

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E MOLECULAR DE**  
**LESÕES GRANULOMATOSAS SUGESTIVAS DE**  
**TUBERCULOSE BOVINA**

**Renata Furlan Pereira de Souza**

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E MOLECULAR DE**  
**LESÕES GRANULOMATOSAS SUGESTIVAS DE**  
**TUBERCULOSE BOVINA**

**Renata Furlan Pereira de Souza**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Ass. Dr<sup>a</sup> Maria Cecília Rui Luvizotto**

**Co-orientador: Prof. Titular Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2013

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**RENATA FURLAN PEREIRA DE SOUZA** – nascida em 08 de fevereiro de 1987, na cidade de Itapetininga-SP, graduada em Medicina Veterinária em 2010 pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina-SP, atuou como professora colaboradora na mesma instituição, e atualmente é aluna do curso de Pós Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, São Paulo, na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica.

## EPÍGRAFE

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um  
pode começar agora e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha amada mãe Lúcia Helena Furlan, que é meu maior exemplo de luta, perseverança, apoio e amor incondicional. Mamas, a senhora é o principal motivo desta realização. TE AMO!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade da vida e por colocar pessoas tão maravilhosas em meu caminho.

A Prof<sup>a</sup> Maria Cecília Rui Luvizotto não só pela orientação, mas também pela amizade, pela confiança e principalmente por acreditar no meu trabalho.

Ao Prof. Vasco Ariston Carvalho de Azevedo pelos conhecimentos dados na área molecular e pela oportunidade de trabalhar com uma ótima equipe, disponibilizando todos os recursos de seu laboratório.

Ao amigo e professor Heitor Flávio Ferrari, pois graças a sua dedicação e seus ensinamentos que me apaixonei pela área de Patologia. Você com certeza mostrou e iluminou meu caminho. *“MUITO OBRIGADA!”*

A Fundação Educacional de Andradina pelos ensinamentos dados e pelo incentivo para atuar na área de pesquisa.

A UNESP de Araçatuba pela oportunidade e toda a equipe da pós-graduação pelo apoio e excelente atuação.

A CAPES pelo financiamento e auxílio fornecido.

A minha amiga Dayana Ribeiro pela amizade verdadeira e companheirismo. Você foi a peça fundamental para concluir este estudo. Serei eternamente grata.

Aos amigos do LGCM-UFMG, em especial Dorella e Ulisses que não mediram esforços para me auxiliar, criando um laço de amizade que ficará para sempre em minha memória.

A Prof<sup>a</sup> Silvia Perri que sempre mantém as portas abertas aos seus alunos.

Ao Prof. José Osmar que possibilitou as coletas sempre disposto a ajudar no que estivesse ao seu alcance.

A equipe do SIF de Andradina, em especial ao Vinícius e Maria Elze pela disposição, atenção e ajuda durante as coletas.

A minha família que acompanhou todos os passos da minha vida. Vocês são minha fonte de inspiração e confiança. Amo vocês.

As minhas amigas Ingrid, Bebel e Stella que acompanharam de perto esta trajetória me acolhendo carinhosamente. Vocês são muito especiais.

Aos amigos e colegas que diretamente e indiretamente me ajudaram a concluir mais um sonho.

***MUITO OBRIGADA!***

## SUMÁRIO

	Pag.
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
Objetivo geral.....	21
Objetivos específicos.....	21
Referências.....	22
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES GRANULOMATOSAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA.....	30
Resumo.....	30
Palavras-Chave.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	33
Amostras / Espécimes.....	33
Macroscopia.....	33
Microscopia.....	33
Cepas bacterianas (controle).....	34
Isolamento do DNA.....	34
Concentração e purificação do DNA extraído.....	35
Amplificação de DNA pela PCR.....	35
Reamplificação da PCR-IS6110.....	36
Análise estatística.....	37
Resultados.....	37
Análise macroscópica.....	37
Análise microscópica.....	38
Análise molecular.....	40
Discussão.....	45
Conclusão.....	47
Referências.....	48

## LISTA DE TABELAS

	Pag.
TABELA 1 - Caracterização dos estágios de granulomas em linfonodos bovinos.....	38
TABELA 2 - Diferentes métodos de diagnóstico para tuberculose de acordo com a classificação da lesão histológica.....	42
TABELA 3 - Diferença de positividade para <i>Mycobacterium</i> sp. em amostras teciduais bovinas de acordo com a técnica molecular para o gene alvo IS6110.....	43

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1 - Linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. ....	37
FIGURA 2 - Classificação histológica de granulomas em linfonodos de bovinos .....	39
FIGURA 3 - Bacilos ácido-álcool-resistentes observados em linfonodos de bovinos naturalmente infectados por <i>Mycobacterium sp.</i> .....	40
FIGURA 4 - Eletroforese em gel de agarose 1%: produtos de extração de DNA.....	41
FIGURA 5 - PCR realizada em DNA micobacteriano. A) PCR do gene <i>hsp65</i> com produto de 439 pb . B) PCR do gene IS6110 com produto de 123 pb.....	41
FIGURA 6 - Eletroforese em gel de agarose 2%. A) PCR-IS6110 B) Reamplificação das mesmas amostras.....	44

## **ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES GRANULOMATOSAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA**

**RESUMO** - A tuberculose bovina é uma enfermidade infectocontagiosa granulomatosa crônica de carácter zoonótico causada pelo *Mycobacterium bovis*. Essa bactéria pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* que corresponde a um grupo de micobactérias filogeneticamente relacionadas, que apresentam considerável dificuldade no diagnóstico direto em amostras teciduais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar linfonodos por meio de diagnóstico histopatológico e molecular, visando à detecção direta do agente em tecido. Durante a linha de inspeção de abate em frigorífico, foram selecionados 150 linfonodos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Na análise histológica pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), 100% das amostras apresentaram lesões microscópicas compatíveis com tuberculose. A coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) evidenciou a presença de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) em 6 (4%) amostras. O método de extração para a análise molecular apresentou bons resultados, mas a amplificação dos fragmentos de DNA dos genes hsp65 e IS6110 resultaram em baixa sensibilidade. Contudo a reamplificação do gene IS6110, resultou em positividade de 63,3%, indicando que a dificuldade do diagnóstico molecular em amostras teciduais esta relacionada a quantidade reduzida de bactérias presentes nas amostras.

**Palavras-chave:** diagnóstico, histopatologia, *Mycobacterium*, reação em cadeia da polimerase, tecidos.

## HISTOMORPHOLOGIC ANALYSIS AND MOLECULAR GRANULOMATOUS LESIONS SUGGESTIVE OF BOVINE TUBERCULOSIS

**SUMMARY** - Bovine tuberculosis is a chronic granulomatous infectious disease of zoonotic nature caused by *Mycobacterium bovis*. This bacterium belongs to the *Mycobacterium tuberculosis* complex which corresponds to a group of phylogenetically related mycobacteria, which have considerable difficulty in diagnosing directly in tissue samples. The objective of this study was to evaluate lymph nodes through histopathologic diagnosis and molecular targeting the direct detection of the agent in tissue. During the inspection line slaughter in a fridge, we selected 150 nodes with macroscopic lesions suggestive of tuberculosis. In histological analysis by staining Hematoxilia-eosin (HE), 100% of the samples had microscopic lesions compatible with tuberculosis. The coloring Zielh-Neelsen (ZN) revealed the presence of acid-resistant bacilli (AFB) in 6 (4%) samples. The extraction method for molecular analysis showed good results, but the amplification of DNA fragments of hsp65 genes and IS6110 resulted in low sensitivity. However, the reamplification of IS6110 gene resulted in 63.3% positivity, indicating the difficulty of tissue samples for molecular diagnosis related to this reduced amount of bacteria present in samples.

**Keywords:** diagnosis, histopathology, *Mycobacterium.*, polymerase chain reaction, tissues.

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário internacional por possuir o maior rebanho bovino comercial do mundo, ocupar o segundo lugar no ranking dos principais países produtores e exportadores de carne, e ser o quinto maior produtor de leite (ANUALPEC, 2011 IBGE, 2010;), o que garante grande impulso a economia nacional.

Para alcançar esse patamar, é fundamental garantir a sanidade animal, a qualidade e a segurança dos alimentos. No caso das carnes, essa garantia é tida com o controle total do desenvolvimento dos animais, tendo um enfoque especial na questão do controle das doenças, considerada o fator mais importante da qualidade, principalmente as de caráter zoonótico (VALLE, 2011).

Dentre as doenças que acometem os bovinos, a tuberculose é uma zoonose de ocorrência mundial (ABRAHÃO et al., 1998), que acomete homens e animais há milênios (BRASIL, 2006; CORREA; CORREA, 1992). Trata-se de uma doença altamente disseminada e extremamente importante sob o ponto de vista de saúde pública, que causa grandes impactos econômicos na produção pecuária e no comércio (OLIVEIRA et al., 2007).

Os prejuízos na cadeia produtiva da carne e do leite, em função da tuberculose, estimados entre 10 e 25%, estão vinculados às perdas diretas e indiretas, resultantes da morte de animais, queda no ganho de peso, diminuição da produção, descarte precoce, eliminação de animais de alto valor zootécnico e da condenação de carcaças em frigorífico sob inspeção sanitária (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997; SABEDOT et al., 2009). Além disso, a presença da doença no rebanho nacional torna o produto, resultante da pecuária, vulnerável às barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional (SABEDOT et al., 2009).

No Brasil, estima-se a existência de 200 mil bovinos infectados entre o rebanho nacional (LEITE et al., 2003). Suspeita-se que o agente causador da

tuberculose bovina seja responsável por 5% dos casos de tuberculose humana descritos anualmente, mostrando a importância de controlar, de forma adequada, a transmissão da doença por meio de produtos de origem animal (WHO, 1993).

Por se tratar de uma doença de caráter zoonótico impactante e levando em consideração os prejuízos pecuários que ocasiona, em 2001, foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) que visa combater ambas as enfermidades, diminuindo a incidência e prevalência das mesmas, a fim de minimizar perdas econômicas e oferecer garantias de inocuidade dos alimentos, tanto carne como leite e derivados ao consumo interno, além de aumentar a competitividade dos nossos produtos no mercado internacional. O órgão responsável por essa fiscalização é o Serviço de Inspeção Federal (SIF) respeitando a legislação vigente na Regulamentação da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) de responsabilidade do Departamento e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do MAPA (BRASIL, 2006).

A tuberculose bovina é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica, caracterizada por lesões granulomatosas que podem ser encontradas em qualquer órgão ou tecido (COUSIN et al., 2004), cujo agente etiológico é o *Mycobacterium bovis*, pertencente a ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, e gênero *Mycobacterium*, que possui amplo espectro de patogenicidade para várias espécies domésticas e silvestres, constituindo-se a principal causa da tuberculose animal (IMAEDA, 1985). Esta bactéria é uma das espécies causadoras de tuberculose em diversos mamíferos, inclusive o homem, que constitui um grupo de bactérias filogeneticamente relacionadas, o chamado complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) dos mamíferos, composto das seguintes espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis* incluindo o derivado vacinal *M. bovis* - *Calmette & Guérin* (BCG), *M. africanum* (subtipos I e II), *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (COUSIN et al., 2004; HERRERA-LÉON et al., 2009; SOMMER e WOOD, 1985).

Os membros do CMTB são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), curtos, aeróbicos, imóveis, não capsulados, não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, e medindo de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  de comprimento por 0,3  $\mu\text{m}$  de largura (CORREA; CORREA, 1992).

Apesar de variarem em relação a patogenicidade, geografia, epidemiologia e características morfológicas (HUARD et al., 2003), as bactérias do CMTB são altamente relacionados sob o ponto de vista taxonômico (ABALOS; RETAMAL, 2004), com notável homogeneidade nucleotídica que alcança de 85-100% da relação DNA-DNA (FROTHINGHAM et al., 1994; IMAEDA, 1985).

Os reservatórios são os próprios animais domésticos doentes clínicos e subclínicos, e, algumas vezes, animais silvestres. As principais vias de infecção são as vias aéreas (80 a 90%) e alimentar, entretanto existem várias outras portas de entrada disponíveis (ABRAHÃO, 1998; ALMEIDA, 2004). Como a transmissão é predominantemente respiratória, o confinamento tem particular importância na difusão da doença no rebanho (FRANCO et al., 2000).

A tuberculose bovina se apresenta como uma doença debilitante, de curso subclínico, podendo permanecer de forma latente por meses ou anos antes dos desenvolvimentos dos primeiros sinais clínicos, que nos bovinos são caracterizados por emaciação, anorexia, febre intermitente, letargia, aumento de linfonodos, ocorrência de tosse seca não produtiva, secreção nasal e dispneia, que se tornam mais evidentes durante o período de estresse, além de diminuição dos índices zootécnicos (COUSIN et al., 2004; SABEDOT et al., 2009).

A distribuição das lesões varia de acordo com a rota de infecção, podendo ser determinada a via de infecção pela localização do foco primário, que é formado por lesão clássica (complexo primário) no local da infecção, assim como, no linfonodo regional. Já em outras situações, esta lesão pode estar restrita apenas ao linfonodo regional e ausente no local da infecção, sendo conhecido como complexo primário incompleto (COUSINS et al., 2004; NEILL et al., 1994). A generalização da infecção pode assumir duas formas: 1ª

Miliar, também conhecida como tuberculose de pequenos nódulos, que ocorre quando há entrada de um grande número de bacilos na circulação de maneira abrupta e maciça; 2ª Protraída, mais comum, que se dá por via linfática ou sanguínea, acometendo o próprio pulmão, pleura, linfonodos, fígado, intestinos, baço, peritônio, úbere, ossos, rins, sistema nervoso central, disseminando-se por, praticamente, todos os tecidos (PACHECO et al., 2009). No entanto, dados de literatura demonstram que cerca de 70 a 90% das lesões presuntivas de tuberculose bovina encontrada durante o exame *post mortem*, ocorrem nos linfonodos da cabeça e da cavidade torácica (ROXO, 1997). Dentre as carcaças com tais alterações, 66% delas evidenciam uma única lesão (CORNER, 1994).

As lesões macroscópicas são constituídas pela formação de nódulos no parênquima do órgão, de distribuição focal ou difusa e de consistência firme. Ao corte destas estruturas observa-se que são bem delimitadas, apresentando no seu interior conteúdo pastoso, de coloração amarelada, algumas vezes com áreas calcificadas (ARAÚJO et al., 2005; CORNER, 1994).

A imunopatogenia da tuberculose bovina, considerando-se a forma inalatória que é a porta de entrada mais comum, pode ter seu desenvolvimento determinado por três fatores: o *primeiro* fator é a carga infectante, da qual alguns estudos relatam que 1 UFC de *M. bovis* é capaz de causar lesões granulomatosas em bovinos (DEAN et al., 2005; JOHNSON et al., 2007); o *segundo* é a virulência do bacilo, relacionado com a capacidade de causar infecção, a habilidade de sobreviver no interior dos macrófagos e a capacidade de induzir resposta imune em determinado hospedeiro; e o *terceiro* é a resistência ou imunidade natural aliada aos mecanismos de proteção das vias aéreas, além da imunidade adquirida (LAGE et al., 1998; MORRIS et al., 1994; NEILL et al., 1994).

O *Mycobacterium sp.* é um patógeno intracelular de macrófagos e de outras células monocíticas. A resposta imune frente à infecção pelo *M. bovis* em bovinos é predominantemente celular, mediada por linfócito T, com posterior estimulação de macrófagos (POLLOCK et al., 2005). Decorrido a

infecção no organismo animal, os macrófagos realizam a fagocitose do bacilo e sua eliminação vai depender da atividade antimicrobiana dos macrófagos infectados. O bacilo multiplica-se no interior do fagossomo de macrófagos inativados, resultando na morte celular, com conseqüente liberação do agente para o meio extracelular, que novamente é fagocitado por macrófagos adjacentes. A habilidade dos macrófagos de eliminar a bactéria está na dependência da resposta celular mediada por células T (TH1). Estas células produzem citocinas, interferons e interleucinas-12 (IL-12), as quais aumentam as propriedades deletérias dos macrófagos com relação a esta infecção (GRIFFIN et al. 1995).

No desenvolvimento inicial dos granulomas observa-se a presença de neutrófilos que são rapidamente substituídos por macrófagos. Ocorre então a formação de tubérculos que são constituídos por células epitelióides, havendo fagocitose intensa do bacilo e necrose dos macrófagos, ocasionando progressão da lesão para necrose caseosa. Células gigantes aparecem na composição dos granulomas, circundado por uma camada de células linfóides e por outras células mononucleares, além da proliferação de tecido conjuntivo na periferia, que tenta encapsular a lesão (THOEN; HIMES, 1986).

A principal medida para o controle da tuberculose bovina é a detecção precoce da doença no rebanho e remoção dos animais contaminados (RUA-DOMENECH et al., 2006). O diagnóstico pode ser realizado de forma direta ou indireta, através de métodos clínicos que tem pouca relevância, pois a maioria dos animais infectados são assintomáticos; métodos anatomopatológicos realizados por observação de lesões *post-mortem*; e exames laboratoriais executados por meio de testes imunológicos, isolamento bacteriano, histopatologia, e provas moleculares (RUGGIERO et al., 2007).

O diagnóstico anatomopatológico durante a realização de necrópsias ou na linha de inspeção sanitária de carcaças em frigoríficos, apresenta considerável dificuldade, uma vez que muitos processos inflamatórios granulomatosos, tais como infecções por *Arcanobacterium sp.*, *Truperella pyogenes*, *Actinobacillus lignieresii*, fungos, infestações por larvas de parasitos,

bem como em alguns processos neoplásicos, são freqüentemente confundidos por apresentarem características morfológicas semelhantes as descritas para a tuberculose (CORNER, 1994; LAGE et al., 1998; SALAZAR, 2005).

O teste imunológico é baseado em reações de hipersensibilidade, representado pela prova de tuberculinização intradérmica cervical simples e/ou comparativa (tuberculina bovina e aviária), seguido da eliminação dos animais positivos, procedimento adotado no Brasil onde a doença é de notificação obrigatória. Porém, a baixa sensibilidade e especificidade deste teste são fatores limitantes (LILENBAUM, 2000). Além disso, podem-se realizar testes de imunistoquímica *in situ* em tecidos, para visualização do agente por meio de anticorpos específicos.

O isolamento bacteriano é um método de diagnóstico considerado “padrão-ouro”. Testes clássicos com base no crescimento, fenotipagem, provas bioquímicas e resistência a fármacos são tradicionalmente utilizados para diferenciar as bactérias do CMTB (NIEMANN et al., 2000b; PARREIRAS et al., 2004). Contudo, a baixa quantidade de bacilos viáveis nas amostras clínicas, dificulta o cultivo bacteriano, resultando em resultados falso negativos, e devido ao lento crescimento destes micro-organismos, a interpretação dos resultados pode ser subjetiva, especialmente quando se refere às características fenotípicas, que podem variar devido à perda de virulência ou a mutações associadas à resistência a fármacos (KENT, 1985), levando a erros de identificação. Além disso, esse método de diagnóstico é lento, laborioso e pode ser realizado apenas em laboratórios de nível de biossegurança 3 (CORNER, 1994; KENT, 1985).

A histopatologia é uma forma de diagnóstico complementar ao exame *post mortem* de carcaças com lesões sugestivas de tuberculose. Este exame constitui-se em técnica indireta pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), que detecta presença de granulomas no tecido, e de uma técnica direta de diagnóstico presuntivo por meio da coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) (CASSIDY et al., 1999). As alterações histopatológicas são compostas por necrose caseosa, circunscrita por macrófagos epitelióides com intensa fagocitose de

bacilos, células gigantes multinucleadas tipo *Langhans* e por camada de linfócitos. Neutrófilos degenerados mostram-se presentes de forma isolada ou em grupos próximos à região necrótica. As lesões também podem apresentar calcificação distrófica, necrose de coagulação e formação de cápsula de tecido fibroso (CASSIDY et al., 1999; JOHNSON et al., 2008). A coloração de ZN revela micro-organismos no interior de macrófagos, de células gigantes e no espaço extracelular, porém, não diferencia a espécie de BAAR (CHARRO; OSORIO, 2009; COLLINS et al., 1994).

Devido a necessidade de testes que identifiquem as espécies e cepas do CMTB para uma melhor investigação epidemiológica, e as limitações das técnicas rotineiras utilizadas no diagnóstico de tuberculose em animais, tais como sensibilidade e especificidade do teste de tuberculinização e o longo período dos métodos bacteriológicos, aumentou-se o interesse pelo desenvolvimento de técnicas moleculares que são capazes de detectar com agilidade e rapidez, pequenas quantidades do agente viável ou não, diferenciando as espécies em diferentes amostras (WANGO O et al., 2005; ZANINI et al., 2001).

As provas moleculares baseiam-se na amplificação de regiões específicas do DNA, através da reação em cadeia polimerase (PCR), que oferece uma alternativa interessante, capaz de diferenciar os membros do CMBT de outras micobactérias (ARAÚJO et al., 2005; HUARD et al., 2003, KESARWANI et al., 2004; MURAKAMI et al., 2007). Esta reação vem sendo implementada em estudos epidemiológicos, dando notoriedade a um moderno campo de pesquisa, com agilidade e rapidez no diagnóstico (WANGO O et al., 2005), com resultados mais rápidos (de dois a três dias), quando comparado ao isolamento bacteriano (de quatro a oito semanas) (ANTO G NOLI et al., 2001; MILLER et al., 1997; ZUMARRAGA et al., 1999).

Existem dois passos limitantes no diagnóstico molecular: a extração de DNA genômico amplificável e de qualidade, uma vez que a concentração de DNA bacteriano frente ao DNA bovino (eucarioto) é reduzida (RORING et al., 2000), além da presença de inibidores durante a extração (BARKEN et al.,

2007; DOERING et al., 2008; GARBACCIO; CATALDI, 2010); e a escolha e disponibilidade de oligonucleotídeos com alta especificidade para diferenciar espécies (KHAN; YADAV, 2004), o que para o CMTB ainda é um grande desafio (BRUNELLO et al., 2001; FROTHINGHAM et al., 1994; LECLERC et al., 2000).

Como as diferenças genômicas entre as bactérias do CMTB são apenas observadas em polimorfismos nucleotídicos únicos (ABALOS; RETAMAL, 2004), número de repetições do gene alvo IS6110, ou por análise da sequência polimórfica de regiões ricas em GC (COLLINS, 2011), novas técnicas moleculares, tais como análise do número variável de repetições em série (VNTR), digestão dos produtos de PCR seguidas por restrição de fragmentos de comprimentos polimórficos (RFLP), testes de polimorfismo único (SNPs), e *spoligotyping* (COLLINS, 2011; GOH et al., 2001; HAAS et al., 1997; NIEMANN et al., 2000a; NIEMANN et al., 2000b), têm sido estudadas como alternativas para diminuir estas dificuldades. No entanto, um único locus não é capaz de diferenciar as espécies do CMTB, devido ao elevado grau de homologia do DNA dos micro-organismos pertencentes a esse grupo, se fazendo necessária a análise conjunta de vários locus (HUARD et al., 2003).

Diante da importância zoonótica da tuberculose bovina, considerando as perdas econômicas ocasionadas na pecuária nacional, e a precariedade de trabalhos sobre métodos de diagnóstico diretamente de tecidos, esse trabalho teve como finalidade:

- **Objetivo geral:**

Avaliar amostras de linfonodos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina por meio de técnicas histopatológicas, utilizando-se coloração de hematoxilina e eosina e de Ziehl-Neelsen para observação morfológica da lesão e a presença do bacilo, e amplificar fragmentos de DNA por PCR de gene gênero-específico do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, visando desta forma a detecção molecular direta do agente em tecidos.

- **Objetivos específicos:**

Proceder exame microscópico de secções histológicas das lesões com características macroscópicas de tuberculose bem como daquelas que são diagnosticadas de forma presuntiva na linha de inspeção nos frigoríficos.

Fazer uso da coloração de HE para a avaliação histomorfológica, graduando as lesões granulomatosas em quatro estágios de acordo com o trabalho de Wangoo et al. (2005).

Fazer uso da coloração especial de Ziehl-Neelsen, para identificar e quantificar o agente etiológico segundo Johnson et al. (2008).

Adaptar um protocolo de extração de DNA micobacteriano em amostras de tecidos congelados.

Realizar reação em cadeia polimerase (PCR) para o gene *hsp65* e IS6110, a partir do DNA genômico extraído de amostras colhidas.

Realizar reamplificação do fragmento de DNA do gene IS6110 amplificado pela PCR convencional.

## REFERÊNCIAS

ABALOS, P.; RETAMAL, P. Tuberculosis: ¿ una zoonosis re-emergente? **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.23, n.2, p.583-594, 2004.

ABRAHÃO, R.M.C.M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis***: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. (Mestrado), São Paulo: USP, 1998. 328f.

ALMEIDA, R.F.C. **Investigação de focos de tuberculose bovina em rebanhos de corte a partir de lesões sugestivas ao abate no estado do Mato Grosso do Sul**. (Mestrado), Campo Grade: UFMS, 2004. 56f.

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

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2011. 378f.

ARAÚJO, C.P.; LEITE, C.Q.F.; PRINCE, K.A. et al. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from *post-mortem* inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.7, p.749-752, 2005.

BARKEN, K.B.; HAAGENSEN, J.A.; TOLKER-NIELSEN, T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. **Clinica Chimica Acta**, v.384, p.1-11, 2007.

BRASIL. **Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose**. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2006. 190f.

BRUNELLO, F.; LIGOZZI, M.; CRISTELLI, E. et al. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2799–2806, 2001.

CASSIDY, J.P.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M.; et al. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis* - inoculated Calves. **Journal of Comparative Pathology**, v.121, p.321-337, 1999.

CHARRO, F.D.; OSÓRIO, A.L.A.R. Diagnóstico da tuberculose bovina por meio de histopatologia. Disponível em: <<http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=429>>.

Acesso em: 15 mar. 2009.

COLLINS, D.M.; RADFORD, A.J.; LISLE, G.W.; et al. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.83-94, 1994.

COLLINS, D.M. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.151, p.2-7, 2011.

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

CORREA, W.M.; CORREA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro, MEDSE, 2 ed., 1992, 843f.

COUSIN, D.V.; HUCHZERMEYER, H.F.K.A.; GRIFFIN, J.F.T. et al. Tuberculosis. In: COETZER, J.A.W., TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**, 2ed. Oxford: 2004. p.1973-1993.

- DEAN, G.S.; RHODES, S.G.; COAD, M. et al. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. **Infection and Immunity**, v.73, n.10, p.6467-6471, 2005.
- DOERING, G.; UNERTL, K.; HEININGER, A. Validation criteria for nucleic acid amplification techniques for bacterial infections. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.46, p.909–918, 2008.
- FERREIRA NETO, J.S.; BERNARDI, F. Control of bovine tuberculosis, particularly in Brazil. **Higiene Alimentar**, v.11, p.9-13, 1997.
- FRANCO, R.M.; CAVALCANTI, R.M.S.; WOOD, P.C.B.; et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, v.14, n.68/69, p.70-74, 2000.
- FROTHINGHAM, R.; HILLS, H.G.; WILSON, K.H. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1639-1643, 1994.
- GARBACCIO, S.G.; CATALDI, A.A. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.42, p.247-25, 2010.
- GRIFFIN, J.F.T.; MACKINTOSH, C.G.; BUCHAN, G.S. Animal models of protective immunity in tuberculosis to evaluate candidate vaccines. **Trends in Microbiology**, v.3, p.418-424, 1995.
- HAAS, W.H.; BRETZEL, G.; AMTHOR, B. Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of *Mycobacterium africanum* from east and West Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.663–666, 1997.
- HERRERA-LEÓN, L.; POZUELO-DÍAZ, R.; MORENO, T.M.; et al. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.27, p.496-502, 2009.

HUARD, R.C.; LAZZARINI, L.C.O.; BUTLER, W.R. et al. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1637-1650, 2003.

HUARD, R. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.12, p.4271-4287, 2006.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v.38, 2010. 65p.

IMAEDA, T. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium africanum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.35, p.147-150, 1985.

JOHNSON, L.; DEAN, G.; RHODES, S. et al. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. **Tuberculosis**, v.87, p.71-76, 2007.

JOHNSON, L.K.; LIEBANA, E.; NUNEZ, A. et al. Histological observations of bovine tuberculosis in lung and lymph node tissues from british deer. **The Veterinary Journal**, v.175, p.409-412, 2008.

KENT, P.T. **Public health mycobacteriology**: A guide for the level III laboratory. In: Services DpHaH. Atlanta, Centers for Disease Control, Public Health Service. 1985.

- KESARWANI, R.C.; PANDEY, A.; MISRA, A. *et al.* Polymerase chain reaction (PCR): Its comparison with conventional techniques for diagnosis of extra-pulmonary tubercular diseases. **Indian Journal Surgery**, v.66, p.84-88, 2004.
- KHAN, I.U.H.; YADAV, J.S. Development of a single-tube, cell lysis-based, genus-specific PCR method for rapid identification of Mycobacteria: optimization of cell lysis, PCR primers and conditions, and restriction pattern analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.424, p.453-457, 2004.
- LAGE, A.P. LOBATO, F.C.F.; MOTA, P.M.P.C. *et al.* **Atualização em tuberculose bovina**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998. 65f.
- LECLERC, M.C.; HADDAD, N.; MOREAU, R. *et al.* Molecular characterization of environmental mycobacterium strains by PCR-restriction fragment length polymorphism of *hsp65* and by sequencing of *hsp65*, and of *16S* and *ITS1* rDNA. **Research in Microbiology**, v.151, p.629–638, 2000.
- LEITE, C.Q.; ANNO, I.S.; LEITE, S.R. *et al.* Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, p.319-323, 2003.
- LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22, p.145-151, 2000.
- MILLER, J.M.; JENNY, A.; RHYAN, J. *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p.244-9, 1997.
- MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.111-124, 1994.

- MURAKAMI, P.S.; BIESDORF, S.M.; BROCKELT, S.R. et al. Uso do PCR no Diagnóstico Post-mortem de *Mycobacterium spp* em Bovinos. **Revista Higiene Alimentar**, v.21, n.150, p.396-397, 2007.
- NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B. et al. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.41-52, 1994.
- NIEMANN, S.; HARMSSEN, D.; RUSCH-GERDES, S. et al. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3231–3234, 2000(a).
- NIEMANN, S.; RICHTER, E.; RUSCH-GERDES, S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.152–157, 2000(b).
- OLIVEIRA, I.A.S.; MELO, H.P.C.; CÂMARA, A. et al. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.6, p.395-400, 2007.
- PACHECO, A.M.; HAMZÈ, A.L.; RODRIGUES, C.A. et al. Controle da tuberculose bovina. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n.12, 5f., 2009.
- PARREIRAS, P.M; LOBATO, F.C.; ALENCAR, A.P. et al. Drug susceptibility of Brazilian strains of *Mycobacterium bovis* using traditional and molecular techniques. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.749-752, 2004.
- POLLOCK, J.M.; WELSH, M.D.; MCNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.108, p.37–43, 2005.

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

ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.18, p.101-108, 1997.

RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, AT.; VORDERMEIER, HM. *et al.* *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, v.81, p.190-210, 2006.

RUGGIERO, A.P.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A. *et al.* Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.74, n.1, p.55-65, 2007.

SABEDOT, M.A.; BOETCHER, A.V.; POZZA, M.S. *et al.* Ocorrência de tuberculose e brucelose em rebanhos na região sudoeste do Paraná. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.12, 9f., 2009.

SALAZAR, F.H.P. **Ocorrência de Tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil.** (Mestrado), Campo Grande: UFMS, 2005. 73f.

SOMMER, H.M.; WOOD, R. *Mycobacterium*. In: LANNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.Jr; *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. 4ed. Washington: ASM Press, 1985. p.216-248.

THOEN, C.O.; HIMES, E.M. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection. **Progress in Veterinary Microbiology and Immunology**, v.2, p.198-214, 1986.

VALLE, E.R. **Boas práticas agropecuárias: bovinos de corte: manual de orientações.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 69f., 2011. Disponível em: [http://cloud.cnpqg.embrapa.br/bpa/files/2013/02/MANUAL\\_de-BPA\\_NACIONAL.pdf](http://cloud.cnpqg.embrapa.br/bpa/files/2013/02/MANUAL_de-BPA_NACIONAL.pdf) Acesso em 07 mar 2013

WANGOO, A.; JOHNSON,L.; GOUGH, J. et al. Advanced Granulomatous Lesions in *Mycobacterium bovis*-infected Cattle are Associated with Increased Expression of Type I Procollagen, gd (WC1C) T Cells and CD 68C Cells. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p.223-234, 2005.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the WHO meeting of zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*)**. Geneva: Technical Note, 1993. 27f.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T. et al. *Mycobacterium bovis*: Polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.1-5, 2001.

ZUMARRAGA, M.J.; CATALDI, A.; BIGI, F. et al. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección de micobacterias en leche. **Revista Argentina de Microbiología**, v.31, p.4-5, 1999.

## **CAPÍTULO 2 - ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES GRANULOMATOSAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA**

### **Análise Histomorfológica e Molecular de Lesões Granulomatosas Sugestivas de Tuberculose Bovina**

**RESUMO** - A tuberculose bovina é uma enfermidade infectocontagiosa granulomatosa crônica de carácter zoonótico causada pelo *Mycobacterium bovis*. Essa bactéria pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* que corresponde a um grupo de micobactérias filogeneticamente relacionadas, que apresentam considerável dificuldade no diagnóstico direto em amostras teciduais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar linfonodos por meio de diagnóstico histopatológico e molecular, visando à detecção direta do agente em tecido. Durante a linha de inspeção de abate em frigorífico, foram selecionados 150 linfonodos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Na análise histológica pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), 100% das amostras apresentaram lesões microscópicas compatíveis com tuberculose. A coloração de Zielh-Neelsen (ZN) evidenciou a presença de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) em 6 (4%) amostras. O método de extração para a análise molecular apresentou bons resultados, mas a amplificação dos fragmentos de DNA dos genes hsp65 e IS6110 resultaram em baixa sensibilidade. Contudo a reamplificação do gene IS6110, resultou em positividade de 63,3%, indicando que a dificuldade do diagnóstico molecular em amostras teciduais esta relacionada à quantidade reduzida de bactérias presentes nas amostras.

**Palavras-chave:** diagnóstico, histopatologia, *Mycobacterium*, reação em cadeia da polimerase, tecidos.

## Introdução

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica com lesões granulomatosas características (COUSIN et al., 2004), que causa grandes prejuízos pecuários, sendo no Brasil, alvo do “Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose” (PNCEBT) instituído desde 2001, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2006).

O agente etiológico da tuberculose bovina é o *Mycobacterium bovis*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) pertencente à família *Mycobacteriaceae* (IMAEDA, 1985). Esta bactéria é uma das espécies causadora de tuberculose em mamíferos, que constitui um grupo de bactérias filogeneticamente relacionadas, o chamado complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), composto das seguintes espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis* incluindo o derivado vacinal *M.bovis-Calmette & Guérin* (BCG), *M. africanum* (subtipos I e II), *M. microti*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (HERRERA-LÉON et al., 2009; SOMMER e WOOD, 1985).

No que se refere aos prejuízos econômicos determinados pela tuberculose bovina, estima-se uma redução de 10% a 25% da produção de carne e de leite, relacionadas principalmente a redução gradativa dos índices zootécnicos e a condenação de carcaças em frigoríficos (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997), além da vulnerabilidade dos produtos pecuários a barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional (SABEDOT et al., 2009).

Com relação à epidemiologia da doença em humanos, estima-se que um terço da população mundial tenha tuberculose, sendo o *M. bovis* responsável por cerca de sete mil novos casos por ano na América Latina (PAHO, 1991) e por 5% dos casos de tuberculose humana no Brasil (WHO, 1993).

No bovino, a tuberculose pode ser diagnosticada *in vivo* pela tuberculinização intradérmica, por observação de lesões *post-mortem*,

diagnósticos bacteriológicos, histopatológicos e moleculares (RUGGIERO et al., 2007).

O isolamento bacteriano é um método de diagnóstico considerado “padrão-ouro”, porém, o longo período requerido para isolamento e identificação bioquímica é um de seus pontos críticos (CORNER, 1994).

O diagnóstico anatomopatológico durante a realização de necropsias ou de inspeção sanitária das carcaças em frigoríficos apresenta considerável dificuldade, pois muitos processos inflamatórios granulomatosos, apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para a tuberculose (LAGE et al., 1998).

A histopatologia é uma forma de diagnóstico complementar ao exame *post-mortem*. Baseia-se em detecção indireta, através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), e direta pesquisando-se BAAR por meio da coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) (CHARRO; OSORIO, 2009).

A reação em cadeia polimerase (PCR) vem sendo empregada no diagnóstico de tuberculose bovina tanto para a detecção do agente etiológico isolado de culturas, como em amostras clínicas (KESARWANI et al., 2004). As principais limitações são os resultados falso-negativos, os quais podem ser atribuídos à natureza paucibacilar das amostras teciduais (RORING et al., 2000), e a presença de inibidores de PCR (GARBACCIO; CATALDI, 2010).

O gene *hsp65* é de uma proteína de choque térmico, altamente conservado, presente no gênero *Mycobacterium*, sendo considerado um alvo valioso para a utilização no diagnóstico molecular detectando e diferenciando micobactérias de não-micobactérias em amostras clínicas (ZAKHAM et al., 2012). Já o gene IS6110 é um elemento de inserção exclusivo do CMBT, altamente conservado, de múltiplas cópias no DNA, variando no número de repetições de 1 a 22 dependendo da espécie, e apresenta um excelente potencial de amplificação (HALDAR et al., 2011). Essa repetição é um fator que aumenta a sensibilidade das amplificações quando comparada com uma única cópia em *hsp65* (COLLINS, 2011).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar amostras de linfonodos bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose por meio de diagnóstico histopatológico, pela coloração de HE e ZN, e molecular por meio

de amplificação de fragmento de DNA por PCR dos genes *hsp65* e IS6110, visando a detecção direta do agente em tecido.

## **Material e Métodos**

**Amostras / Espécimes:** Foram analisadas carcaças de bovinos sadios ao exame *ante-mortem* e negativos ao teste de tuberculinização para emissão do GTA. Durante o abate, foram selecionado 150 linfonodos da região da cabeça (mandibular, parotídeo, retrofaríngeo) e do tórax (mediastínico, bronquial, traqueobronquial, escapular e subescapular), com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. As amostras foram fotodocumentadas e colheu-se um fragmento da área de transição da lesão sendo parte fixada em formol tamponado 10% e destinada à microscopia, e parte congelada a -20°C para posterior análise molecular.

**Macroscopia:** Considerou-se linfonodos com lesões granulomatosas nodulares, de aspecto caseoso e/ou calcificado, focal e disseminadas, de tamanho e formas variadas, para a avaliação microscópica.

**Microscopia:** os linfonodos bovinos foram cortados, fixados em formol tamponado a 10%, seguido de processamento pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Amostras microtomizadas (4 µm) foram coradas por HE para observação de lesões morfológicas graduadas de acordo com Wangoo et al. (2005), e por coloração de ZN para determinar o número de BAAR graduado segundo Johnson et al. (2008). Os cortes foram examinados a microscopia de luz em objetivas de 10, 40 e 100.

**Cepas bacterianas (controle):** As cepas de referência utilizadas como controle para PCR foram *Mycobacterium avium* 2441 e *Mycobacterium bovis* BCG Moreau Strain (Instituto Butantan), cedidas da coleção do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Minas Gerais).

**Isolamento do DNA:** Dois diferentes protocolos foram adaptados para extrair DNA de cultura bacteriana e amostras teciduais.

***Preparação de DNA micobacteriano:*** A extração de DNA de *M. avium* (1 ml) e *M. bovis* (100 µl) foi adaptada de Pacheco et al. (2007). As alíquotas foram centrifugadas a 6000 g por 15 min (Centrifuge 5417C – Eppendorf®). O *pellet* foi ressuscitado em 600 µl de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 300 mM NaCl [pH 7,0]), transferido para microtubos com tampa de rosca contendo 0,5 mL de *glass beads* (< 106 µm – Sigma®) e a lise celular foi realizada no Precellys®24 (2 ciclos de 15 segundos com intervalo de 30 segundos de 6500 rpm). As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições. Em seguida, o sobrenadante foi separado, e o DNA purificado com fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (25:24:1) por duas vezes, e foi precipitado com 50 µl acetato de sódio (NaAc 3M), 1 ml de etanol gelado, 1% do volume de glicogênio (20mg/ml) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O DNA genômico foi recuperado em centrífuga nas condições já descritas, lavado com álcool 70% gelado, ressuscitado em 30 µl de água miliQ estéril e armazenados em freezer -20°C.

***Preparação de DNA de amostras teciduais bovinas:*** A extração de DNA genômico de linfonodos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Roring et al. (2000), com algumas modificações. Fragmentos de tecido pesando entre 200-350g foram descongelados, cortados com lâmina de bisturi estéril e colocados em microtubos de 2 mL com tampa de rosca contendo 6 pérolas de vidro (2,8 mm). Foi adicionado 1 ml de tampão TES (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl [pH 7,4]) e em seguida, a lise mecânica foi

realizada em Precellys<sup>®</sup>24 (2 ciclos de 15 segundos com intervalo de 30 segundos de 6500 rpm). As amostras foram centrifugadas a 3500 g por 15 min (Centrifuge 5417C – Eppendorf<sup>®</sup>), o sobrenadante recuperado, e adicionou-se 50 µl de Proteinase K (Promega<sup>®</sup>). A solução foi então incubada a 60°C por 1 hora. Depois de purificado com fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (25:24:1) duas vezes e uma vez apenas com clorofórmio, o DNA foi precipitado com 250 µl acetato de sódio (NaAc 3 M), 1 ml de etanol gelado e 1% do volume de glicogênio (20mg/ml) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O DNA genômico foi recuperado em centrífuga nas condições descritas acima, lavado com etanol gelado (1 ml), ressuspendido em 110 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA [pH 7,5]) e armazenado a -20°C.

**Concentração e purificação do DNA extraído:** A concentração e purificação do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria em A260 e A280, no aparelho Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*). Adotou-se como padrão a concentração de 200 ng/µl, diluindo o DNA quando necessário.

**Amplificação de DNA pela PCR:** Utilizou-se dois genes alvo para amplificação do DNA, o *hsp65* encontrado em todas micobactérias e o IS6110 específico do CMBT.

***Gene alvo hsp65:*** Em 100 amostras, amplificou-se 439 pares de base do gene *hsp65* usando os *primers* TB11 (5'ACCAACGATGGTGTGTCCCAT3') e TB12 (5'CTTGTCGAACCGCATACCCT3') (Eurofins MWG Operon<sup>®</sup>) descrito previamente por Niemann et al. (2000). A PCR foi realizada com volume final de 50 µl contendo de 1 µg de DNA extraído, 10 mM de cada dNTP, 50 pmol de cada *primer*, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 10 µl de 5x tampão Taq polimerase (Promega<sup>®</sup>). As condições da PCR foram desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 61°C por 1 min, e extensão a 72°C por 1 min), com temperatura final de 72°C por 10 min, em termociclador automático (My Gene MG+ 96, Long Gene<sup>®</sup>). Os produtos de PCR foram

analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo em tampão TBE.

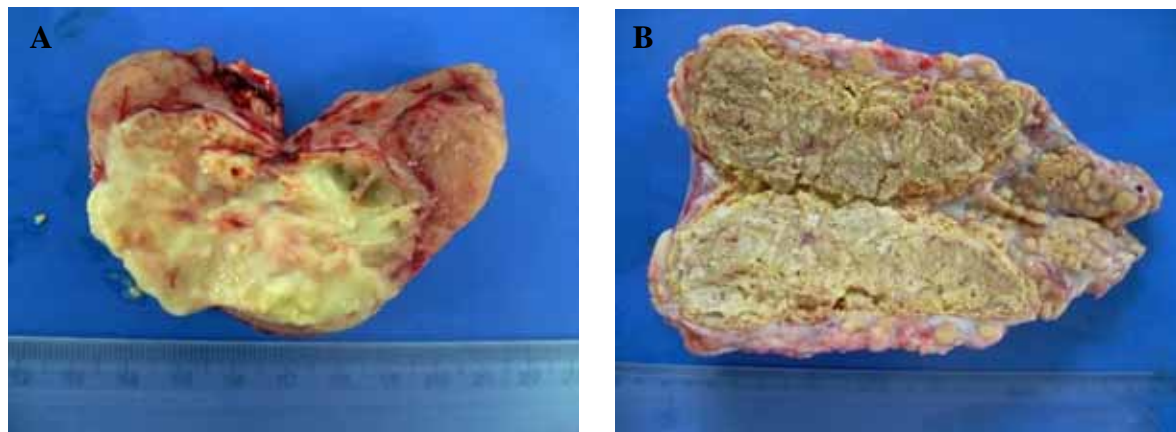
**Gene alvo IS6110:** Em 150 amostras, amplificou-se 123 pares de bases do gene IS6110, com o par de *primers* IS1R (5'CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG3') e IS2F (5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG3') (Eurofins MWG Operon®) descrito por Liébana et al. (1995). O volume final da PCR foi de 30 µl sendo 1 µg de DNA extraído, 10 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada *primer*, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 10 µl de 5x tampão Taq polimerase (Promega®). A PCR foi realizada em termociclador automático (My Gene MG+ 96, Long Gene®), e as condições de amplificação foram desnaturação inicial de 94°C por 5 min), seguida de 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, e extensão a 72°C por 1 min), com temperatura final de 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo em tampão TBE.

**Reamplificação da PCR-IS6110:** Para a reamplificação do fragmento de DNA de 123pb do gene IS6110, adotou-se 40 µl de produto final constituído por 10 µl do produto da PCR IS6110, 10 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada *primer* (IS1R e IS2F), 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 10 µl de 5x tampão Taq polimerase (Promega®). A PCR foi realizada em termociclador automático (My Gene MG+ 96, Long Gene®), e as condições de amplificação e análise dos produtos foram as mesmas descritas na PCR IS6110.

**Análise estatística:** a análise estatística foi realizada no programa SAS (*Statistical Analysis System*, 2008) por meio dos testes exato de Fischer, Qui-quadrado e McNemar. O nível de significância adotado foi de 5%.

## Resultados

**Análise macroscópica:** Foram observadas lesões nodulares no parênquima dos linfonodos, de distribuição focal, multifocal ou difusa, com consistência firme. Ao corte, essas estruturas eram amareladas e bem delimitadas por uma cápsula fibrosa, das quais 117 (78%) apresentavam no seu interior conteúdo caseoso (Figura 1A), enquanto 33 (22%) apresentavam áreas calcificadas (Figura 1B).

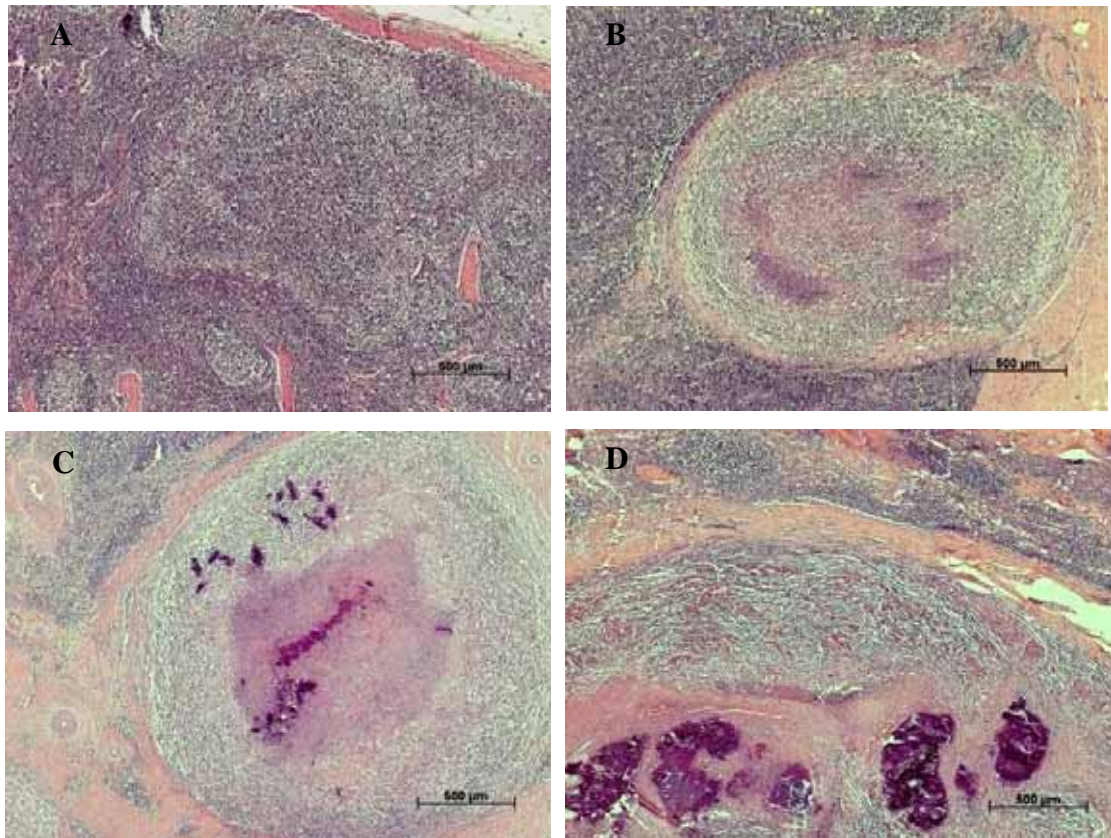


**FIGURA 1.** Linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. A) Lesão caseosa. B) Lesão calcificada.

**Análise microscópica:** Foi possível classificar 100% das lesões como granuloma. Os números encontrados em cada estágio, e sua caracterização, incluindo a composição celular, necrose e mineralização, estão apresentados na Tabela 1 e exemplificados na Figura 2 (A-D).

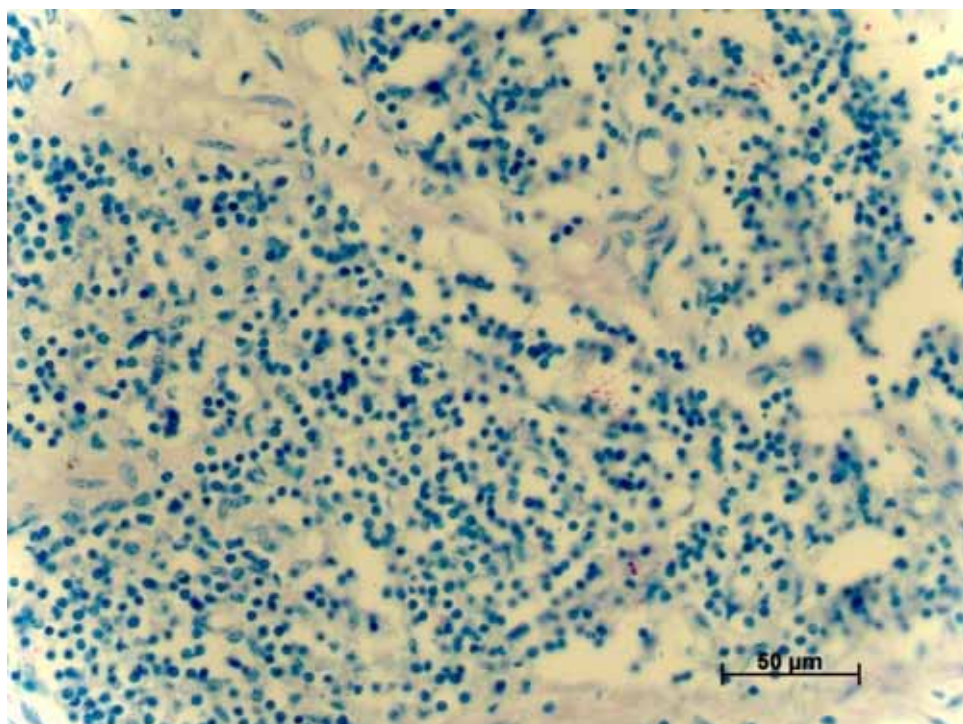
**Tabela 1** - Caracterização dos estágios de granulomas em linfonodos bovinos

<b>Estágio da Lesão</b>	<b>Composição Celular</b>	<b>Necrose e Mineralização</b>
I – lesão inicial n = 27 (18%)	Grupos irregulares de macrófagos epitelióides não encapsulados, associado a infiltrado linfocitário e pequeno número de neutrófilos. Raras células gigantes (tipo <i>Langhans</i> )	Ausente
II – lesão sólida n = 45 (30%)	Macrófagos epitelióides, revestidos parcial ou totalmente por cápsula fibrosa. Áreas hemorrágicas, infiltrado de linfócitos e neutrófilos, e células gigantes (tipo <i>Langhans</i> )	Áreas mínimas de necrose e/ou hemorragia
III – necrose mínima n = 55 (36,6%)	Células gigantes (tipo <i>Langhans</i> ) em meio a macrófagos epitelióides. Grupos de linfócitos e neutrófilos, estendendo junto à cápsula fibrosa completa.	Necrose caseosa central, com discreta mineralização
IV – necrose e mineralização n = 23 (15,4%)	Áreas extensas de mineralização em grande parte da lesão, macrófagos epitelióides e células gigantes (tipo <i>Langhans</i> ) ao redor da necrose, associada a grupos de linfócitos juntos a cápsula fibrosa delgada e completa.	Necrose caseosa multicêntrica com acentuada mineralização



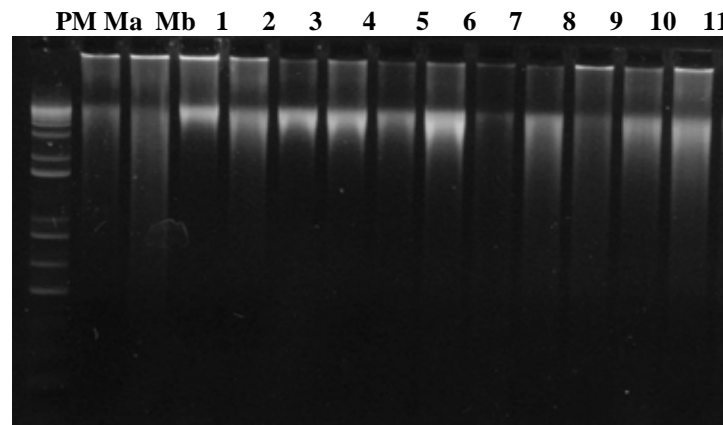
**FIGURA 2.** Classificação histológica de granulomas em linfonodos de bovinos (HE – 5x) (A) Estágio I: inicial. (B) Estágio II: sólido. C) Estágio III: necrose e mínima mineralização. D) Estágio IV: Necrose e grande mineralização.

A coloração de ZN nas mesmas amostras, permitiu a visualização de raros bacilos isolados ou em pequenos grupos em áreas livres de necrose (Figura 3) em 6 amostras (4%), das quais 5 foram classificadas em grau 1 (1-10 bacilos) e apenas 1 classificada em grau 2 (10-50 bacilos). Em 144 (96%) amostras não foi detectada a presença de BAAR, sendo, então, classificadas em grau 0 (bacilos ausentes).

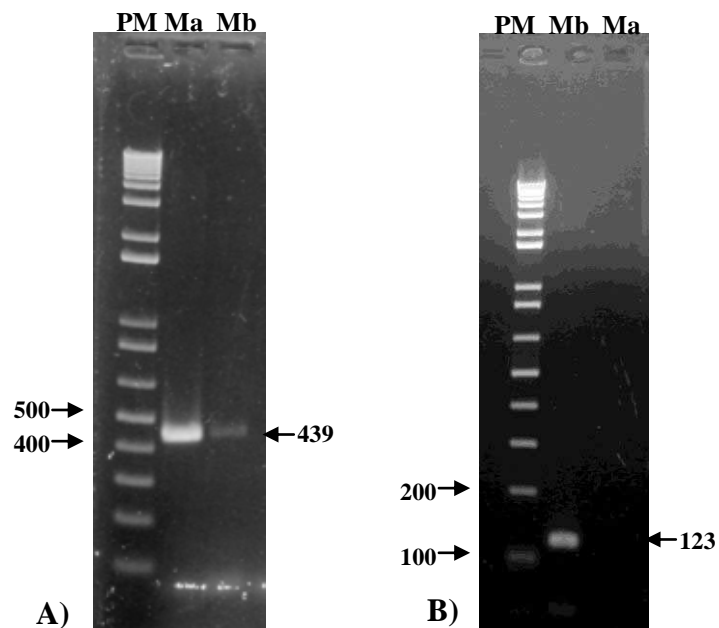


**FIGURA 3.** Bacilos ácido-álcool-resistentes observados em linfonodos de bovinos naturalmente infectados por *Mycobacterium sp.* (ZN – 100x).

**Análise molecular:** A extração do DNA das micobactérias e das amostras teciduais apresentaram bons resultados (Figura 4). O gene *hsp65* amplifica um único locus de 439 pb de todas as micobactérias (Figura 5A), enquanto que o gene IS6110 amplifica 123 pb das micobactérias pertencentes ao CMTB (Figura 5B).



**FIGURA 4.** Eletroforese em gel de agarose 1%: produtos de extração de DNA. Linhas PM: marcador de 1kb, Ma: *Mycobacterium avium* 2441, Mb: *Mycobacterium bovis* BCG-Moreau, 1-11 amostras de DNA genômico com lesões sugestivas de tuberculose.



**FIGURA 5.** PCR realizada em DNA micobacteriano. Linhas PM: marcador de 1kb, Ma: *Mycobacterium avium* 2441, Mb: *Mycobacterium bovis* BCG-Moreau **A)** PCR do gene *hsp65* com produto de 439 pb . **B)** PCR do gene IS6110 com produto de 123 pb.

A amplificação de DNA do gene *hsp65* em 100 amostras resultou em 14% de positividade. Nas 150 amostras analisadas pela PCR-IS6110, a positividade foi de 31,3%, enquanto que sua reamplificação foi de 63,3%. Não houve diferença estatística em nenhuma forma de diagnóstico em relação ao estágio do granuloma observado na histologia (Tabela 2).

**Tabela 2** - Diferentes métodos de diagnóstico para tuberculose de acordo com a classificação da lesão histológica

Variável	Categoria	Estágio										p-valor
		I		II		III		IV		TOTAL		
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Coloração ZN	Positivo	1	3,7	2	4,4	1	1,8	2	8,7	6	4,0	0,4659 <sup>(1)</sup>
	Negativo	26	96,3	43	95,6	54	98,2	21	91,3	144	96,0	
PCR-IS6110	Positivo	5	18,5	18	40,0	17	30,9	7	30,4	47	31,3	0,3024 <sup>(2)</sup>
	Negativo	22	81,5	27	60,0	38	69,1	16	69,6	103	68,7	
Reamplificação PCR-IS6110	Positivo	16	59,3	34	75,6	33	60,0	12	52,2	95	63,3	0,2049 <sup>(2)</sup>
	Negativo	11	40,7	11	24,4	22	40,0	11	47,8	55	36,7	
<b>TOTAL</b>		<b>27</b>	<b>100,0</b>	<b>45</b>	<b>100,0</b>	<b>55</b>	<b>100,0</b>	<b>23</b>	<b>100,0</b>	<b>150</b>	<b>100,0</b>	
PCR- <i>hsp65</i> *	Positivo	3	17,6	3	9,4	6	16,7	2	13,3	14	14,0	0,7755 <sup>(1)</sup>
	Negativo	14	82,4	29	90,6	30	83,3	13	86,7	86	86,0	
<b>TOTAL</b>		<b>17</b>	<b>100,0</b>	<b>32</b>	<b>100,0</b>	<b>36</b>	<b>100,0</b>	<b>15</b>	<b>100,0</b>	<b>100</b>	<b>100,0</b>	

\* n = 100

<sup>(1)</sup> Teste exato de Fischer

<sup>(2)</sup> Teste Qui-quadrado

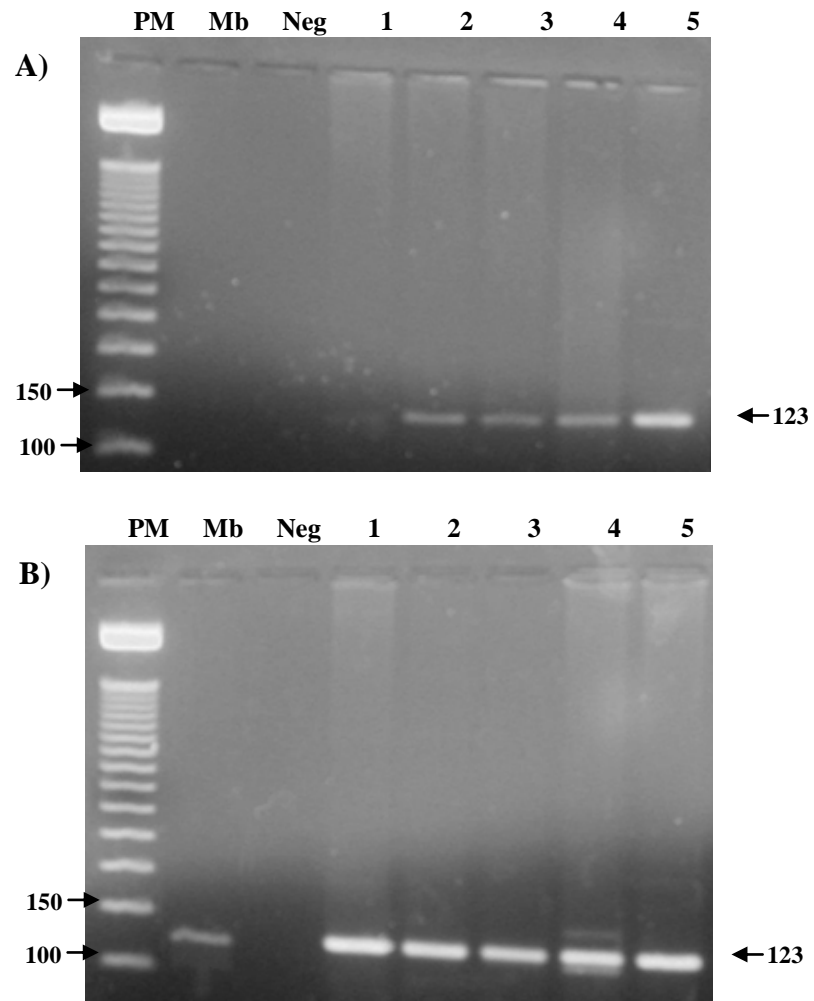
Comparando as técnicas moleculares para o gene IS6110, a reamplificação demonstrou estatisticamente um maior número de positividade nas amostras teciduais (Tabela 3). A diferença da amplificação destas reações está representada na Figura 6 (A e B).

**Tabela 3** - Diferença de positividade para *Mycobacterium* sp. em amostras teciduais bovinas de acordo com a técnica molecular para o gene alvo IS6110

Variável	Categoria	Reamplificação PCR-IS6110					
		Positivo		Negativo		TOTAL	
		n	%	n	%	n	%
PCR-IS6110	Positivo	47	31,3	0	0,0	47	31,3
	Negativo	48	32,0	55	36,7	103	68,7
<b>TOTAL</b>		<b>95</b>	<b>63,3</b>	<b>55</b>	<b>36,7</b>	<b>150</b>	<b>100,0</b>

Teste de McNemar ( $p < 0,0001$ )

Coefficiente Kappa = 0,4179 (replicabilidade boa)



**FIGURA 6.** Eletroforese em gel de agarose 2%. Linhas PM: marcador de 50pb; Mb: *Mycobacterium bovis* BCG-Moreau; Neg: controle negativo; 1-5 amostras de linfonodos bovinos positivas para CMTB. **A)** PCR-IS6110 **B)** Reamplificação das mesmas amostras da PCR-IS6110 (Figura 6A).

## Discussão

Mesmo não sendo possível diferenciar as lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose de outras infecções, os achados do exame microscópico da HE evidenciaram lesão granulomatosa em 100% das amostras, mostrando confiabilidade na observação macroscópica realizado durante a linha de inspeção. No México e nos EUA, lesões granulomatosas foram confirmadas pela histologia em 77% e 86%, respectivamente, de amostras selecionadas durante o abate (MILLIAN-SUAZO et al., 2000; NORBY et al., 2004).

As lesões encontradas predominantemente em linfonodos da região da cabeça e do tórax corroboram com dados da literatura que concluem que a via respiratória é a rota mais importante da tuberculose bovina, tendo o trato respiratório como local primário de infecção (BOUKARY et al., 2011; NEILL et al., 2005).

A classificação dos quatro estágios da lesão granulomatosa fornece um contexto espacial do desenvolvimento e inferências quanto a sua cronicidade, principalmente quando comparada a quantidade de BAAR presente (JOHNSON et al., 2008; WANGO O et al., 2005). Lesões iniciais (estágio I ou II) apresentam maior risco de infectividade do que as lesões mineralizadas (estágio III e IV), pois essas inibem a multiplicação dos bacilos (COUSIN et al., 2004; LIÉBANA et al., 2008; WANGO O et al., 2005). Contudo, no presente estudo não foi observada qualquer relação do número de BAAR com o estágio do granuloma (Tabela 2).

Segundo Andrade et al. (1991), a não visualização do agente em cortes histológicos da lesão pela coloração de ZN é um achado frequente na tuberculose bovina, devido à presença de escasso número de bactérias na lesão, e não, à sua ausência. Achados semelhantes foram descritos por Martins et al. (2008) e Charro e Osório (2009), onde a quantidade de BAAR observada em até 100 campos não foi superior a 1 a 10 bacilos por campo. Esse fato pode ser explicado em função do estágio de progressão da lesão

resultante da reação de hipersensibilidade tardia, como caseificação ou calcificação (MORRIS et al., 1994; NEILL et al., 1994), pois isto leva a ruptura da membrana bacteriana, perdendo a característica álcool-ácido-resistente (BRASIL 2006; CORNER et al., 1994). Além disso, a sensibilidade da ZN para BAAR é baixa, estima-se que são necessários pelo menos 105 UFC/mL presentes no tecido para serem detectadas pela microscopia (MCCUNE; TOMPSETT, 1956). Logo, as amostras negativas pelo ZN, também teriam dificuldade em serem identificadas em cultura microbiológica, pois, em muitas situações, as amostras não evidenciam crescimento de colônias em função de quantidade reduzida de bactérias viáveis na lesão (MARCONDES et al., 2006).

A PCR oferece muitas vantagens sobre os demais métodos, uma vez que o DNA do agente causador da doença é detectável estando a bactéria viável ou não (BASCUÑANA et al., 1996; LIÉBANA et al., 1995; ZAKHAM et al., 2012). Romero et al. (1999) descreveram que no leite a PCR é 28 vezes mais eficiente no diagnóstico de CMTB do que o tradicional isolamento bacteriano e a microscopia direta, porém Zanini et al. (2001) observaram que a PCR realizada em amostras teciduais foi apenas 1,6 vezes mais eficiente que a cultura, ressaltando a dificuldade da extração do DNA micobacteriano diretamente de tecido. Baixa eficiência da PCR diretamente de tecidos também foi constatada por Garbaccio e Cataldi (2010) e Proaño-Pérez et al. (2011).

Devido ao número reduzido de bactérias em lesões teciduais, presença de inibidores e a dificuldade de extração do DNA micobacteriano em meio ao DNA eucarioto, o produto amplificado na PCR convencional nem sempre é observada em gel de agarose (ZUMARRAGA et al., 1999). A reamplificação oferece melhorias em relação a sensibilidade e eficiência da PCR convencional (BRUNELLO et al., 2001; COLLINS, 2011; COUSIN et al., 2004; TAN et al., 1997), pois resulta na amplificação exponencial de seu produto (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 2003; COLLINS et al., 1993).

No presente estudo, a amplificação por PCR, de fragmento de DNA do gene *hsp65* apresentou baixo percentual (14%). Dados semelhantes foram obtidos por Pires de Araújo et al. (2005) que teve 18% de positividade pela PCR realizada diretamente

de linfonodos bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Optou-se então para o uso do gene alvo IS6110 na tentativa de identificar o insucesso da PCR do gene *hsp65* e obter melhores resultados devido ao número de repetições, o que só foi observado ao se realizar a reamplificação do produto da PCR-IS6110, que revelou positividade para bactérias do CMTB em 63,3%, enquanto que para o mesmo gene alvo a PCR convencional foi de 31,3%. Esse resultado é um indicativo de que o fator que mais afetou a amplificação, não foi a presença e inibidores durante a extração, e sim a quantidade reduzida de bactérias presentes nas amostras teciduais.

A presença de 63,3% de bactérias do CMTB encontradas em linfonodos bovinos foi alta, considerando os esforços para controlar a doença no rebanho nacional pelo PNCEBT, instituído há 12 anos. Esse resultado é relevante devido ao risco da infecção em humanos, representando um grande problema de saúde pública, principalmente para funcionários de fazendas e frigoríficos, e médicos veterinários (WINTHROP et al., 2005), uma vez que o contato próximo com os animais ou seus tecidos é um fator que aumenta o risco da transmissão (TORRES-GONZALEZ ET AL., 2013).

## **Conclusão**

Em conclusão, os resultados encontrados demonstram que a combinação de análises laboratoriais e inspeção é útil para aumentar a detecção da presença de *Mycobacterium* sp. diretamente em tecidos, sendo uma importante ferramenta de vigilância e controle desta zoonose.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIEKLE, P.V. et al. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.11, p.86-91, 1991.

BASCUÑANA, C.R.; BELÁK, K. Detection and identification of *Mycobacteria* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2351-2344, 1996.

BOUKARY, A.R.; THYS, E.; ABATIH, E. et al. Bovine tuberculosis prevalence survey on cattle in the rural livestock system of Torodi (Niger). **PLoS One**, v.6, n.9, e24629, 2011.

BRASIL. **Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose**. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2006. 190f.

BRUNELLO, F.; LIGOZZI, M.; CRISTELLI, E. et al. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2799–2806, 2001.

CHARRO, F.D.; OSÓRIO, A.L.A.R. Diagnóstico da tuberculose bovina por meio de histopatologia. Disponível em: <<http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=429>>.

Acesso em: 15 mar. 2009.

CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; DAMMEN, M.A.; WEEKS, S.R. et al. Comparison of two DNA extractions and nested PCR, real-time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* in bovine feces. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.87-93, 2003.

COLLINS, D.M.; STEPHENS, D.M.; DE LISLE, G.W. Comparison of polymerase chain reaction tests and fecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. **Veterinary Microbiology**, v.36, p.289–299, 1993.

COLLINS, D.M. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.151, p.2-7, 2011.

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

COUSIN, D.V.; HUCHZERMEYER, H.F.K.A.; GRIFFIN, J.F.T. et al. Tuberculosis. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**, 2ed. Oxford: 2004. p.1973-1993.

FERREIRA NETO, J.S.; BERNARDI, F. Control of bovine tuberculosis, particularly in Brazil. **Higiene Alimentar**, v.11, p.9-13, 1997.

GARBACCIO, S.G.; CATALDI, A.A. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.42, p.247-25, 2010.

HALDAR, S.; BOSE, M.; CHAKRABARTI, P. et al. Improved laboratory diagnosis of tuberculosis – The Indian experience. **Tuberculosis**, v.91, p.414-426, 2011.

HERRERA-LEÓN, L.; POZUELO-DÍAZ, R.; MORENO, T.M. et al. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.27, p.496-502, 2009.

IMAEDA, T. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium africanum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.35, p.147-150, 1985.

JOHNSON, L.K.; LIEBANA, E.; NUNEZ, A. et al. Histological observations of bovine tuberculosis in lung and lymph node tissues from british deer. **The Veterinary Journal**, v.175, p.409-412, 2008.

KESARWANI, R.C.; PANDEY, A.; MISRA, A. et al. Polymerase chain reaction (PCR): Its comparison with conventional techniques for diagnosis of extra-pulmonary tubercular diseases. **Indian Journal Surgery**, v.66, p.84-88, 2004.

LAGE, A.P. LOBATO, F.C.F.; MOTA, P.M.P.C.; GONGALVES, V.S.P. **Atualização em tuberculose bovina**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998. 65f.

LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; MATEOS, A. et al. Simple and rapid deteciton of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.33-36, 1995.

LIÉBANA, E.; JOHNSON, L.; GOUGH, J. et al. Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. **The Veterinary Journal**, v.176, p.354-360, 2008.

MARCONDES, A.G.; SHIKAMA, M.L.M.; VASCONCELLOS, A.S. et al. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de agar Middlebrook 7H11 e meio de *Stonebrink* para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.43, p.262-269, 2006.

MARTINS, S.C.; OSÓRIO, A.L.R.; GUIMARÃES, E.B. et al. Pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes em cortes histológicos de lesões sugestivas em bovinos. **Higiene Alimentar**, v.22, p.71-76, 2008.

MCCUNE, J.R.; TOMPSETT, R.M. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. I. The persistence of drug-susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. **Journal of Experimental Medicine**, v.104, p.737-762, 1956.

- MILIAN-SUAZO F, SALMAN MD, RAMIREZ C, et al. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. **American Journal Veterinary Research**, v.61, p.86-89, 2000.
- MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U., JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.111-124, 1994.
- NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B. et al. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.41-52, 1994.
- NEILL, S.D.; SKUCE, R.A.; POLLOCK, J.M. Tuberculosis – new light from an old window. **Journal Applied Microbiology**, v.98, p.1261–1269, 2005.
- NIEMANN, S.; HARMSSEN, D.; RUSCH-GERDES, S. et al. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3231–3234, 2000.
- NORBY, B.; BARTLETT, P.C.; FITZGERALD, S.D. et al. The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p.126–131, 2004.
- PACHECO, L.G.C.; PENA, R.R.; CASTRO, T.L.P. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal Medical Microbiology**, v.56, p.480-486, 2007.
- PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Health conditions in the Americas, 1990**. Washington DC: Pan American Health Organization, Vol.I, 1991. 404f.
- PIRES DE ARAÚJO, C.; LEITE, C.Q.; ANDRADE DE PRINCE, K.A. et al. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem

inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.749–752, 2005.

PROAÑO-PÉREZ, F.; BENITEZ-ORTIZ W.; DESMECHT D. et al. Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, n.101, p.65-72, 2011.

ROMERO, R.E.; GARZÓN, D.L.; MEJÍA, G.A. et al. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.63, p.101-6, 1999.

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

RUGGIERO, A.P.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A. et al. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.74, n.1, p.55-65, 2007.

SABEDOT, M.A.; BOETCHER, A.V.; POZZA, M.S. et al. Ocorrência de tuberculose e brucelose em rebanhos na região sudoeste do Paraná. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.12, 9f., 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning – A laboratory manual. New York: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol 1., 2001. 2344p.

SAS. Institute Inc. **The SAS System**, release 9.2. SAS Institute Inc., Cary:NC, 2008.

SOMMER, H.M.; WOOD, R. Mycobacterium. In: LANNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.Jr; et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 4ed. Washington: ASM Press, 1985. p.216-248.

- TAN, M.F.; NG, W.C.; CHAN, H. et al. Comparative usefulness of PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in different clinical specimens. **Journal Medical Microbiology**, v.46, p.164-169, 1997.
- TORRES-GONZALEZ, P.; SOBERANIS-RAMOS, O.; MARTINEZ-GAMBOA, A. et al. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.4, e2117, 2013.
- WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J. et al. Advanced Granulomatous Lesions in *Mycobacterium bovis*-infected Cattle are Associated with Increased Expression of Type I Procollagen, gd (WC1C) T Cells and CD 68C Cells. **Journal Comparative Pathology**, v.133, p.223-234, 2005.
- WINTHROP, K.L.; SCOTT, J.; BROWN, D. et al. Investigation of human contacts: a *Mycobacterium bovis* outbreak among cattle at a California dairy. **International Journal Tuberculosis Lung Diseases**, v.9, p.809–813, 2005.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the WHO meeting of zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*)**. Geneva: Technical Note, 1993. 27f.
- ZAKHAM, F.; BAZOUI, H.; AKRIM, M. et al. Evaluation of conventional molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from Morocco. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.6, p.40-45, 2012.
- ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T. et al. *Mycobacterium bovis*: Polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligo-typing and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.1-5, 2001.

ZUMARRAGA, M.J.; CATALDI, A.; BIGI, F. et al. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección de micobacterias en leche. **Revista Argentina de Microbiología**, v.31, p.4-5, 1999.