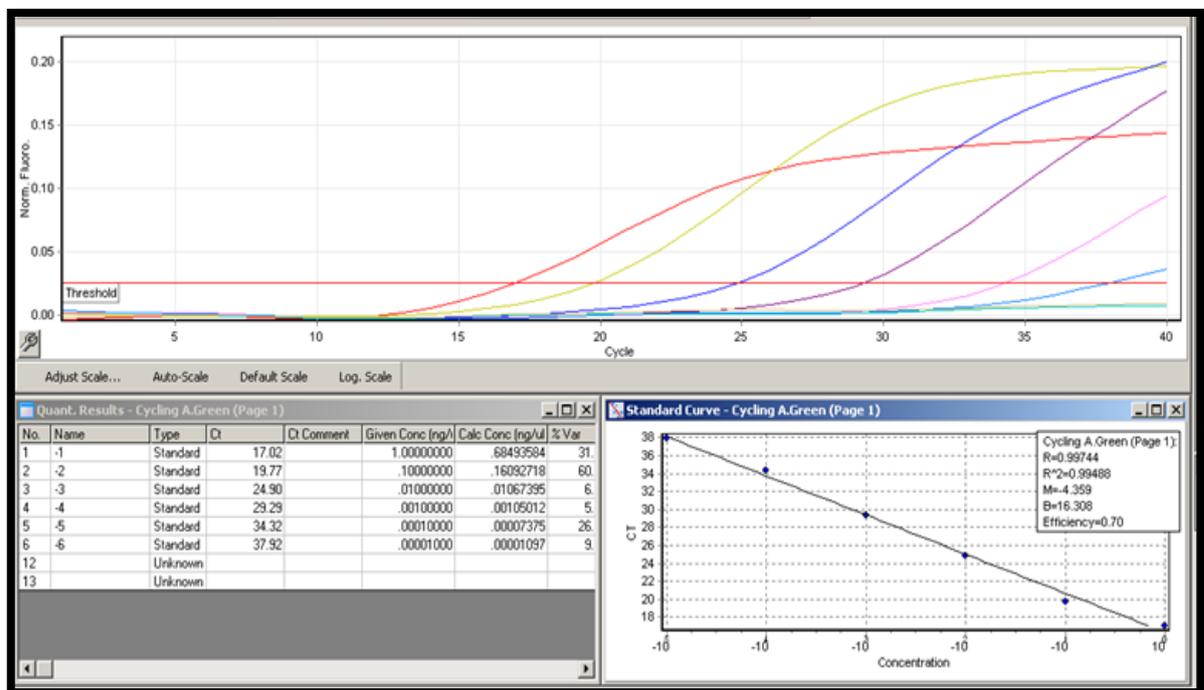


FIGURA 2: Curva padrão.

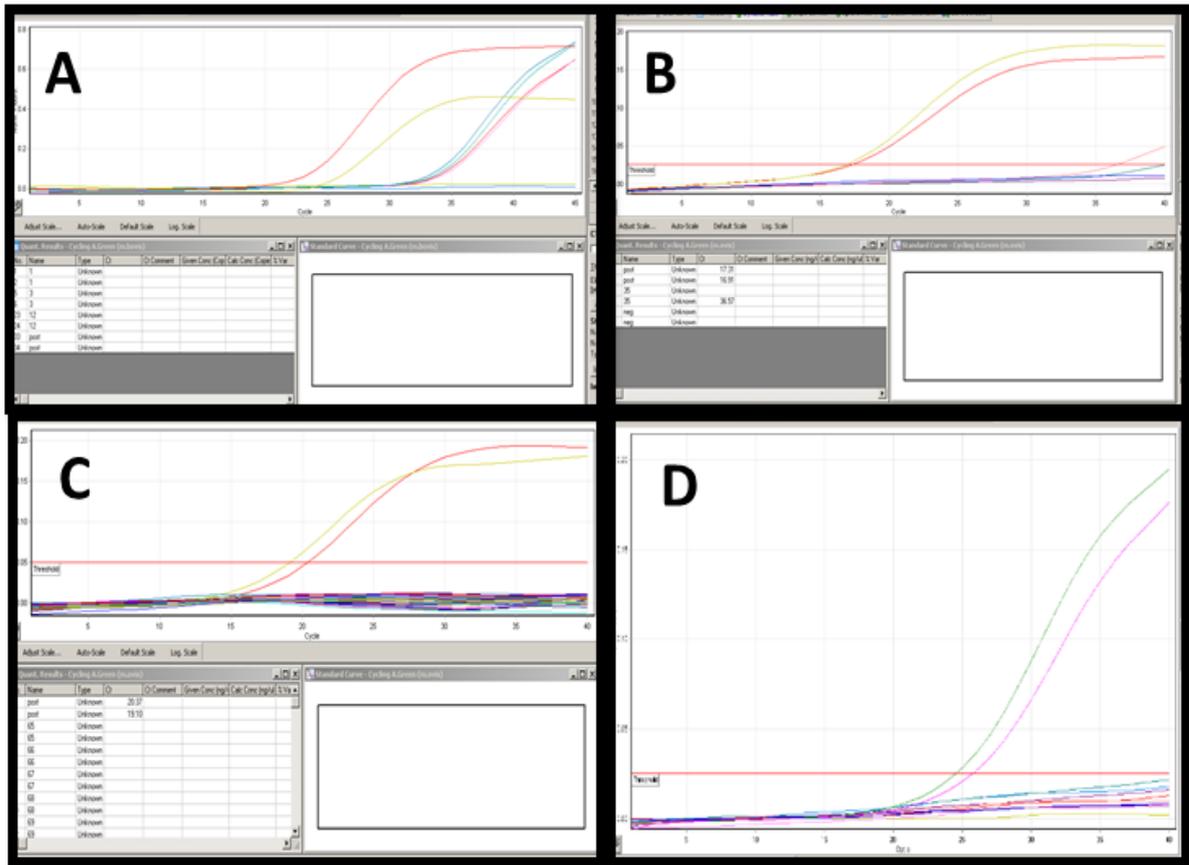


FIGURA 3: (A) e (B) Resultados Positivos na PCR em tempo real para identificação de *Mycobacterium bovis*, (C) e (D) Resultados Negativos na PCR em tempo real para identificação de *Mycobacterium bovis*