



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

Marcela Alexandrino

**Análise Espacial e Pesquisa Molecular do Complexo
Mycobacterium tuberculosis em Amostras de Leite
Bovino de Tanques de Resfriamento de Pequenas
Propriedades de Agricultura Familiar**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Doenças Tropicais

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Mattos dos Santos
Coorientadora: Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

**Botucatu
2023**

Marcela Alexandrino

**ANÁLISE ESPACIAL E PESQUISA MOLECULAR DO COMPLEXO
Mycobacterium tuberculosis EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO DE
TANQUES DE RESFRIAMENTO DE PEQUENAS PROPRIEDADES DE
AGRICULTURA FAMILIAR**

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus
de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Doenças
Tropicais.**

**Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Mattos dos Santos
Coorientadora: Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros**

**Botucatu
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Alexandrino, Marcela.

Análise espacial e pesquisa molecular do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de leite bovino de tanques de resfriamento de pequenas propriedades de agricultura familiar / Marcela Alexandrino. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Simone Baldini Lucheis
Coorientador: Rodrigo Mattos dos Santos
Coorientador: Maria Izabel Merino de Medeiros
Capes: 40101096

1. *Mycobacterium bovis*. 2. *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Zoonoses. 4. Leite. 5. Agricultura familiar.

Palavras-chave: Leite; *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium* spp.; Tanque de expansão; Zoonose.

Marcela Alexandrino

**ANÁLISE ESPACIAL E PESQUISA MOLECULAR DO COMPLEXO
Mycobacterium tuberculosis EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO DE
TANQUES DE RESFRIAMENTO DE PEQUENAS PROPRIEDADES DE
AGRICULTURA FAMILIAR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Cilmary Suemi Kurokawa

Membro

Departamento de Pediatria

FMB - UNESP – Botucatu

Dra. Vera Cláudia Lorenzetti Magalhães Curci

Membro

Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Instituto Biológico/Araçatuba-SP

Botucatu, 24 de fevereiro de 2023

Dedicatória

Aos meus pais, Adriana e Valdir,

Por serem a minha base de vida, pelo amor incondicional a mim dedicado, pelas conversas e conselhos, por toda intercessão e oração, por todo apoio e compreensão, por serem meu porto seguro. Pela oportunidade que me proporcionaram de estudar e me mostrarem que tenho um lugar para retornar quando necessário.

Agradecimentos

Agradeço à Deus, pois ele é minha força diária e sem Ele eu não estaria aqui. Pela proteção diária e livramento de todos os perigos. Agradeço a Nossa Senhora, pois sem a intercessão dela não conseguiria finalizar esse mestrado. Sem Eles eu não sou nada!

Agradeço a minha mãe, Adriana, e meu pai, Valdir! Vocês são as minhas jóias raras e minha base. Tudo que tenho e o que sou hoje é graças a vocês! Agradeço ao meu irmão, Lucas, pelo companheirismo, pelas risadas e conselhos, direcionamentos e correções! Vocês são meu refúgio onde posso voltar sempre que precisar e sei que sempre estaremos juntos! Vocês são meus exemplos. Eu os admiro muito! Obrigada por me permitirem dar mais um passo na minha carreira. Sem vocês nada seria possível! Amo muito vocês!

Agradeço ao meu namorado, Fábio, pelo apoio em todas as fases desse processo, por estar sempre ao meu lado nos dias tristes e felizes, por todo o companheirismo, por sempre me incentivar e por me amar do jeito que sou! Por ser meu ponto de paz e por sempre me acolher quando não estou bem. Pela história de vida que estamos contruindo, pelos ensinamentos e amadurecimento. Te amo!

A todos meus familiares que sempre se preocuparam comigo e me acompanharam e me apoiaram em todo o meu processo de aprendizado. Gratidão eterna!

À Doutora Simone Baldini Lucheis por acreditar no meu potencial. Por ter me dado a oportunidade de seguir em frente com o mestrado, pela paciência e compreensão em todos os momentos. Por todo o conhecimento científico passado, pelas conversas e por não desistir de mim. Mais que orientadora, tenho-te como exemplo! Obrigada!

A meu coorientador Rodrigo Mattos dos Santos, que me acompanhou em todo o processo da especialização e me apresentou a Simone, possibilitando novos processos de aprendizagem. Pelo conhecimento e pelos conselhos profissionais e pessoais passados durante todo esse processo, além

de acreditar e confiar no meu potencial. Gratidão!

À minha coorientadora Maria Izabel Merino de Medeiros, por me receber tão bem no APTA-Bauru e sempre me incentivar, mesmo quando os processos não estavam dando certo. Meus sinceros agradecimentos!

À minha amiga de especialização e pós-graduação, Daniela Filadelfo Sanches. Por todo companheirismo, risadas, lanches, conversas e todos os momentos de apoio. Com sua amizade tudo ficou mais fácil e leve. Presente da Unesp para a vida! Gratidão!

À Suzane Manzini, por ter me recebido tão bem no LASAB e por todo conhecimento e auxílio durante os processos práticos da pesquisa. Por me ensinar biologia molecular e por toda paciência em ensinar. Pelas conversas, risadas, conselhos e incentivos. Obrigada por se preocupar comigo nos dias de chuva na pista. Adorei te conhecer! Grata por tudo!

À Ana Paula Flaminio, por me receber tão bem no laboratório de Análises Moleculares de Micobactérias do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ e me ensinar técnicas de biologia molecular, além de ser um aprendizado novo a cada conversa nossa. Por ter paciência comigo e possibilitar o aprendizado da técnica de PCR em tempo real. Agradeço por todas as dicas e ajuda em todos os processos do trabalho. Nossas conversas e trocas de conhecimento ficará sempre marcada em minha memória. Adorei te conhecer! Eterna gratidão!

À Maria Eduarda Cavalheiro, pelas conversas, cafés e trocas de conhecimentos. Você é uma pessoa incrível! Gratidão!

À Thainá Valente Bertozzo, pelas conversas, risadas e por toda ajuda. Obrigada!

À Jackeline Sampaio Steinle, pelas conversas, risadas, pela espontaneidade e pela ajuda. Obrigada!

Ao Instituto Adolf Lutz – Sorocaba, pela concessão dos controles de *Mycobacterium tuberculosis* e ao Laboratório de Análises Moleculares de Micobactérias do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ, por conceder a cepa AN5 de *Mycobacterium bovis*.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB – UNESP, pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais.

Aos membros da banca examinadora, da qualificação e defesa, sendo titulares e suplentes, os quais foram escolhidos à dedo para este momento importante em minha vida! Agradeço por compartilharem todo o conhecimento de vocês!

À Seção Técnica de Pós-Graduação em especial a Tatiane de Fátima Pineiz, pelo auxílio durante esses dois anos.

À biblioteca do campus pelo suporte técnico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Auxílio a Pesquisa Regular – processo 2020/09409-2, o qual contribuiu para a compra de reagentes.

Meus sinceros agradecimentos a todos que passaram durante todo esse processo de aprendizado e puderam contribuir com meu crescimento pessoal e profissional!

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.” - Walter S. Landor

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” – Cora Coralina

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que corresponde um importante problema de saúde pública global, causada por um agente do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). A TB zoonótica ou bovina tem *Mycobacterium bovis* como agente e tem dentre seus hospedeiros animais silvestres, humanos e animais de produção, como bovinos. Esse patógeno infecta os seres humanos, principalmente pelo consumo de leite cru e seus derivados. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi pesquisar bactérias do CMT, especificamente *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*, patógenos de maior importância em saúde pública, empregando-se as técnicas de biologia molecular, PCR convencional e PCR em tempo real, com o uso de *primers* específicos para o CMT e para os patógenos de interesse do estudo, em 102 amostras de leite cru bovino, coletados a partir de tanques de expansão individuais, em pequenas propriedades rurais da região Centro-Oeste Paulista. Como resultado das análises, todas as amostras de leite testadas foram negativas para o CMT, *Mycobacterium tuberculosis* e para *Mycobacterium bovis*. Não obstante, há uma grande importância na constante vigilância epidemiológica destes patógenos pelo fato do leite cru ainda ser muito consumido e ter um forte potencial infeccioso, bem como a sua utilização na fabricação de sub-produtos, como queijo e manteiga, fontes de renda para o pequeno produtor, constituindo-se em risco para a saúde pública.

Palavras-chave: *Mycobacterium* spp.; *Mycobacterium bovis*; zoonose; leite; tanque de expansão.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that corresponds to an important global public health problem, caused by an agent of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (CMT). Zoonotic or bovine TB has *Mycobacterium bovis* as an agent and has among its hosts wild animals, humans and production animals, such as cattle. This pathogen infects humans mainly through the consumption of raw milk and its derivatives. Given the above, the objective of this study was to investigate CMT bacteria, specifically *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*, pathogens of greatest importance in public health, through molecular biology techniques, conventional PCR and real-time PCR, using specific *primers* for CMT and for the pathogens of interest in the study, in 102 samples of raw bovine milk, collected from individual expansion tanks, in small rural properties in the Midwest region of São Paulo. As a result of the analyses, all milk samples tested were negative for CMT, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. However, there is great importance in the constant epidemiological surveillance of these pathogens due to the fact that raw milk is still widely consumed and has a strong infectious potential, as well as its use in the manufacture of by-products, such as cheese and butter, sources of income for the small producer, constituting a risk to public health.

Keywords: *Mycobacterium spp.*; *Mycobacterium bovis*; zoonosis; milk; bulk tank.

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de transmissão da tuberculose zoonótica.....	23
Figura 2: Mapa do Brasil. Fonte: Qgis.....	37
Figura 3: Mapa do Estado de São Paulo, Brasil. Fonte: Qgis.....	38
Figura 4: Mapa de localização dos municípios das propriedades de coleta das amostras de leite. Fonte: QGIS.....	38
Figura 5: Quantificação de DNA das amostras extraídas.....	40
Figura 6: “A”: Bancada para a preparação do gel de agarose a 1,5%. “B”: Homogeneização do amplificado com tampão de corrida. “C”: colocação das amostras no gel de agarose. Fonte: arquivo pessoal.....	43
Figura 7: Preparação do <i>pool</i> de amostras para corrida de qPCR para bactérias do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Fonte: arquivo pessoal...	45

Lista de Tabelas

Tabela 1: Quantificação de DNA total a partir da extração das amostras de leite de tanque de expansão.....	72
---	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

BAAR – Bacilo Álcool-ácido Resistente

CMT – complexo *Mycobacterium tuberculosis*

cPCR – Reação em Cadeia da Polimerase convencional

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IS – Sequência de Inserção

M. bovis – *Mycobacterium bovis*

M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PNCEBT - Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

PPD - Derivado Proteico Purificado

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

TB – Tuberculose

TBb – Tuberculose bovina

TCC - Teste Cervical Comparativo

TCS - Teste Cervical Simples

The Union - União Internacional Contra Tuberculose e Doenças Pulmonares

TPC - Teste da Prega Caudal

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Classificação e propriedades das micobactérias.....	21
2.2 Tuberculose bovina	22
2.3 Diagnóstico da tuberculose bovina e o Programa Nacional de Erradicação e Controle da Tuberculose e Brucelose Animal (PNCEBT).....	25
2.4 Tuberculose zoonótica	28
2.5 O leite e a tuberculose zoonótica	30
3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	32
4. OBJETIVO	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	36
5.2 Local de realização dos exames	36
5.3 Amostras de leite bovino a partir de tanques de expansão	36
5.4 Exames Moleculares	39
5.4.1 Extração de DNA.....	39
5.4.2 Quantificação do DNA.....	39
5.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional – cPCR – Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40
5.4.4 Eletroforese em gel de agarose	42
5.4.5 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real – qPCR	44
5.4.6 Controles	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1 Extração e quantificação das amostras	48
6.2 Reação em Cadeia da Polimerase	48
7. DESAFIOS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO	55
8. CONCLUSÃO	57
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
10. ANEXOS.....	69
10.1 Anexo 1: Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo.	69
10.2 Anexo 2: Protocolo de extração das amostras de leite com o Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®).	70
10.3 Anexo 3: Quantificação de DNA a partir da extração das amostras de	

leite de tanque de expansão..... 72

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que corresponde um importante problema de saúde pública global. Caracteriza-se por uma infecção granulomatosa necrosante causada por um agente do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2016).

A TB zoonótica ou bovina é uma enfermidade infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Essa doença acomete uma infinidade de hospedeiros, dentre eles animais silvestres, como observado nas Américas, em raposas, quatis, coiotes, gambás e ursos; pode também infectar principalmente animais de produção e também infecta seres humanos (DOMINGOS *et al.*, 2019; SEVERINO *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2021).

O leite é uma das principais fontes de proteína e gordura, sendo consumido por mais de seis bilhões de pessoas em todo o mundo. Contudo, o leite também é um meio latente para a TB zoonótica, visto que *M. bovis* pode infectar as glândulas mamárias do animal causando mastite e infecções cutâneas. Sendo assim a infecção de *M. bovis* em seres humanos ocorre, principalmente, pelo consumo de leite cru bovino e seus derivados provindos de fêmeas bovinas infectadas. (ZUMÁRRAGA *et al.*, 2012; LIMA; JUNQUEIRA JÚNIOR, 2019; TAO *et al.*, 2020).

A infecção pela via oral é subnotificada sendo necessária maiores pesquisas nessa área. Sabe-se que essa bactéria pode acometer os seres humanos por outras vias que não a aérea, como exemplo o consumo de leite cru e seus derivados sem inspeção, como queijos artesanais, iogurtes além de

carnes contaminadas, bem como pela água e fômites contaminados; além disso, essa bactéria pode durar anos no meio ambiente, apresentando uma enorme resistência ambiental e a produtos químicos (FLAMINIO, 2019).

No mundo, em 2020, aproximadamente 9,9 milhões de indivíduos foram acometidos pela doença, sendo responsável por 1,3 milhão de óbitos de pessoas não infectadas pelo HIV. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2019 a TB era a primeira causa de óbitos por um único agente infeccioso, tendo sido ultrapassada pela Covid-19 em 2020. No Brasil, cerca de 68 mil novos casos de TB foram notificados em 2021, conferindo um coeficiente de incidência de 32 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2022a).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação e propriedades das micobactérias

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. O termo micobactéria significa fungo-bactéria, em razão da estrutura de sua parede celular única e complexa, pois possui um conteúdo lipídico correspondente a 60% do peso seco da célula micobacteriana. Não se coram pelo método de Gram, mas são considerados Gram positivos. Coram-se por vários corantes básicos, porém não se descoram com a solução de álcool-ácido. Isto ocorre pela presença de ácido micólico, que faz parte dos lipídios que compõem a parede celular, impedindo a remoção do corante pelo álcool-ácido que os caracteriza como bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) – técnica de coloração de Ziehl-Neelsen - permitindo sua identificação por microscopia direta

(COUSINS *et al.* 2003; BRASIL 2006; PAES; FRANCO, 2016; PROCOP *et al.*, 2018).

Segundo o National Library of Medicine (NCBI), o CMT é composto pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis* (causa a TB humana), *Mycobacterium bovis* (causador da TB em bovinos), *Mycobacterium caprae* (causador da doença em caprinos, bovinos e humanos), *Mycobacterium canettii* (variante de *M. tuberculosis* encontrada na região de Djibouti e Somália), *Mycobacterium africanum* (responsável por casos de TB humana no continente Africano), *Mycobacterium microti* (causa TB em roedores), *Mycobacterium pinnipedii* (causador da TB em leões marinhos e em humanos), *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium mungi* (isolado em uma população de mangustos em Botswana no sul da África), *Mycobacterium orygis* (causa TB em antílope (órix) , rinocerontes, gado leiteiro, macacos rhesus e humanos) (FLAMINIO, 2019; NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2020).

2.2 Tuberculose bovina

A tuberculose bovina (TBb) é uma doença economicamente importante e disseminada em bovinos, causada pelo *M. bovis* (ARNOT; MICHEL, 2020).

Essa doença pode afetar os humanos, bovinos, animais domésticos e silvestres caracterizando-se como uma importante zoonose, atual e ainda negligenciada (Figura 1). Os animais silvestres agem na disseminação da doença atuando como reservatórios, pois normalmente não são incluídos nos programas de vigilância e controle, expondo a saúde pública a um grande risco

por oferecerem perigo aos humanos (ALBERTTI, 2014; DUARTE *et al.*, 2019).

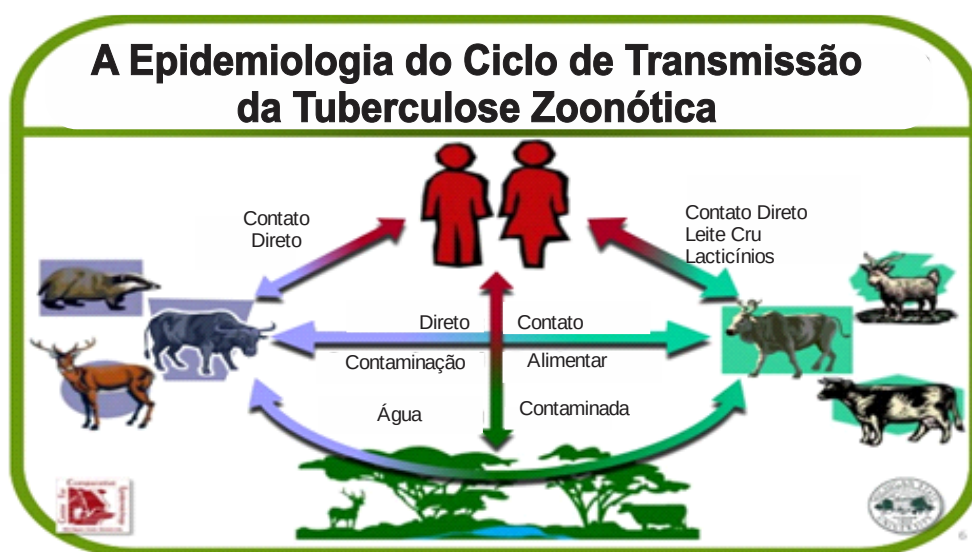


Figura 1: Ciclo de transmissão da tuberculose zoonótica. Fonte: Adaptado de HASIB, 2016.

A transmissão do patógeno para os bovinos ocorre majoritariamente pela via respiratória, pela inalação de gotículas infectadas eliminadas pela tosse ou da secreção nasal de um animal com TB ativa. Entretanto, a transmissão também acontece por via oral, principalmente por bezerros com a ingestão de leite de vacas tuberculosas, e também por vias congênicas, cutâneas e venéreas, ou seja a contaminação pode acontecer pela urina, sêmen e fezes, que podem contaminar o meio ambiente e fômites (MURAKAMI *et al.*, 2009; SIBHAT *et al.*, 2017).

O principal meio no qual a doença é introduzida nos rebanhos é pela aquisição de animais doentes, portadores inaparentes, sem o teste de tuberculina ou um teste mal realizado. A introdução do patógeno nas propriedades depende de vários fatores, como o tamanho do rebanho, unidade de criação, e, principalmente, das práticas zoonóticas e sanitárias. A doença é

mais frequente em rebanhos leiteiros do que em rebanhos de corte (BELCHIOR *et al.*, 2016; BRASIL, 2022b).

A patogenia da TB nos bovinos depende da via de infecção e pode causar uma grande diversidade de sinais clínicos; no entanto, causam muito pouco ou nenhum sintoma ou sinal clínico. No caso da inalação do patógeno, os bacilos irão se alojar no pulmão, promovendo uma reação inflamatória, determinando uma pneumonia e, por se tratar de uma doença granulomatosa, há formação de nódulos caseosos, com diversos tamanhos, tomando o parênquima pulmonar, originando lesões cavitárias. Quando a infecção ocorre por outros meios de transmissão, as lesões iniciais podem não ser percebidas; no entanto, as lesões de aspecto caseoso são mais observadas nos linfonodos de cabeça, pescoço, mediastínicos e mesentéricos, intestino, fígado, baço, pleura e peritônio (ROXO, 1996; MURAKAMI *et al.*, 2009).

Trata-se de uma das doenças em rebanhos que mais causa perda econômica e atinge uma quantidade significativa de bovinos leiteiros, observando que a TBb é mais frequente em rebanhos leiteiros do que em rebanhos de corte, podendo apresentar até 15% de infecções em um rebanho.

A introdução e manutenção da doença em um rebanho necessita de algumas características da unidade de criação, destacando-se o tipo de exploração, o tamanho do rebanho, a densidade populacional e as práticas zootécnicas e sanitárias (RAMOS *et al.*, 2015; BRASIL, 2022b).

O Brasil apresenta um dos maiores rebanhos bovinos no mundo. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2020 foram

contabilizados cerca de 218 milhões de animais no país. Estima-se que cerca de 1,3% dos rebanhos bovinos sejam acometidos pela TBb. Levando-se em consideração a saúde pública, a infecção por micobactérias em bovinos envolvem a condenação das carcaças em matadouros, além da redução na produção leiteira e de carne (BOLAÑOS *et al.*, 2017; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2022; CICARNE, 2021).

2.3 Diagnóstico da tuberculose bovina e o Programa Nacional de Erradicação e Controle da Tuberculose e Brucelose Animal (PNCEBT)

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) reconheceu a tuberculose e a brucelose como problema de saúde pública no Brasil, por se apresentarem como zoonoses geradoras de prejuízos econômicos e sociais devido ao impacto na produtividade dos rebanhos e dos riscos inerentes a saúde humana, criando assim, em 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (BRASIL, 2006).

O PNCEBT tem como objetivo diminuir a incidência e a prevalência da brucelose e da tuberculose com a meta de erradicação das duas doenças, sendo as medidas deste programa aplicadas em bovinos e bubalinos (BRASIL, 2017).

O diagnóstico precoce da TBb é uma importante ferramenta para sustentar o planejamento e as atividades de controle da doença. Pode ser realizada por métodos diretos e indiretos, sendo os diretos a pesquisa e identificação do agente etiológico em material biológico e os indiretos investigar a resposta imunológica do hospedeiro contra o patógeno (BRASIL, 2006). O diagnóstico no

post-mortem é realizado com a avaliação das lesões, de forma macroscópica e microscópica, que podem ser submetidas a histopatologia ou podem ser realizadas as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SOUZA *et al.*, 2016).

Como teste direto, pode ser realizado o teste de biologia molecular (PCR) em amostras biológicas suspeitas, como o leite, que permite a obtenção de um resultado mais rápido. Além do resultado mais rápido, a PCR é mais específica e sensível, permitindo a distinção entre as diferentes espécies de micobactérias mais importantes na saúde pública pela utilização de *primers* específicos para cada micobactéria (SILVA *et. al.*, 2016).

O método oficial adotado pelo PNCEBT é baseado na reação de hipersensibilidade tardia, mais conhecida como teste da tuberculina, que consiste em uma injeção intradérmica de PPD - Derivado Proteico Purificado, realizado no animal vivo e indicado principalmente para bovinos. Esse teste é capaz de revelar infecções no início, com 3 a 8 semanas após o contato com o patógeno, além de ser um exame de baixo custo e com alta disponibilidade. (RAMOS *et al.*, 2015).

Ao injetar a tuberculina em um animal infectado por micobactérias irá ocorrer uma resposta de hipersensibilidade tardia, podendo ser observada pelo endurecimento e edema progressivo no local da inoculação, com pico máximo em 72 horas e uma variação de até 6 horas para mais ou para menos. O resultado é obtido com a mensuração da intensidade da reação cutânea, observando o tamanho do endurecimento ou do engrossamento da pele

(BRASIL, 2006). Importante salientar que animais com tuberculose avançada podem desenvolver o fenômeno da anergia, que se caracteriza pela ausência de reatividade ao teste cutâneo tuberculínico, produzindo resultados falso-negativos (GORMLEY et al., 2006). Ainda, nos casos em que a infecção pelo *M.bovis* tenha ocorrido há menos de 40 dias e em fêmeas no período compreendido entre 30 dias antes e 30 dias após o parto (SALAZAR; GUIMARÃES, 2006).

Segundo o PNCETB, os testes de rotina utilizados para detecção da TBb são pela tuberculinização, a saber: o teste cervical simples (TCS), o teste da prega caudal (TPC) e o teste cervical comparativo (TCC). Assim quando um animal apresentar positividade para a doença, após a realização destes testes e contra-provas requeridas, este deve ser identificado na face direita com um “P” de Positivo, ser isolado do rebanho, afastado da produção leiteira e abatido em até 30 dias após o diagnóstico nos estabelecimentos sob serviço de inspeção oficial. A comunicação aos órgãos oficiais deve ser realizada, pois trata-se de uma doença de notificação compulsória (BRASIL, 2017).

A Febre Aftosa, Tuberculose, Brucelose, Raiva, Influenza Aviária e Doença de Newcastle, são exemplos que compõe uma lista de Doenças Animais de Notificação Obrigatória elencadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e que devem ser comunicadas imediatamente a Agência, de acordo com a Instrução Normativa Nº 50, de 24 de setembro de 2013 (BRASIL, 2019c).

2.4 Tuberculose zoonótica

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as zoonoses são definidas como qualquer doença ou infecção compartilhada naturalmente entre os animais vertebrados e seres humanos, sendo os patógenos zoonóticos de natureza bacteriana, como o caso da TBb por *M. bovis*, bem como patógenos virais ou parasitários (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a).

Apesar da TB humana ter como principal agente *M. tuberculosis*, o ser humano pode ser infectado pelo *M. bovis*, caracterizando a TB zoonótica. A manifestação mais comum desse tipo de doença é a extrapulmonar, devido aos meios de transmissão mais comuns. Essa doença pode se manifestar em diferentes partes do organismo humano, como ossos, linfonodos, intestino, sistema urinário e outros (LIMA; JUNQUEIRA-JÚNIOR, 2019; ASSI *et al.*, 2021).

A alta densidade humano-animal, consumo de leite cru não pasteurizado e produtos lácteos feitos com esse leite, contato físico próximo e frequente entre humanos e animais infectados e medidas inadequadas de controle da doença são os principais fatores de risco para TB zoonótica (COLLINS *et al.*, 2022)

A transmissão do *M. bovis* para os seres humanos pode acontecer por via direta, pela inalação do patógeno ou por via indireta, com o consumo de leite cru contaminado que não passou por nenhum processo de tratamento térmico. Ainda, a infecção pode acontecer pelo consumo de carne crua contaminada ou mal-cozida, derivada de abate clandestino e/ou sem inspeção, porém é menos frequente (GARCIA *et al.*, 2021). O contato de indivíduos que trabalham no abate e nas fazendas (médicos veterinários, funcionários de abatedouro, produtores de leite, ordenhadores e outros) com os animais infectados pode estabelecer uma

via de transmissão, sendo direta ou indireta, classificando a TB zoonótica como uma doença ocupacional (ROBINSON *et al.*, 1988; CUNHA *et al.*, 2012; BRASIL, 2019a).

As informações epidemiológicas da TB zoonótica no Brasil e na América Latina são deficientes e subnotificadas. As notificações normalmente são relatadas como uma proporção do número total de tuberculose humana e geralmente são providas de estudos envolvendo apenas grupos específicos e selecionados de pacientes (OLEA-POPELKA *et al.*, 2017; ASSI *et al.*, 2021).

A partir da publicação da Instrução Normativa 50 (IN50), publicada em setembro de 2013 e que determina quais doenças são de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial, a Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) conta com o apoio da população em geral (veterinários, produtores, pesquisadores, estudantes) para a identificação de focos de doenças/síndromes em animais terrestres em todo o Estado de São Paulo. A notificação deve ser feita preferencialmente através do Sistema Brasileiro de Vigilância e Emergências Veterinárias (e-SISBRAVET) ou, caso o meio eletrônico não seja acessível, a notificação pode ser feita em uma das regionais da Defesa (COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2022a).

Segundo dados da Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, em 2022, foram notificados e investigados dez focos de tuberculose bovina, abrangendo os municípios de Cunha, com 3 ocorrências; São Carlos, com duas; Taquarituba, com duas; Itapetininga, um caso; Joanópolis, um caso e Barretos,

com um caso, perfazendo um total de 42 bovinos positivos (COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2022a).

2.5 O leite e a tuberculose zoonótica

O leite é considerado uma *commodities* agropecuária, com maior importância no mundo, estando entre os cinco produtos mais comercializados. No mundo, cerca de 1 bilhão de pessoas são dependentes do leite para sobreviver e há cerca de 133 milhões de fazendas leiteiras ao redor do mundo (SIQUEIRA, 2019).

Esse alimento contém proteínas, açúcares, lipídios, e outros nutrientes necessários para o ser humano; assim, é considerado alimento completo para adultos, crianças e idosos. Entretanto, tais nutrientes constituintes do leite servem como substrato para o metabolismo de diversos patógenos (FRANCO *et al.*, 2013). Por ser um alimento muito consumido, a qualidade higiênica do leite e seus derivados é de extrema importância na saúde pública, pois ingerir o leite contaminado pode causar infecções aos seres humanos e em outros animais (ABRAHÃO *et al.*, 2005).

A tuberculose é uma das principais zoonoses transmitidas pelo consumo de leite bovino, pois *M. bovis* é altamente capaz de sobreviver no leite e em outros produtos lácteos, sendo encontrados em forma de bacilos viáveis em requeijão e iogurtes produzidos a partir de leite cru sem pasteurização por mais de 14 dias e na manteiga por mais de 100 dias (FRANCO *et al.*, 2013).

A realização de testes de triagem em amostras de leite vem sendo utilizadas para limitar a propagação de doenças infecciosas, incluindo as doenças causadas por micobactérias (FRANCO *et al.*, 2013). A Resolução SAA – 28, de 09/03/2022 visa estabelecer os procedimentos e prazos relacionados a vacinação, aos exames e à certificação de estabelecimento livres de Brucelose e Tuberculose, segundo o PNCETB no Estado de São Paulo, colocando-se no Artigo 8º que os produtores de leite *in natura* devem realizar os exames diagnósticos das patologias em bovinos destinados à produção leiteira e devendo apresentar os resultados desses testes aos laticínios e outros estabelecimentos processadores de leite, sendo essa obrigatória a partir do dia 1º de julho de 2023 (COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2022b).

No Brasil, o consumo de leite *per capita* está próximo de 170 litros/ano, sendo possível aumentar ao menos 100 litros *per capita*/ano, pois nos países desenvolvidos o volume de leite consumido anualmente, na forma fluida e de derivados, é de 278 litros (MARTINS, 2022).

No Brasil, desde 1950, a inspeção de produtos de origem animal, incluindo o leite e derivados, é obrigatória desde o Decreto nº 923/1969 de 10 de outubro de 1969, bem como a comercialização do leite cru é proibida em todo o território nacional; porém, a produção de leite clandestina (sem pasteurização) e procedente da agricultura familiar é disseminada (BRASIL, 1950; BRASIL, 1969; BARCELLOS *et al.*, 2019).

Em 2019, o setor formal de laticínios aumentou em 2,3%; entretanto, o comércio informal e a produção do leite e derivados ainda são presentes (EMBRAPA 2020). Segundo dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2022), em 2021 houve um consumo de leite informal de 9.621 milhões de litros *per capita* (MAGALHÃES JÚNIOR *et al.*, 2022).

Cerca de 33% de todo o leite produzido no Brasil não recebe nenhum tipo de fiscalização higiênica e sanitária; assim, a comercialização ocorre para a população de modo informal, observando-se também que uma parte do leite produzido é para consumo interno, bem como para a comercialização para geração de renda informal. Na área rural, a porcentagem de leite informal comercializado e o seu consumo torna-se maior, especialmente, em cidades de pequeno e médio porte (ALMEIDA *et al.*, 2016; FLORINDO *et al.*, 2021).

O consumo de leite cru, mesmo proibido por legislação no Brasil, ainda ocorre. Esse leite pode trazer muitos riscos a saúde de quem o consome pelo grande potencial de transmissão da TB zoonótica e de outros patógenos, como *Yersinia enterocolitica* (BERTOLINI *et al.*, 2019); *Listeria monocytogenes* (STEINLE, 2022); *Toxoplasma gondii* (MANZINI, 2022); *Salmonella*; *Shigella*; *Escherichia coli* (BELOTI, 2015).

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Tendo em vista a importância da tuberculose como doença infecciosa nos rebanhos e sua importância como doença zoonótica e o desconhecimento de dados acerca do diagnóstico molecular de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em leite de tanque nas propriedades rurais avaliadas, propusemos esta pesquisa.

OBJETIVO

4. OBJETIVO

Pesquisar bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, em amostras de leite cru bovino, especificamente *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de tanques de expansão em pequenas propriedades rurais da região Centro-Oeste Paulista.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética - CEUA - da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB – UNESP sob o número 1390/2021 (ANEXO 1).

5.2 Local de realização dos exames

O procedimento molecular de Reação em Cadeia da Polimerase convencional – cPCR foi realizado no Laboratório de Sanidade Animal da Unidade Regional de Pesquisa e Desenvolvimento - APTA/SAA - SP (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), situada na cidade Bauru-SP. O procedimento de PCR em tempo real (qPCR) foi realizado no Laboratório de Análises Moleculares de Micobactérias do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ – UNESP – Botucatu.

5.3 Amostras de leite bovino a partir de tanques de expansão

Devido a situação da pandemia por COVID-19, a proposta de ida presencial às propriedades leiteiras para coleta de material não foi possível, pois seria inadequado ao controle sanitário dentro das propriedades e à proteção à saúde dos produtores e funcionários pelas medidas de isolamento. Portanto, amostras de leite bovino, devidamente armazenadas no Laboratório de Sanidade Animal da APTA Centro-Oeste – Bauru, em freezer a -20° C, procedentes de 102

tanques de expansão individuais, foram aproveitadas para este estudo.

As amostras de leite eram procedentes de pequenas propriedades leiteiras, localizadas em oito diferentes municípios da região Centro-Oeste Paulista, apresentadas nas figuras a seguir, sendo coletado uma amostra de leite por propriedade: Anhembi (13 amostras), Avaré (47 amostras), Arandu (quatro amostras), Bofete (sete amostras), Botucatu (duas amostras), Bauru (três amostras), Cerqueira Cesar (dez amostras) e Pardinho (16 amostras).



Figura 2: Mapa do Brasil. Fonte: Qgis.



Figura 3: Mapa do Estado de São Paulo, Brasil. Fonte: Qgis.

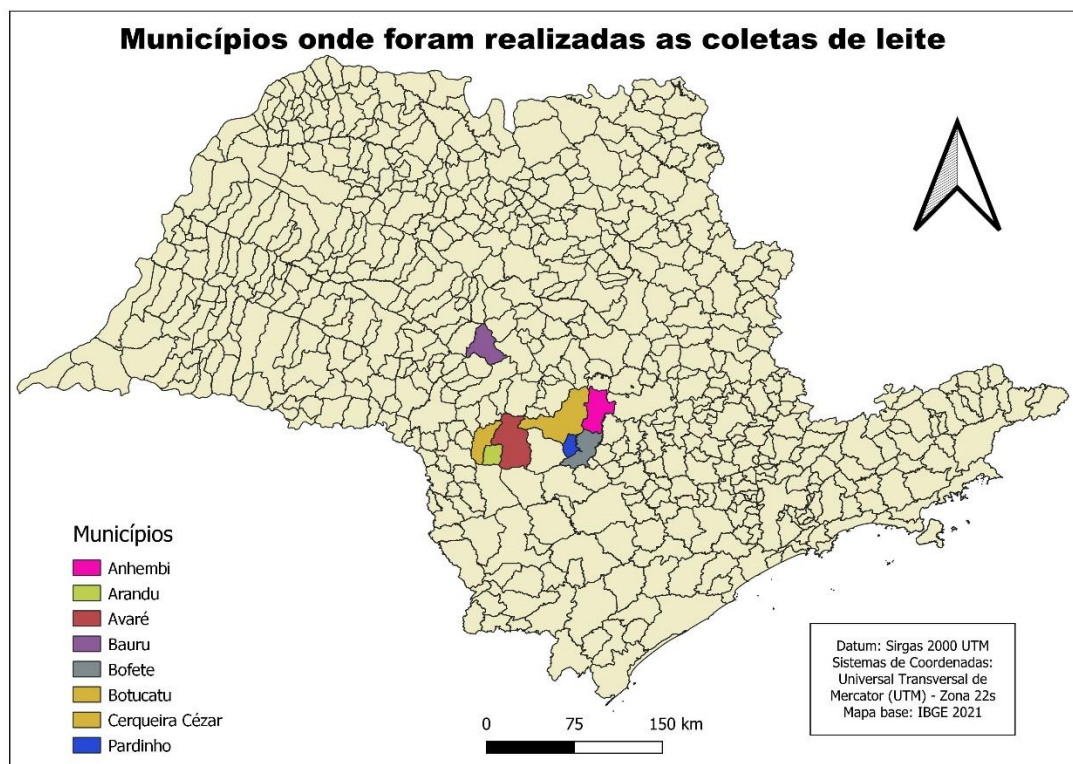


Figura 4: Mapa de localização dos municípios das propriedades de coleta das amostras de leite. Fonte: Qgis.

Os tanques se apresentavam em uma temperatura máxima de 4°C, e não armazenavam leite de ordenhas realizadas a mais de 48 horas (dois dias). Previamente à coleta, o agitador do tanque era ligado para que o leite fosse homogeneizado por pelo menos cinco minutos e, após este período, com um auxílio de uma concha de inox previamente esterilizada, coletou-se o volume de 250 mL de leite cru para um frasco plástico estéril, o qual foi acondicionado em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e em seguida encaminhado ao laboratório.

As amostras de leite coletadas no tanque de resfriamento nas propriedades rurais não haviam passado pelo processo de pasteurização, tendo em vista que eram encaminhadas ao laticínio para que pudessem então ser pasteurizadas.

5.4 Exames Moleculares

5.4.1 Extração de DNA

Para as amostras de leite, foi utilizado Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante e com modificações de Cunha et al. (2006). (ANEXO 2).

5.4.2 Quantificação do DNA

Para quantificar o DNA em cada amostra, foi utilizado o aparelho Quantificador NanoVue Plus® da GE Healthcare, Bioscience/UK. (Figura 5) (ANEXO 3).



Figura 5: Quantificação de DNA das amostras extraídas. Fonte: arquivo pessoal.

5.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional – cPCR – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Foi realizada a identificação molecular pela cPCR para o CMT, utilizando-se o alvo IS6110, segundo Liébana *et al.* (1996). Inicialmente as amostras foram testadas para a sequência de inserção IS6110, utilizando os *primers* descritos a seguir, os quais identificam as amostras positivas ao complexo *M. tuberculosis*:

INS-1 CGTGAGGGCATCGAGGTGGC

INS-2 GCGTAGGCGTCGGTGACAAA

As reações foram realizadas seguindo as condições: cada tubo de reação de 0,2 mL recebeu tampão de PCR (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl), 0,75 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTPs, 0,5 µL de Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA

Polymerase, Invitrogen®), 0,5 µM de cada *primer*, 2 µL da amostra testada e 17,5 µL de água ultrapura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo apresentou 23 µL do MIX-PCR e 2 µL do produto de extração do DNA.

A amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler Pro gradiente (Eppendorf®) com a ciclagem segundo Hermans *et al.* (1990) com adaptações. Desta forma, o ciclo consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos e, após esse período, a amplificação durante 35 ciclos iniciando com a desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* ao DNA alvo em 65°C 1 minuto; em seguida, ocorreu aumento na temperatura, chegando a 72°C, permanecendo por 2 minutos, até à extensão da nova fita de DNA com o ciclo de extensão final por 10 minutos a 72 °C. Após isso, a mistura foi refrigerada a 4 °C.

As amostras foram testadas também para a identificação molecular de *Mycobacterium bovis*, utilizando o gene *oxy R*, utilizando-se um volume final de reação de 25µL.

oxyRMB-1 (5'-GCACGACGGTGGCCAGGCA-3')

oxyRMB-2.1 (5'-TGGCCGGGCTTCGCGT-3')

As reações foram realizadas nas seguintes condições: cada tubo de reação de 0,2 mL recebeu tampão de PCR (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl), 0,75 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTPs, 0,5 µL de Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0,5 µM de cada *primer*, 2 µL da amostra testada e 17,5 µL de água ultrapura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo apresentou 23 µL do MIX-PCR e 2 µL do produto de extração do DNA. A amplificação gera um fragmento de 270 pb. O processo de ciclagem ocorre inicialmente a 95°C por 12

minutos, seguidos por 30 ciclos de duas etapas incluindo desnaturação a 94°C por 45 segundos e o anelamento mais extensão a 70°C por 1 minuto e 30 segundos (ESPINOSA DE LOS MONTEROS *et al.*, 1998).

5.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de tampão de corrida (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água ultrapura) e submetidas à eletroforese em cuba horizontal contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA) (Figura 6).



Figura 6: “A”: bancada para a preparação do gel de agarose a 1,5%. “B”: homogeneização do amplificado com tampão de corrida. “C”: colocação das amostras no gel de agarose. Fonte: arquivo pessoal.

A identificação dos produtos amplificados foi feita em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Syber Safe® (Invitrogen) 0,1 $\mu\text{L/mL}$. A voltagem utilizada foi de 100V por 90 minutos (1h30min). Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger 100 bp DNA Ladder (Norgen) e o tamanho dos fragmentos amplificados, foram comparados visualmente com os padrões de

peso molecular das cepas padrão utilizadas como controles positivos com o uso de luz UV e a imagem capturada pelo sistema Major Science™, a qual foi documentada utilizando-se o software Vision Works LS.

5.4.5 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real – qPCR

Para a realização da qPCR foi utilizado o método descrito por Flaminio (2019), com uso de *primers* para a sequência de inserção (IS) IS1081 do CMT, cujo marcador é encontrado em várias cópias no genoma de *M. bovis*. Foram utilizados para as amplificações o sistema: GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA), realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System com o 7500 Software v.2.3 (Applied Biosystems).

A reação total foi de 20 µL, sendo composta por: 10µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA), 0,4 µL (200nM) de *primer* Forward e 0,4 µL (200nM) de *primer Reverse* acrescidos de H₂O Nuclease Free para completar 15 µL de reação mais 5 µL da amostra a ser pesquisada, conforme FLAMINIO (2019). Para a realização da qPCR as 102 amostras foram aliquotadas em *pools*, totalizando 20 reações de qPCR, sendo 16 *pools* com 5 amostras e 4 *pools* com 3 amostras (Figura 7).

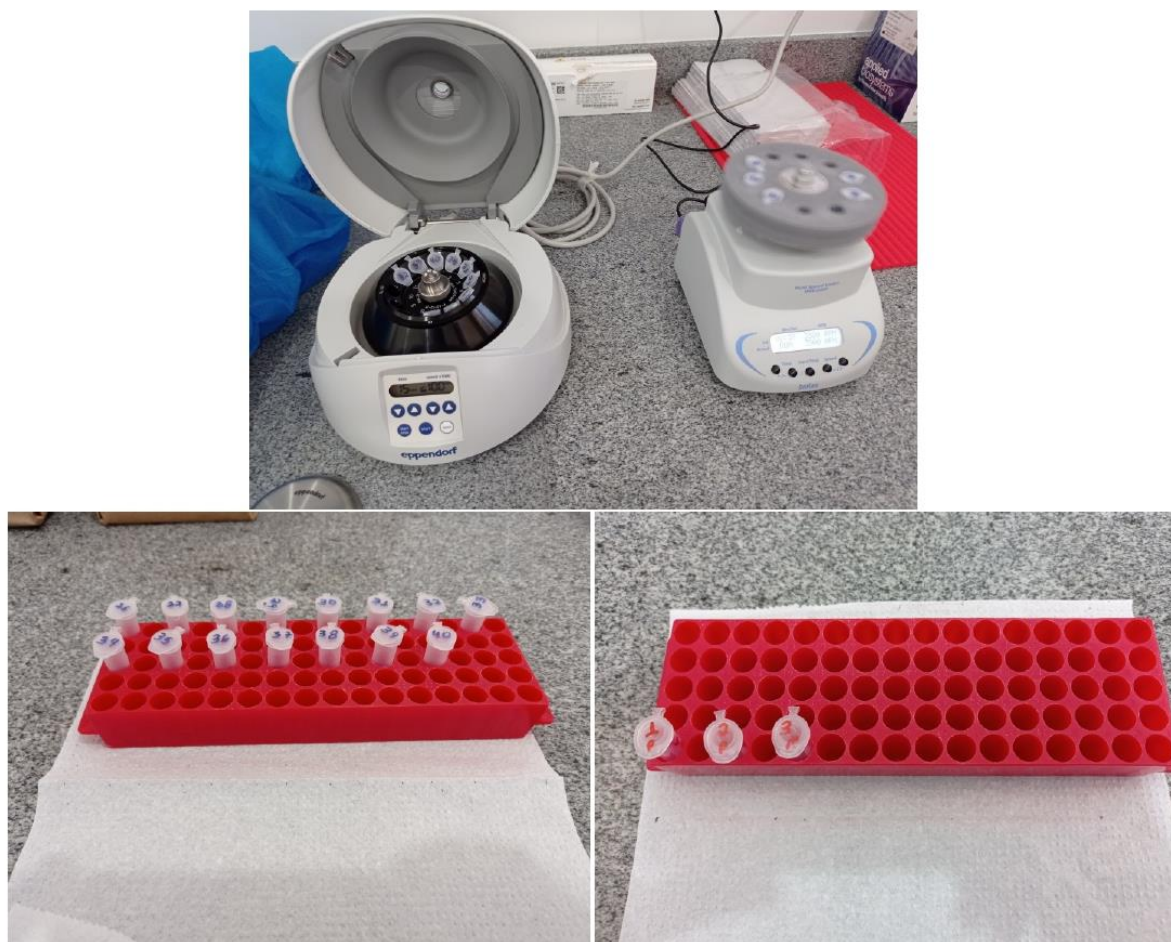


Figura 7: Preparação do *pool* de amostras para corrida de qPCR para bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Fonte: arquivo pessoal.

A sequência do *primers* (oligonucleotídeos) utilizada foi:

IS1081-1 F GGCTGCTCTCGACGTTCA

IS1081 -1 R CGCTGATTGGACCGCTCA

A programação estabelecida para o DNA foi de 95 °C por 10 minutos (desnaturação inicial), seguido por 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 60 segundos (transcrição). Sendo ao final, determinada a curva de dissociação (Melting), por meio da detecção da

fluorescência do SYBR Green (intercalante de DNA), durante aumento gradual de temperatura entre 60 e 95 °C, conforme descrito por Flaminio (2019).

5.4.6 Controles

Como controles positivos foram utilizadas cepas AN5 de *M. bovis* provindos de culturas, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Análises Moleculares de Micobactérias da FMVZ – UNESP – Botucatu. Como controle de *M. tuberculosis* foram utilizadas amostras de escarros humanos, gentilmente cedidos pelo Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba-SP, comprovadamente positivas para *M. tuberculosis* pela técnica de qPCR segundo Flamínio (2019). Para o controle negativo, utilizou-se H₂O Nuclease Free.

RESULTADOS

E

DISCUSSÃO

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extração e quantificação das amostras

Utilizou-se a relação 260/280, com o resultado entre 1.800 e 2.000 indicando uma confiabilidade no processo de extração do DNA das amostras de leite, evidenciando pouca ou nenhuma interferência de inibidores. A quantidade de DNA encontrada em cada amostra quantificada foi considerada satisfatória para dar seguimento as etapas da biologia molecular (ANEXO 3).

6.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Todas as 102 amostras de leite mostraram-se negativas à cPCR para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, assim como para a qPCR para *M. bovis*.

O método diagnóstico que apresenta mais confiabilidade para doenças causadas por micro-organismos é o isolamento e identificação do agente. Apesar da TBb apresentar a cultura microbiológica como padrão ouro, é recomendado a realização a partir de amostras teciduais, associado ao exame histopatológico, que permite a confirmação do diagnóstico; entretanto, esses métodos tradicionais para o crescimento de micro-organismos em condições laboratoriais ainda são ineficientes e demorados, e a bactéria precisa estar viva para que ocorra seu crescimento; ainda, a obtenção de amostras e a escassez de *M. bovis* nas secreções bovinas tornam pouco viável a utilização dessa técnica. Assim, as técnicas de PCR comparadas com a cultura e a tuberculinização apresentam melhor especificidade e sensibilidade para identificar infecções associadas a *M.*

bovis em amostras de sangue, leite e muco nasal (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; FLAMINIO, 2019).

Apesar das técnicas utilizadas apresentarem alta sensibilidade e especificidade para detecção das espécies de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, pode haver uma limitação devido ao fato de as amostras terem sido coletadas do tanque de expansão e essas serem constituídas de um complexo de micro-organismos, tornando difícil a detecção das micobactérias nesse ambiente. Não obstante, os *primers*, bem como a técnica escolhida, apresentam sensibilidade e especificidade para o agente da TBb, como já testado em amostras clínicas de linfonodos em carcaças condenadas pelo SIF para TBb, conforme descrito por Flaminio (2019), apresentando que há positividade do teste se houver pelo menos uma cópia de DNA de *M. bovis* na amostra.

As amostras de leite coletadas de tanque de expansão, comparadas a amostras de leite coletadas individualmente dos tetos dos animais, podem apresentar algumas limitações, tendo em vista o grande número de micro-organismos no leite do tanque; todavia, podem também ser utilizadas para a detecção de micobactérias com sucesso, como trabalho de Zumarraga *et al.* (2012), em que foram avaliados 257 amostras de leite de tanque de expansão na região de Santa Fé, Argentina, procedentes de 177 rebanhos certificados livres de TB e de 80 rebanhos não certificadas, tendo-se verificado 38% de positividade em rebanhos certificadas livres de tuberculose e em 44% de rebanhos não certificadas livres de tuberculose. Os autores colocam ainda, que a coleta de leite a partir de tanques de resfriamento deve ser aplicada na

inspeção oficial de rebanhos leiteiros, o que aumentaria a eficácia diagnóstica, com o uso de provas moleculares em detrimento do PPD tradicional, realizado em apenas um número pequeno de vacas (10%).

A partir do momento da detecção de amostras positivas no tanque, o diagnóstico deve ser confirmado testando-se individualmente os animais do rebanho. No entanto, as Informações sobre teste tuberculínico realizado no rebanho bovino das propriedades avaliadas não foram solicitadas, tendo em vista que as amostras de leite coletadas inicialmente do tanque de resfriamento foram conduzidas com a finalidade de pesquisa de outra bactéria.

Franco *et al.* (2013) verificaram que, a partir de 300 amostras de leite de tanques de expansão individuais e coletivos e amostras obtidas do comércio informal, da região Sudeste do Estado de São Paulo, a partir do isolamento e provas moleculares, foram identificadas 15 espécies distintas de *Mycobacterium*, sendo apenas uma amostra positiva para *M. bovis*, procedente de tanque de expansão individual.

A detecção de *M. bovis* a partir de 77 vacas negativas ao teste tuberculínico foi observado no trabalho de Zarden *et al.* (2013), tendo-se coletado leite de oito vacas em lactação. A partir da PCR para *M. bovis*, quatro amostras foram positivas e uma amostra positiva ao isolamento.

Apesar dos resultados negativos obtidos nesta pesquisa, a vigilância epidemiológica é de grande importância para o produtor e para a saúde pública, visto que *M. bovis* é um patógeno zoonótico com alta possibilidade de transmissibilidade para o ser humano pelo consumo de leite cru e seus derivados

e pelo consumo de carne contaminada. Além disso, os animais infectados representam importantes fontes de infecção para os profissionais que trabalham nas cadeias produtivas (ABRAHÃO *et al.*, 2005).

Segundo a Lei nº 8.080/90 a Vigilância Epidemiológica é:

“um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos.” (BRASIL, 1990)

Portanto, encontrar uma amostra positiva em um tanque de expansão representa um grande problema de saúde pública. Para isso, faz-se necessário a vigilância epidemiológica constante e ativa (ALMEIDA *et al.*, 2016).

Em países em desenvolvimento, há fatores de risco potenciais associados, que demonstraram serem propícios à disseminação e persistência da TBb, como por exemplo hábitos alimentares, havendo uma cultura de que o leite cru é mais rico, nível educacional como pouco conhecimento a respeito dessas doenças transmitidas de animais para seres humanos, estilo de vida, status socioeconômico, cultura, entre outros (KEMAL *et al.*, 2019).

A agricultura familiar é caracterizada como uma agricultura de subsistência, de pequena produção e de pobreza rural e é a principal responsável pela produção dos alimentos direcionados para o consumo da população (BRASIL, 2019b). A pesquisa de micobactérias a partir de leite procedente de pequenas propriedades com estas características é importante e necessária, tendo em vista que há a utilização do leite cru para uma complementação de renda, em que

alguns pequenos produtores comercializam o leite cru e também produzem derivados deste leite, como queijo e manteiga, o que pode se constituir em um transmissor potencial da tuberculose zoonótica.

O leite bovino e a cadeia produtiva do leite são relevantes para o agronegócio brasileiro, sendo o produto final e os derivados de leite de extrema importância para o ser humano, além da atividade leiteira possibilitar a geração de renda. Um importante fator na produção leiteira brasileira é ser predominantemente de pequenas e médias propriedades, sendo a mão-de-obra estritamente familiar, de onde vem a principal fonte de renda. Além disso, de acordo com o Censo Agropecuário as pequenas propriedades de característica de agricultura familiar correspondem a 57% de toda a produção de leite do país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017; BARCELLOS *et al.*, 2019).

Alguns estudos demonstram a cultura do leite cru como sendo mais “rico” e nutritivo, predominando em algumas populações, como relatam Ribeiro Júnior *et al.* (2020) em seu trabalho, em que cerca de 7,3% de 2.052 pessoas ainda consomem o leite cru (vendido em garrafas pet); ainda, Pieri *et al.* (2014) relataram que, 18,5% das pessoas entrevistadas em Minas Gerais consomem leite cru. As amostras de leite coletadas de fazendas leiteiras para realização de triagem têm sido utilizadas para controlar a transmissão de doenças infecciosas, incluindo a tuberculose zoonótica (FRANCO *et al.*, 2013).

Badini *et al.* (1996) conduziram um estudo identificando dez produtores rurais que comercializavam o leite cru nos municípios de Botucatu e São Manuel

(SP). Desses produtores, apenas cinco amostras de leite de um total de 60, apresentavam características microbiológicas dentro dos padrões legais, evidenciando a má qualidade do leite comercializado de forma incorreta. Considerando que o leite é comercializado de forma clandestina, desobedecendo a legislação, sabe-se que o consumo deste produto expõe a saúde do consumidor a riscos.

Trabalho desenvolvido por Cezar et al. (2016), dentre 802 amostras de leite bovino analisadas, verificou-se uma amostra (0,25%) e oito amostras de sangue (2%) positivas para *M. bovis* pela qPCR, o que demonstra a necessidade da constante vigilância para a tuberculose nos rebanhos, tendo em vista a gravidade desta doença para a saúde pública.

O avanço e desenvolvimento das técnicas de biologia molecular podem ajudar a determinar fontes de infecções e surtos, além de possibilitar entender a relação entre diferentes surtos e identificar reservatórios de *M. bovis* em animais selvagens (RAMOS *et al.*, 2014). Esse método diagnóstico para a TBb nos rebanhos tornou possível o avanço das pesquisas e o conhecimentos sobre a complexidade do processo imunológico na tuberculose; assim, há possibilidade de ter conhecimento da infecção por *M. bovis* nos animais antes do aparecimento de lesões e o encaminhamento de bovinos infectados para o abate, evitando o surgimento de um problema de saúde pública (FLAMINIO, 2019). Além disso, os estudos epidemiológicos moleculares visam fornecer a caracterização completa dos agentes infecciosos, com o objetivo de identificar as fontes físicas, vias de transmissão, genes de virulência, resistência a drogas, entre outros (EL-SAYED *et al.*, 2016).

Um estudo conduzido por Almeida (2021) revelou uma prevalência de 2,65% de *M. bovis* carcaças de bovinos no estado de São Paulo; já no estudo de Maurélio (2014) foi encontrado uma prevalência de 0,8% de animais reagentes em pequenas propriedade rurais do município de Botucatu-SP. Há a necessidade de mais estudos para que haja o monitoramento da infecção nos rebanhos bovinos, principalmente devido ao comércio clandestino de leite cru e fabricação de derivados com o uso do leite não pasteurizado.

Segundo dados da OMS, dentre 10 milhões de pessoas que apresentavam TB, em 140.000 tratava-se de casos de TB zoonótica, dos quais cerca de 11.400 vieram a óbito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b). Observando o grande número de novos casos de tuberculose zoonótica, a constante inspeção das fazendas leiteiras e o seguimento dos protocolos impostos pelo PNCEBT são de extrema importância, principalmente por ainda existir consumo e comércio informal do leite.

Em 2017, quatro parceiros da área da saúde, a OMS, a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a União Internacional Contra Tuberculose e Doenças Pulmonares (The Union), se uniram para criar o primeiro roteiro para combater a TB animal e a sua transmissão para seres humanos. Esse roteiro propôs dez ações prioritárias, que devem ser realizadas para quebrar a cadeia de transmissão da tuberculose zoonótica e da tuberculose bovina. Essas ações baseiam-se em melhorar a base de evidências, aumentando as notificações de TB zoonótica em humanos e ampliando a disponibilidade de ferramentas

diagnósticas; na redução da transmissão entre animais e humanos desenvolvendo estratégias de segurança alimentar e a diminuição da prevalência da doença em bovinos, identificando as populações-chave e vias de risco para transmissão de TB zoonótica; o fortalecimento da colaboração intersetorial, através do aumento da conscientização sobre a TB zoonótica, desenvolvimento e implementação de políticas para a prevenção, vigilância e diagnóstico; e o compromisso político em financiar a abordagem da doença em nível global, regional e nacional. Isso deve-se ao fato da tuberculose zoonótica ir além da saúde humana, pois a prevenção e o controle da TBb no animal são de extrema importância para evitar a transmissão para o ser humano, além de melhorar a segurança alimentar (OIE, 2017).

7. DESAFIOS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As amostras de leite bovino procedentes de tanques de expansão podem se constituir em uma triagem para a detecção de bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*; no entanto, tendo em vista que amostras de leite de tanque podem apresentar diversos contaminantes e um grande número de micro-organismos, podem limitar ou dificultar a detecção das micobactérias. Para estudos posteriores na pesquisa de micobactérias, amostras de leite de tanque são uma alternativa válida, porém, havendo possibilidade, recomenda-se realizar mais de uma coleta de amostras. Ainda, para otimização dos testes moleculares, a centrifugação prévia das amostras de leite coletadas pode permitir uma otimização na extração do DNA.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

O universo amostral estudado não apresentou bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. As amostras de leite analisadas a partir de técnicas moleculares e com o uso de *primers* específicos foram negativas.

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública.

Archives of Veterinary Science, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ALBERTTI, L. A. G. **Deteção de micobactérias em animais silvestres em sub-regiões do Pantanal Sul-Mato-Grossense**. 2014. 52 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014

ALMEIDA, A. C.; SANTOS, C. A.; MENEZES, I. R.; TEIXEIRA, L. M.; RAMOS COSTA, J. P.; SOUZA, R. M. Perfil sanitário de unidades agrícolas familiares produtoras de leite cru e adequação à legislação vigente. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 17, n. 3, p. 303-315, 2016.

ALMEIDA, C. A. S. **Prevalência da tuberculose bovina no estado de São Paulo com base na inspeção sanitária de carcaças em abatedouros**. 2021. 86 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2021.

ARNOT, L. F.; MICHEL, A. Challenges for controlling bovine tuberculosis in South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 87, n. 1, p. 1690, 2020.

ASSI, J. M.; FRANCHI, A. E.; RIBEIRO, L. F. Tuberculose bovina. **Gestão Tecnologia e Ciências**, Monte Carmelo, v. 10, n. 30, p. 97-107, 2021.

BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; GERMANO, P. M. L. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 549-552, 1996.

BARCELLOS, R. R.; JAMAS, L. T.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Agricultura familiar e sanidade animal. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 26, n. 1, p. 1-9, 2019.

BELCHIOR, A. P. C.; LOPES, L. B.; GONÇALVES, V. S. P.; CERQUEIRA LEITE, R. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 48, n. 2, p. 373-378, 2016.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BELOTI, V. **Leite**: obtenção, inspeção e qualidade. Londrina: Editora Planta, 2015. 420 p.

BERTOLINI, A. B.; DUTRA, M. A. O.; GUIRALDI, L. M.; SANTOS, W. J.; MEDEIROS, M. I. M.; LUCHEIS, S. B. Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica* in bovine milk samples of bulk tanks from dairy farms in São Paulo, Brazil. **Semina**: Ciências Agrárias, Londrina, v. 40, n. 2, p. 723-730, 2019.

BOLAÑOS, C. A. D.; DE PAULA, C. L.; GUERRA, S. T.; FRANCO, M. M. J.; RIBEIRO, M. G. Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: an overview. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 59, p. 1-13, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 18161, 18 dez. 1950.

BRASIL. Decreto-Lei nº 923, de 10 de outubro de 1969. Dispõe sobre a comercialização do leite. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 8601, 13 out. 1969. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/declei/1960-1969/decreto-lei-923-10-outubro-1969-375274-norma-pe.html>. Acesso em: 20 set. 2022.

BRASIL. **Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990**. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Brasília: Casa Civil; 1990. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm. Acesso em: 15 out. 2022

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006.

BRASIL. Instrução Normativa nº 10, de 3 de março de 2017. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 116, p. 4, 20 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agricultura Familiar**. Brasília: MAPA, 2019b. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura-familiar/agricultura-familiar-1>. Acesso em: 10 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 50, 24 de setembro de 2013**. Altera a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal. Brasília: MAPA, 2019c. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/Listadoencomasanimaisdenotificacaoobligatoria.pdf>. Acesso em: 8 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico - Tuberculose 2022**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brucelose e Tuberculose**. Brasília: MAPA, 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt/brucelose-bovina>. Acesso em: 25 ago. 2022.

CEZAR, R. D.; LUCENA-SILVA, N.; FILHO, A. F.; BORGES, J. D. E. M.; OLIVEIRA, P. R.; LÚCIO É. C.; ARRUDA-LIMA, M.; SANTANA, V. L.; PINHEIRO JUNIOR, J. W. **Molecular detection of Mycobacterium bovis in cattle herds of the state of Pernambuco, Brazil**. BMC Veterinary Research. v. 20, n. 1, p. 12-31, 2016

CICARNE. Centro de Inteligência de Carne Bovina. **A pecuária de corte mundial em números**. São Paulo: EMBRAPA, 2021.

COLLINS, A. B.; FLOYD, S.; GORDON, S. V.; MORE, S. J. Prevalence of *Mycobacterium bovis* in milk on dairy cattle farms: an international systematic literature review and meta-analysis. **Tuberculosis**, Edinburgh, v. 132, p. 102166, 2022.

COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Notificações auxiliam defesa agropecuária a identificar foco de doenças em animais**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2022a. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/noticias/2022/notificacoes-auxiliam-defesa-agropecuaria-a-identificar-foco-de-doencas-em-animais,1715.html>. Acesso em: 3 jan. 2023.

COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Resolução SAA – 28, de 09/03/2022**. Estabelece os procedimentos e os prazos relacionados à vacinação, aos exames e à certificação de estabelecimento livre de que tratam o Programa Estadual de Controle e

Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PECEBT) no Estado de São Paulo, e dá outras providências. São Paulo, 2022b. Disponível em: <
<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-28-de-09-03-2022,1604.html#:~:text=Artigo%201%C2%BA%2D%20Estabelecer%20os%20procedimentos,Estado%20de%20S%C3%A3o%20Paulo%20e>> Acesso em: 5 mar. 2023

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D.; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 53, pt. 5, p. 1305-1314, 2003.

CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 70-74, 2006.

CUNHA, M. V.; MATOS, F.; CANTO, A.; ALBUQUERQUE, T.; ALBERTO, J. R.; ARANHA, J. M.; VIEIRA-PINTO, M.; BOTELHO, A. Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: a molecular epidemiology perspective. **Research in Veterinary Science**, London, v. 92, n. 2, p. 225-235, 2012.

DHEDA, K.; BARRY, C. E.; MAARTENS, G. Tuberculosis. **The Lancet**, London, v. 387, n. 10024, p. 1211-1226, 2016.

DOMINGOS, S. C. B.; CARIOCA JÚNIOR, H. R.; LILENBAUM, W.; ROSA, M. T. S.; PEREIRA, C. D.; MEDERIOS, L. S. A systematic review on the distribution of *Mycobacterium bovis* infection among wildlife in the Americas. **Tropical Animal Health and Production**, Heidelberg, v. 51, n. 7, p. 1801-1805, 2019.

DUARTE, R. B.; CARRIJO, D. L.; OLIVEIRA, L. N.; MACHADO, M. V. M.; FURQUIM, R. C.; DE PAULA, E. M. N. Tuberculose zoonótica: importância em saúde pública. In: COLÓQUIO ESTADUAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR, 4.; CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR, 2., 2019, Mineiros. **Anais [...]**. Mineiros: Unifimes, 2019.

EL-SAYED, A.; EL-SHANNAT, S.; KAMEL, M.; CASTANEDA-VAZQUEZ, M. A.; CASTANED-VAZQUEZ, H. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in humans and cattle. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 63, n. 4, p. 251-264, 2016.

EMBRAPA. Maior volume de leite inspecionado da década. *In*: EMBRAPA. **Anuário Leite 2020**: leite de vacas felizes. Juíz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2020. p. 28-30.

ESPINOSA DE LOS MONTEROS, L. E.; GALÁN, J. C.; GUTIÉRREZ, M.; SANPER, S.; MARÍN, J. F. G.; MARTÍN, C.; DOMÍNGUEZ, L.; DE RAFAEL, L.; BAQUERO, F.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; BLÁZQUEZ, J. Allele-Specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 1, p. 239-242, 1998.

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**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1023-1033, 2008.

FLAMINIO, A. P. **Padronização e validação da técnica de PCR em tempo real para detecção de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* em linfonodos de bovinos**. 2019. 131 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2019.

FLORINDO, A. S. M.; SOUZA, G. V.; COMIN, V. C.; NESPOLO, N. M.; ROSSI, G. A. M. Avaliação do consumo de leite e derivados informais no município de São Carlos, Brasil. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 37, n. 2, p. 74-82, 2021.

FRANCO, M. M. J.; PAES, A. C.; RIBEIRO, M. G.; PANTOJA, J. C. F.; SANTOS, A. C. B.; MIYATA, M.; LEITE, C. Q. F.; MOTTA, R. G.; LISTONI, F. J. P. Occurrence of *Mycobacteria* in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, London, v. 9, p. 85, 2013.

GARCIA, M. S.; MELO, A. F.; CARVALHO, G. F.; POMIM, G. P.; NEVES, P. M. S.; SILVA, R. A. B.; OLIVEIRA, R. O.; FRIAS, D. F. R. Epidemiology of bovine tuberculosis in South America. **Research, Society and Development**, Itabira, v. 10, n. 9, p. 1-12, 2021.

GORMLEY, E.; DOYLE, M. B.; FITZSIMONS, T.; MCGILL, K.; COLLINS, J. D. **Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay**. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 112, p. 171-179, 2006.

HASIB, N. I. **WHO, The Union call countries to take zoonotic TB ‘seriously’**. Dhaka: Bdnews24.com, 2016. Disponível em:

<https://bdnews24.com/health/who-the-union-call-countries-to-take-zoonotic-tb-seriously>. Acesso em: 21 out. 2022.

HERMANS, P. W.; SOOLINGEN, D. V.; DALE, J. W.; SHUITEMA, A. R.; MCADAM, R. A.; CATTY, D.; EMBDEN, J. D. A. V. Insertion Element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 9, p. 2051-2058, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário**: resultados definitivos 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/bibliotecacatalogo?view=detalhes&id=73096>. Acesso em: 10 nov. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas)**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>. Acesso em: 15 set. 2022.

KEMAL, J.; SIBHAT, B.; ABRAHAM, A.; TEREFE, Y.; TULU, K. T.; WELAY, K.; GETAHUN, N. Bovine tuberculosis in eastern Ethiopia: prevalence, risk factors and its public health importance. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 19, n. 39, p. 1-9, 2019.

LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; FRANCIS, B.; COUSINS, D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 4, p. 933-938, 1996.

LIMA, A. M. C.; JUNQUEIRA JÚNIOR, D. G. Tuberculose zoonótica no Brasil ausente, negligenciada ou desconhecida? **Revista V&Z em Minas**, Belo Horizonte, n. 143, p. 29-33, 2019.

MAGALHÃES JÚNIOR, W. C. P.; HOTT, M. C.; ANDRADE, R. G. Leite UHT: retração no consumo redefine estratégias da indústria. In: EMBRAPA. **Anuário leite 2022**. Juíz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2022. p. 42-43.

MANZINI, S. **Análise espacial e pesquisa molecular de *Toxoplasma gondii* em amostras de leite bovino de tanque de expansão procedentes de pequenas propriedades de agricultura familiar**. 2022. 152 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2022.

MARTINS, P. C. Leite: 12 tendências para esta década. In: EMBRAPA. **Anuário leite 2022**: pecuária leiteira de precisão. Juíz de Fora: Embrapa Gado

de Leite, 2022. p. 32-35.

MAURELIO, A. P. V. **Situação epidemiológica da brucelose e tuberculose bovina em propriedades fornecedoras de leite para o programa “Laticínio Escola” do município de Botucatu - SP.** 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

MURAKAMI, P. S.; FUVERKI, R. B. N.; NAKATANI, S. M.; BARROS FILHO, I. R.; BIONDO, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 67-74, 2009.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Taxonomy browser. Oxford: NCBI, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=77643&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>. Acesso em: 20 ago. 2022.

OIE. **TB partners launch first roadmap to jointly stop the transmission of bovine and zoonotic tuberculosis.** Paris: World Organisation for Animal Health, 2017. Disponível em: <https://www.woah.org/en/tb-partners-launch-first-roadmap-to-jointly-stop-the-transmission-of-bovine-and-zoonotic-tuberculosis/>. Acesso em: 21 out. 2022.

OLEA-POPELKA, F.; MUWONGE, A.; PERERA, A.; DEAN, A. S.; MUMFORD, E.; ERLACHER-VINDEL, E.; FORCELLA, S.; SILK, B. J.; DITIUI, L.; EL IDRISSI, A.; RAVIGLIONE, M.; COVISI, O.; LOBUE, P.; FUJIWARA, P. I. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 17, n. 1, p. e21-e25, 2017.

PAES, A. C.; FRANCO, M. M. J. Tuberculose em animais de produção. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia.** Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 512-542.

PIERI, F. A.; COLOMBO, M.; MERHI, C. M.; JULIAT, V. A.; FERREIRA, M. S.; NERO, M. A.; NERO, L. A. Risky consumption habits and safety of fluid milk available in retail sales outlets in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 11, n. 6, p. 490-496, 2014.

PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. Introdução à microbiologia: parte I. In: PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. p. 15-120.

RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 75, n. 4, p. 830-837, 2015.

RAMOS, D. F.; TAVARES, L.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 2, p. 365-372, 2014.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; SANTOS, I. G. C.; DIAS, I. P.; MENDES, L. P.; BARBON, A. P. A. C. Perfil do consumidor brasileiro e hábitos de consumo de leite e derivados. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 21-30, 2020.

ROBINSON, P.; MORRIS, D.; ANTIC, R. *Mycobacterium Bovis* as an occupational hazard in abattoir workers. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, Balgowlah, v. 18, n. 5, p. 701-703, 1988.

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

SALAZAR, F. H. P.; GUIMARÃES, E. B. **Tuberculose bovina**. In: LEMOS, R. A. A. (Org.) Brucelose bovina, tuberculose bovina. Série Qualificação Rural. Volume 4. Campo Grande, MS: Ed. UFMS, 2006. p. 59-106.

SEVERINO, L. S.; SILVA, H. O.; ROSA, P. L. R. B. Relato de caso: tuberculose bovina. **Revista Agroveterinária, Negócios e Tecnologias**, Coromandel, v. 5, n. 2, p. 117-130, 2020.

SIBHAT, B.; ASMARE, K.; DEMISSIE, K.; AYELET, G.; MAMO, G.; AMENI, G. Bovine tuberculosis in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 147, p. 149-157, 2017.

SILVA, K. P. C.; ALCÂNTARA, A. M.; NUNES, A. C. B. T.; ARAÚJO, D. K. G. O.; SILVA, L. A.; FERREIRA, M. N. Z.; SANTOS, T. R. Detecção de *Mycobacterium bovis* por reação em cadeia de polimerase no leite de vacas reagentes ao teste de tuberculinização no estado de Alagoas. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 19, n. 3, p. 7-10, 2016.

SIQUEIRA, K. B. **O mercado consumidor de leite e derivados**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2019. (Circular Técnica, 120).

SOUZA, M. A.; BOMBONATO, N. G.; SOARES, P. M.; RAMOS, G. B.; CASTRO, I. P.; MEDEIROS, A. A.; LIMA, A. M. C. Comparison of complementary diagnostic methods of bovine tuberculosis on skin-test reactive cattle. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, n. 1/8, p. e0592014, 2016.

STEINLE, J. S. **Análise espacial e detecção molecular de *Listeria monocytogenes* em amostras de leite bovino procedentes de tanques de resfriamento de pequenas propriedades rurais**. 2022. 151 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2022.

TAO, Y.; YUN, J.; WANG, J.; XU, P.; LI, C.; LIU, H.; LAN, Y.; PAN, J.; DU, W. High performance detection of *Mycobacterium bovis* in milk using digital LAMP. **Food Chemistry**, Barking, v. 327, p. 126945, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zoonoses**. Geneva: WHO, 2020a. Disponível em: <http://www.who.int/topics/zoonoses/en/>. Acesso em: 15 set. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report**. Geneva: WHO, 2020b.

ZARDEN, C. F. O.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. E. S.; LILENBAUN, W. *Mycobacterium bovis* detection from milk of negative skin test cows. **The Veterinary Record**, Oxford, v. 172, n. 5, p. 130, 2013.

ZUMÁRRAGA, M. J.; SOUTULLO, A.; GARCÍA, M. I.; MARINI R.; ABDALA, A.; TARABLA, H.; ECHAIDE, S.; LÓPEZ, M.; ZERVINI, E.; CANAL, A.; CATALDI, A. A. Detection of *Mycobacterium bovis*-infected dairy herds using PCR in bulk tank milk samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 9, n. 2, p. 132-137, 2012.

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1: Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo.

CERTIFICADO Nº 1390/2021 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: “Análise espacial e pesquisa molecular do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de leite bovino de tanques de resfriamento de pequenas propriedades de agricultura familiar” - conduzido pelo Pesquisador: **Marcela Alexandrino** - Orientadora: **Profa. Doutora Simone Baldini Luchetti** - Coorientador: **Prof. Rodrigo Mattos dos Santos** registrado com o nº **1390/2021**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 29 de junho de 2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Espécie/Linhagem/Raça	Amostras de Leite
Nº Total de animais	ZERO
Idade/Peso	
Origem	CEUA 51/2016 FNUZ – CEUA 1367/2020 FMB

Sara Rosa Stanley Sampaio
Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Profa. Associada Bertha Furlan Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

The research project registered by the number 1390/2021 is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Botucatu Medical School - São Paulo State University (UNESP) on 29/June/2021.

Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP. CEP: 18618-970 Fones: (14) 38801880 – Email: Secretaria@fmb.unesp.br

10.2 Anexo 2: Protocolo de extração das amostras de leite com o Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®).

1. Em um microtubo de 1,5 mL, adicionar 900µL da amostra de leite.
2. Centrifugar a 14.000g por 2 minutos.
3. Eliminar o sobrenadante por inversão, deixando o pellet. Retirar a gordura da parede do tubo com swab estéril (individual)
4. Adicionar ao pellet 40 µL de tampão de lisozima e misturar imediatamente em vórtex.
5. Adicionar 10 µL de lisozima (10mg/mL) e misturar em vórtex.
6. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, agitando-se ocasionalmente.
7. Adicionar 10 µL da proteinase K (20mg/mL) e agitar em vórtex.
8. Incubar a 56°C por 15 a 30 minutos, agitando-se ocasionalmente
9. Prossiga com a adição de 400 µL da Lysis Solution no microtubo. Homogeneize bem com vórtex por 15 segundos.
10. Incube o microtubo em temperatura ambiente por 10 minutos com homogeneização intermitente para lise adicional.
11. Centrifugue rapidamente a 5000 g (rcf) por 1 minuto (ou 7000 rpm em 1 minuto) para levar as amostras para baixo.
12. Monte uma mini-coluna sobre o tubo de coleta fornecido. Use colunas individuais para amostras individuais. Estas colunas dão descartáveis.
13. Abra a tampa da coluna e transfira o lisado completo (450 µL) para a coluna usando a micropipeta.

14. Feche a tampa da coluna e transfira-a para uma microcentrífuga. Centrifugue a 11.000g por 1 minuto (ou a 10.400 rpm por 1 minuto).

15. Remova o tubo da coleta contendo o líquido cuidadosamente, sem tocar a base da coluna. Descarte esse líquido.

16. Adicione 500 µL da Lysis Solution na coluna e centrifugue a 11.000g por 1 minuto. Este passo adicional garante a completa lise das células e desnatura qualquer proteína residual.

17. Descarte o líquido.

18. Adicione 500 µL de Wash Buffer à coluna e centrifugue a 11.000g por 3 minutos.

19. Descarte o tubo de coleta com o líquido.

Importante: não deve sobrar nenhuma solução de lavagem (etanólica) na coluna. Se isso ocorrer, descarte o líquido da coluna e centrifugue por mais 1 minuto. O DNA preso à matriz de sílica está altamente puro e agora pronto para eluição.

20. Transfira a coluna de purificação para um microtubo novo.

21. Adicione 200 µL do Elution buffer (tampão de eluição) pré-aquecido a 70°C diretamente na coluna.

22. Incube a coluna por 1 minuto em temperatura ambiente.

23. Centrifugue a 11.000g por 1 minuto para recuperar o DNA.

24. O DNA eluído está pronto para as aplicações seguintes. Armazenar a -20°C.

10.3 Anexo 3: Quantificação de DNA a partir da extração das amostras de leite de tanque de expansão.

AMOSTRAS	RELAÇÃO 260/280	DNA AMOSTRA (ng/ul)
1	2.927	8.1
2	2.060	15.6
3	1.882	17.5
4	2.234	15.3
5	2.437	12.6
6	2.148	16.0
7	2.630	12.1
8	2.036	17.0
9	6.080	7.6
10	2.060	20.5
11	1.900	13.3
12	1.963	26.5
13	2.368	10.3
14	2.289	9.5
15	2.215	13.4
16	2.185	16.5
17	2.152	17.0
18	2.171	16.5
19	2.080	14.3
20	2.176	18.5
21	2.020	14.9
22	2.036	17.0
23	2.242	18.5
24	2.090	18.5
25	2.256	22.0
26	2.374	16.5
27	2.379	16.6
28	2.143	21.0
29	1.741	121.0
30	2.312	18.5
31	3.051	6.0
32	2.404	5.7

33	1.980	4.9
34	2.011	18.0
35	1.648	21.5
36	2.222	17.0
37	1.809	18.0
38	1.727	21.5
39	1.600	76.00
40	2.020	20.0
41	1.860	15.9
42	1.457	102.0
43	2.112	8.5
44	1.965	11.3
45	2.571	7.2
46	1.632	6.2
47	1.534	56.0
48	2.143	12.8
49	2.539	11.3
50	2.559	13.1
51	2.268	9.3
52	1.898	28.0
53	2.062	26.5
54	2.124	27.5
55	1.835	25.5
56	1.485	50.5
57	2.147	24.5
58	2.168	22.0
59	1.212	31.5
60	2.204	20.5
61	2.018	22.5
62	1.905	20.0
63	1.866	10.5
64	1.986	14.4
65	2.071	8.8
66	1.984	12.6
67	1.553	8.0
68	2.229	7.8

69	2.246	6.9
70	2.012	8.2
71	1.955	8.6
72	1.783	8.2
73	1.571	9.4
74	1.104	18.0
75	1.199	8.5
76	1.092	7.7
77	1.664	9.4
78	1.676	8.8
79	1.569	9.1
80	1.773	9.8
81	1.469	9.4
82	1.811	10.1
83	1.720	13.5
84	1.756	18.0
85	1.303	12.1
86	1.316	15.6
87	1.378	12.4
88	1.174	8.8
89	1.169	12.5
90	1.297	12.7
91	1.879	11.7
92	1.204	5.6
93	1.880	4.7
94	2.054	5.8
95	1.016	12.6
96	1.831	5.4
97	1.147	7.4
98	1.643	92.0
99	1.707	9.9
100	1.694	9.4
101	1.851	9.4
102	1.873	5.9