

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
UNESP CAMPUS DE JABOTICABAL/ SP**

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA
TUBERCULOSE EM BOVINOS ABATIDOS EM
MATADOUROS-FRIGORÍFICOS DO ESTADO DE SÃO
PAULO**

David Attuy Vey da Silva
Médico Veterinário

2015

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
UNESP CAMPUS DE JABOTICABAL/ SP**

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA
TUBERCULOSE EM BOVINOS ABATIDOS EM
MATADOUROS-FRIGORÍFICOS DO ESTADO DE SÃO
PAULO**

David Attuy Vey da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Karina Paes Bürger

Coorientadora: Profa. Dra. Lara Borges Keid

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Medicina Veterinária Preventiva

2015

S586c Silva, David Attuy Vey da
Comparação entre métodos diagnósticos da tuberculose em bovinos
abatidos em matadouros-frigoríficos do Estado de São Paulo / David
Attuy Vey da Silva. -- Jaboticabal, 2015
ix, p56. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Karina Paes Bürger
Banca examinadora: Raphaella Barbosa Meirelles Bartoli, Samir Issa
Samara
Bibliografia

1. Métodos de diagnóstico. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. PCR. 4.
Zoonoses. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:614.91:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

David Attuy Vey da Silva nasceu em Mogi Guaçu/ SP em 11 de Janeiro de 1989. Médico Veterinário graduado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, FCAV/ Unesp/ Jaboticabal/ SP no ano de 2012, Especialista em Docência do Ensino Superior pela Faculdade de Educação São Luis de Jaboticabal/ SP no ano de 2014. Durante a graduação e pós graduação se envolveu em projetos de extensão e pesquisa junto aos Departamentos de Zootecnia e Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/ Unesp/ Jaboticabal/ SP, além de estabelecer parcerias com outras instituições de pesquisa como a FZEA/ USP/ Pirassununga/ SP e a FMVZ/ Unesp/ Botucatu/ SP. Os dados obtidos foram publicados em reuniões, congressos, simpósios e periódicos científicos das áreas de Produção Animal, Zoonoses e Saúde Pública.

*“O coração do homem pode fazer planos, mas
a resposta certa dos lábios vem do Senhor”*

Pv. 16:01

Dedico

Aos meus pais Edgard Vey da Silva e Keyla Smirna Attuy, ao meu irmão Daniel Attuy Vey da Silva, aos meus avós paternos Edgard da Silva e Ana Lúcia Vey da Silva (*in memorian*), e maternos Ariowaldo Attuy (*in memorian*) e Inês Bela Pereira Attuy pelo carinho, apoio, confiança incondicional e constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me mostrar os caminhos a serem seguidos.

Aos meus pais Edgard Vey da Silva e Keyla Smirna Attuy, aos meus avós paternos Edgard da Silva e Ana Lúcia Vey da Silva (*in memorian*), e maternos Ariowaldo Attuy (*in memorian*) e Inês Bela Pereira Attuy pelo carinho, apoio, confiança incondicional e constante incentivo.

Ao meu irmão, Daniel Attuy Vey da Silva, por ter sido o principal alicerce em minha vida nos momentos mais difíceis.

À minha Orientadora, Professora Dra. Karina Paes Bürger pela confiança depositada em um caminho cheio de dúvidas.

À minha coorientadora, Profa Dra. Lara Borges Keid e à Profa Dra. Vera Letticie de Azevedo Ruiz pelo pronto atendimento nos momentos difíceis nos mostrando o caminho a ser seguido com grande competência.

À Profa. Dra. Jane Maria Bertocco Ezequiel pelo eterno incentivo à pesquisa e à busca pelo conhecimento.

Ao meu coorientado de Iniciação Científica (Fapesp) Márcio Junio Lima Siconelli pela grande contribuição na minha formação como Mestre.

À todos os amigos de pós-graduação, por fazerem parte diretamente ou indiretamente da minha vida acadêmica e científica e pela amizade conquistada, em especial ao mestrando Henrique Meiroz de Souza Almeida (Tainá), aos doutorandos Gabriel Rossi (Bola de Fogo), Carolina de Alvarenga Cruz (Carol), Marco Túlio Alr (Kapão), Henrique Leal Perez (Cadeira), Josimari Paschoaloto (Raxinha) e ao Dr. A Pastori D'Áurea (Mamaki) pelos momentos de diversão e apoio.

Aos amigos de graduação que ainda são presentes na minha vida, Henrique Meiroz de Souza Almeida (Tainá), Felipe Cotrim de Sousa (Birôlo), Victor Della Barba (Somongó), Bruno Rodrigues (Xambulância), Gabriela Capriogli (Tipóia), Cássia Belozzi

(Muleta), Ana Maria de Oliveira Gino (Batman) e Tatiana Geraissate Goreinstein (Ipanema) por estarem sempre ao meu lado, no riso e no choro.

Aos grandes e eternos amigos, Luiz Antônio Xavier Junior (Juninho), Bruno Fernando Binotto (Morsa), Thamires Mara Milani e Matheus Patini Barbosa por todos os momentos proporcionados por estas amizades.

À minha amiga e companheira Andressa Batistela, pelo amor, carinho, paciência, incentivo e dedicação mesmo nos momentos mais difíceis, serei sempre grato.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus de Jaboticabal/ SP, minha segunda casa durante o curso de graduação e mestrado, obrigado pela excelente formação profissional adquirida.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), ambas pertencentes à Universidade de São Paulo (USP), campus de Pirassununga/SP; à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus de Botucatu/ SP; ao Instituto Biológico de São Paulo/SP e ao Serviço de Inspeção Federal e aos Fiscais Federais Agropecuários do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que proporcionaram o desenvolvimento deste estudo.

À todos que influenciaram direta ou indiretamente minha formação acadêmica como Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), muito obrigado!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp pelo auxílio financeiro na modalidade de Bolsa de Mestrado.

"Não te mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o SENHOR, teu Deus, é contigo por onde quer que andares." Josué 1:9

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
3. OBJETIVOS.....	07
3.1. Objetivo Geral.....	07
3.2. Objetivos Específicos.....	07
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	08
4.1. Locais de condução do estudo.....	08
4.2. Diagnóstico anatomopatológico e caracterização das amostras.....	08
4.3. Diagnóstico pelo cultivo microbiológico.....	09
4.4. Diagnóstico histopatológico.....	10
4.5. Diagnósticos moleculares.....	10
4.5.1. Extração do DNA.....	10
4.5.1.1. Extração do DNA a partir das lesões teciduais sugestivas de tuberculose.....	11
4.5.1.2. Extração do DNA a partir das colônias bacterianas.....	11
4.5.2. PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais.....	12
4.5.3. PCR a partir de DNA extraído das colônias bacterianas.....	13
4.6. Análise dos dados.....	14
4.7. Geoprocessamento dos municípios de origem dos animais com lesões teciduais sugestivas de tuberculose.....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5.1. Diagnóstico anatomopatológico.....	16
5.2. Diagnóstico pelo cultivo microbiológico.....	17
5.3. Diagnóstico histopatológico.....	18
5.4. Diagnóstico molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais.....	20

5.4.1. Extração de DNA a partir das lesões teciduais.....	20
5.4.2. Produto da PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais.....	21
5.4.2.1. Produto da PCR espécie específica e da nested PCR..	22
5.4.2.2. Produto da multiplex PCR.....	25
5.5. Identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas.....	26
5.5.1. Extração de DNA a partir das colônias bacterianas.....	26
5.5.2. Produto da PCR a partir de DNA extraído das colônias bacterianas.....	27
5.5.2.1. Produto da PCR espécie específica.....	27
5.5.2.2. Produto da multiplex PCR.....	28
5.5.2.3. Controle de contaminação das reações.....	29
5.6. Comparação entre os métodos diagnósticos utilizados.....	30
5.7. Geoprocessamento dos municípios de origem dos animais com lesões teciduais sugestivas de tuberculose.....	37
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE.....	54
Apêndice A.....	55

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Classificação para cálculo de sensibilidade e especificidade.....	14
Tabela 2. Interpretação da concordância pelo coeficiente <i>Kappa</i> , segundo Pereira (2002).....	14
Tabela 3. Linfonodos com lesões teciduais sugestivas de tuberculose provenientes de bovinos abatidos em dois matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014.	16
Tabela 4. Diagnóstico histopatológico de linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose provenientes de bovinos abatidos em dois matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014.....	19
Tabela 5. Diagnóstico molecular a partir de DNA extraído de linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose provenientes de bovinos abatidos em dois matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014.....	24
Tabela 6. Resumo dos resultados obtidos nos métodos diagnósticos realizados a partir de amostras de lesões teciduais sugestivas de tuberculose provenientes de bovinos abatidos em dois matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014.....	30
Tabela 7. Concordância entre os métodos diagnósticos realizados expressa pelo coeficiente <i>Kappa</i>	31
Tabela 8. Sensibilidade, especificidade e índice de Youden dos testes diagnósticos realizados perante o padrão ouro (diagnóstico pelo cultivo microbiológico).....	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Amostra 1ITVLRBM referente à lesão tecidual sugestiva de tuberculose bovina coletada em matadouro-frigorífico sob SIF no Estado de São Paulo.....	16
Figura 2. Amostra 1ITVLRBM, proveniente de lesão tecidual sugestiva de tuberculose bovina, com crescimento de colônias bacterianas características de <i>M. bovis</i> em meio sólido Stonebrink-Leslie, sendo o diagnóstico padrão ouro para tuberculose.....	17
Figura 3. (A) Granuloma característico da tuberculose, proveniente de lesão tecidual sugestiva de tuberculose bovina, presença de área central com calcificação distrófica, necrose subsequente, circundada por infiltrado inflamatório composto principalmente por macrófagos. Coloração HE, aumento de 4x. (B) Corte exibindo BAAR (circulado) no citoplasma de uma célula gigante do tipo Langerhans. Coloração de ZN, aumento de 100x.....	18
Figura 4. DNA genômico proveniente de lesão tecidual sugestiva de tuberculose bovina provenientes de abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014. PM: padrão de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 1BM: amostra 1ITVLRBM. 4BM: amostra 4RILRBM. 8BM: amostra 8DELMBM. 13BM: amostra 13SJBLRBM.....	20
Figura 5. Produto de PCR de 500 pb indicador da presença de <i>Mycobacterium bovis</i> em amostra de material genético extraído a partir de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina provenientes de abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014. Linha 1: amostra 13SJBLRBM. CP: cepa padrão de <i>Mycobacterium bovis</i> . CN: controle negativo da reação (<i>mix</i> sem DNA). PM: padrão de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	22
Figura 6. Produto da PCR de 500 pb indicadores da presença de <i>M. bovis</i> em amostra de material genético extraído a partir de lesões teciduais	

sugestivas de tuberculose bovina provenientes de abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014. PM: Padrão de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CP: Controle positivo – cepa padrão de *M. bovis*; CN: Controle negativo – Ausência de DNA bacteriano..... 23

Figura 7. A -Produto da PCR de 500 pb indicador da presença de *M. bovis* em amostra de material genético extraído a partir de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina provenientes de abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014. PM: Padrão de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CP: Controle positivo – Cepa padrão de *M. bovis*; CN: Controle negativo – Ausência de DNA bacteriano. **B** - Produtos da PCR de 396 pb (*M.tuberculosis*), 506 pb (*Mycobacterium* spp.), 984 pb (complexo *M. tuberculosis*) e banda adicional de 870 pb (*M. bovis*) (PORTILLO et al., 1996). PM: Padrão de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CP e P1: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. bovis*; P2: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. tuberculosis*. CN: Controle negativo – Ausência de DNA bacteriano..... 25

Figura 8. Produto da PCR de 500 pb indicador da presença de *M. bovis* em amostra de material genético extraído a partir de colônias bacterianas provenientes de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina colhidas durante abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014. PM: Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). P1: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. tuberculosis*; P2: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. bovis*..... 27

Figura 9. Produto da PCR de 396pb (*M.tuberculosis*), 506pb (*Mycobacterium* spp.), 984pb (complexo *M. tuberculosis*) e banda adicional de 870pb (*M. bovis*) (PORTILLO et al., 1996) em amostra de material genético extraído a partir de colônias bacterianas provenientes de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina colhidas durante abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014PM: Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

P1: Controle positivo - Cepa Padrão de <i>M. tuberculosis</i> ; P2: Controle positivo - Cepa Padrão de <i>M. bovis</i>	28
Figura 10. Controles negativos das reações de PCR (CN4 a CN7: água; CN8: mix sem DNA) e PCR multiplex (CN1 a CN3: água) em amostra de material genético extraído a partir de colônias bacterianas provenientes de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina colhidas durante abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014. PM: Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).....	29
Figura 11. Gráfico do número de amostras positivas, provenientes de lesões teciduais sugestivas de tuberculose colhidas durante o abate de bovinos em dois matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo, em cada método realizado para diagnóstico da tuberculose bovina.....	30
Figura 12. Mapa temático e estatística espacial referente ao diagnóstico pela identificação molecular do <i>M. bovis</i> a partir de DNA extraído de lesões sugestivas de tuberculose coletadas no momento da inspeção, em matadouros-frigoríficos de bovinos da região nordeste do Estado de São Paulo durante o período de Julho de 2013 a Julho de 2014. Regiões pintadas em vermelho referem-se aos municípios cujas amostras foram consideradas positivas pela identificação molecular do <i>M. bovis</i> pela PCR...	37
Figura 13. Mapa temático e estatística espacial referente ao diagnóstico pela identificação molecular do <i>M. bovis</i> a partir de DNA extraído de lesões sugestivas de tuberculose coletadas no momento da inspeção, em matadouros-frigoríficos de bovinos da região nordeste do Estado de São Paulo durante o período de Julho de 2013 a Julho de 2014. Regiões pintadas em vermelho referem-se aos municípios cujas amostras foram consideradas positivas pela identificação molecular do <i>M. bovis</i> pela nested PCR.....	37
Figura 14. Mapa temático e estatística espacial referente ao diagnóstico pelo cultivo microbiológico do <i>M. bovis</i> a partir de lesões sugestivas de tuberculose coletadas no momento da inspeção, em matadouros-frigoríficos de bovinos da região nordeste do Estado de São Paulo durante	

o período de Julho de 2013 a Julho de 2014. Regiões pintadas em vermelho referem-se aos municípios cujas amostras foram consideradas positivas ao diagnóstico pelo cultivo microbiológico.....	38
Figura 15. Localização espacial dos municípios (pintados em vermelho) cujos matadouros-frigoríficos foram utilizados como fonte das coletas das lesões sugestivas de tuberculose estudadas durante o período de Julho de 2013 a Julho de 2014.....	39
Figura 16. Mapa temático e estatística espacial referente a todos os métodos diagnósticos estudados a partir de lesões sugestivas de tuberculose coletadas no momento da inspeção, em matadouros-frigoríficos de bovinos da região nordeste do Estado de São Paulo durante o período de Julho de 2013 a Julho de 2014. Regiões pintadas em vermelho referem-se aos municípios cujas amostras foram consideradas positivas em todos os métodos diagnósticos estudados.....	40

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE EM BOVINOS ABATIDOS EM MATADOUROS-FRIGORÍFICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO - A tuberculose é uma doença infectocontagiosa de caráter zoonótico de grande importância em saúde pública, sendo seu diagnóstico e o conhecimento de sua epidemiologia, peças fundamentais na sua prevenção e controle. Este trabalho objetivou a comparação entre métodos diagnósticos para tuberculose bovina. Foram realizados diagnósticos pelo cultivo microbiológico, caracterização histopatológica e identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e identificação molecular da infecção por *Mycobacterium bovis* em bovinos adultos abatidos em matadouros-frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) no Estado de São Paulo e posteriormente, os municípios de origem destes animais foram geoprocessados. Durante o abate, foram identificadas e coletadas amostras de linfonodos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. O diagnóstico pelo cultivo microbiológico foi realizado em meio de cultura sólido, a caracterização histopatológica pela coloração com hematoxilina eosina (HE), a identificação de BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) e o diagnóstico pela identificação molecular foi realizado a partir de DNA extraído das lesões sugestivas de tuberculose pela reação em cadeia pela polimerase (PCR, nested PCR e multiplex PCR) e a partir de DNA extraído das colônias isoladas para identificação do *M. bovis* utilizando-se a PCR e a multiplex PCR. Dentre as lesões sugestivas de tuberculose observadas, 50% (25/50) foram identificadas em linfonodos retrofaríngeos e todas foram caracterizadas como caseosas. Houve crescimento de colônias características de *M. bovis* em 56% (28/50) das amostras, 64% (32/50) das amostras foram consideradas positivas pela coloração com HE e 52% (26/50) pela coloração confirmatória de ZN (identificação de BAAR). A PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais apresentou 38% (19/50) das amostras positivas e a PCR a partir de DNA extraído das colônias apresentou 56% (28/50) das amostras positivas. O teste kappa (95%) entre os diagnósticos mostrou maiores concordâncias entre os diagnósticos moleculares realizados com DNA extraído das colônias, seguido dos métodos histopatológicos e moleculares realizados com DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose, perante o diagnóstico pelo cultivo microbiológico. Os maiores valores de sensibilidade e especificidade foram observados nos testes moleculares com DNA extraído das colônias, seguidos dos histopatológicos e dos moleculares com DNA extraído das lesões teciduais. O geoprocessamento dos municípios mostrou que não houve dependência espacial significativa ($P=0,29$) entre os municípios e a ocorrência de tuberculose ao avaliar todos os testes diagnósticos. Assim, a identificação de lesões durante o abate serve como triagem da tuberculose bovina, mas somente com o auxílio de métodos de diagnóstico laboratoriais, a tuberculose é diagnosticada definitivamente, fortalecendo sua investigação epidemiológica.

Palavras-chave: métodos de diagnóstico, *Mycobacterium bovis*, PCR, zoonose.

COMPARISON OF TUBERCULOSIS DIAGNOSTIC METHODS IN BOVINES SLAUGHTERED IN SLAUGHTERHOUSES OF SÃO PAULO STATE

ABSTRACT - Tuberculosis is a contagious infectious zoonotic disease of high importance in public health, which diagnosis and the epidemiology knowledge are essentials in this disease prevention and control. This study aimed to compare the different diagnostic tests for bovine tuberculosis. Microbiological culture, histopathological and molecular *M. bovis* diagnosis were made in adults bovines slaughtered in slaughterhouses under Inspection Federal Service - SIF in São Paulo State and after, the animals origin municipalities were geoproccessing. Samples of lymph nodes with macroscopic lesions suggestive of tuberculosis were identified and collected during the animals' slaughter. The microbiological diagnosis was made by culture in solid medium, histopathological characterization by staining with hematoxylin eosin (HE), identification of AFB by Ziehl-Neelsen (ZN) and the diagnosis by molecular identification was carried out from DNA extracted from the lesions suggestive of tuberculosis by polymerase chain reaction (PCR, nested PCR and multiplex PCR) and the DNA extracted from the colonies was isolated for *M. bovis* identification using PCR and multiplex PCR. Most injuries (50% - 25/50) was identified in retropharyngeal and all of them were characterized as caseous. *M. bovis* colonies growth was characteristics in 56% (28/50) of the samples and 64% (32/50) of the samples were positive by HE staining and 52% (26/50) for confirmatory ZN staining. The PCR directly from tissue showed 38% (19/50) of positive samples and the PCR from the colonies showed 56% (28/50) of positive samples. The kappa test (95%) between the diagnoses showed higher agreement between the molecular diagnostics of the colonies, followed by histopathological and molecular analysis of tuberculosis suggestive lesions toward the microbiological diagnosis. The highest sensitivity and specificity values were observed in the colonies molecular testing, followed by histopathological and lesions molecular testing. The geoproccessing municipalities showed no significant spatial dependence ($P=0.29$) between the municipalities and the occurrence of tuberculosis when all diagnostic tests was evaluate. Thus, the lesions identification during the slaughter is usefull as a screening for bovine tuberculosis, but only with the aid of laboratory diagnostic methods, tuberculosis is definitely diagnosed strengthening it epidemiological investigation.

Keywords: diagnostic methods, *Mycobacterium bovis*, PCR, zoonose.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina, infecção causada pelo *Mycobacterium bovis*, afeta uma ampla variedade de hospedeiros, inclusive os humanos, causando danos à saúde pública e prejuízos econômicos para a pecuária. A tuberculose bovina pode ser identificada a partir da observação de lesões macroscópicas características desta enfermidade. Assim, a inspeção sanitária em matadouros-frigoríficos é de grande importância para a saúde pública ao evitar o consumo carnes veiculadoras de patógenos, bem como aquelas portadoras de lesões anatomopatológicas. A inspeção *post mortem* é de grande importância para a vigilância epidemiológica da tuberculose, pois permite a identificação de maior número de casos sem manifestações clínicas, possibilitando melhor controle sobre tal enfermidade.

Além do diagnóstico a partir de lesões macroscópicas feito nos matadouros-frigoríficos, técnicas que facilitem e melhorem o diagnóstico direto da tuberculose bovina devem ser estudadas para detecção e identificação do agente etiológico no material biológico. Como alternativa rápida e barata às técnicas moleculares de identificação, tem-se a caracterização histopatológica de tecidos suspeitos associada à identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

Sendo assim, aliar conhecimentos sobre a identificação e a ocorrência do *M. bovis* e dados geoprocessados referentes à origem dos animais infectados é de grande relevância, já que se trata de uma zoonose de grande importância para a saúde da população.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica e efeito debilitante, causada pelo *Mycobacterium bovis*, cujo hospedeiro primário é o bovino. Une e Mori (2007) relataram que tanto o *Mycobacterium bovis* quanto o *Mycobacterium tuberculosis* são altamente patogênicos e infectam várias espécies de animais, incluindo os seres humanos, sendo esta enfermidade, um problema de saúde pública. Esta enfermidade é caracterizada pela formação de lesão do tipo granulomatosa, de aspecto nodular, denominada de “tubérculo” (FURLANETTO et al., 2012). Embora possam estar presentes em qualquer tecido do animal (CRMV, 2009), as lesões são encontradas com mais frequência em linfonodos, pulmões e fígado (ROXO, 1997; CARDOSO et. al., 2009).

As bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* são classificadas como micobactérias não pigmentadas de crescimento lento, sendo as principais espécies constituintes deste complexo o *M. tuberculosis*, o *M. bovis*, o *M. africanum* e o *M. microti*. Uma peculiaridade importante é o agrupamento dos bacilos em forma de ramos alongados e tortuosos, conhecidos como cordas. A observação de cordas à baciloscopia é uma indicação de que se trata de bactéria do complexo *M. tuberculosis*. O bacilo apresenta um alto conteúdo lipídico em sua parede celular, responsável por importantes efeitos biológicos, como a indução da formação de granuloma (CAMPOS, 2006).

O *M. bovis* causa tuberculose primariamente em bovinos, mas é o membro do complexo *M. tuberculosis* que tem a mais ampla gama de hospedeiros mamíferos domésticos e silvestres, inclusive o ser humano. Os hospedeiros de *M. bovis* comportam-se como reservatórios da infecção ou como hospedeiros ocasionais que participam do ciclo de transmissão do agente (HADDAD et al., 2004; SMITH et al., 2006). De acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal, o *M. bovis* é classificado como um patógeno de risco 3 para saúde pública, sendo alto para o indivíduo e limitado para a comunidade (OIE, 2005; THOEN et al., 2006).

O *Mycobacterium bovis* produz uma lesão granulomatosa específica, com componentes proliferativos e exsudativos. A primeira reação que se produz frente à penetração do bacilo, é do tipo exsudativo e de caráter inespecífico, que consiste em aparecimento de congestão vascular, edema e exsudação leucocitária, logo

formando granuloma tuberculoso, constituído por uma zona central de necrose caseosa, na qual pode-se observar mineralizações por precipitações de sais de cálcio. Rodeando esta zona de necrose, observam-se macrófagos com núcleo grande e claro, com abundante citoplasma, dispendo-se um ao lado do outro, conferindo ao conjunto um aspecto que recorda epitélio, chamado "células epiteloídes". Intercaladas observam-se células gigantes multinucleadas, com núcleos ordenados preferentemente na periferia, originários a partir da fusão de macrófagos (MOTA e NAKAJIMA, 1992).

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Os diretos envolvem a detecção e identificação do agente etiológico no material biológico. Os indiretos pesquisam uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral pela produção de anticorpos circulantes ou celular, mediada por linfócitos e macrófagos (PACHECO et al., 2009).

O diagnóstico direto da infecção tem especial aplicação como ferramenta de vigilância epidemiológica na fase final da cadeia produtiva. O cultivo microbiológico do *Mycobacterium* spp., conhecido como padrão ouro, é o método já certificado para este diagnóstico. O cultivo permite posterior identificação da micobactéria isolada (e/ou complexo) assim como a realização de testes de sensibilidade a antibióticos (ROXO, 1996; MARTINS, 2000). As principais desvantagens diagnósticas estão no tempo demasiadamente prolongado entre a inoculação e o surgimento de colônias macroscopicamente visíveis (6 a 8 semanas) e no fato de requerer organismos viáveis para sua realização, exigindo uma adequada manipulação dos espécimes clínicos (KONEMAN et al., 2001; AL-SERHANI, 2001).

Entre os métodos de diagnóstico que poderiam complementar a inspeção *post mortem* estão os testes histopatológicos, com coloração dos tecidos por hematoxilina-eosina (HE); a baciloscopia com coloração por Ziehl-Neelsen (ZN); a cultura bacteriológica; e também testes moleculares baseados nas reações em cadeia pela polimerase (PCR). Os métodos histológicos empregados para o diagnóstico de tuberculose são rápidos e baratos, contudo, apresentam baixa especificidade e sensibilidade (FURLANETTO et al., 2012).

Pinto et al. (2002) ao avaliarem bovinos suspeitos de tuberculose, comprovaram a importância do cultivo microbiológico aliado à tuberculinização e à

identificação anatomopatológica afim do aprimoramento das ações de decisão sanitária do médico veterinário. Assim como Alzamora Filho et al. (2014), que evidenciaram a necessidade da identificação anatomopatológica associada ao diagnóstico microbiológico e molecular para fornecer subsídios para investigação epidemiológica da tuberculose bovina, disponibilizando informações que auxiliam os órgãos de vigilância sanitária no desenvolvimento de estratégias para o controle desta enfermidade.

A identificação de alterações anatomopatológicas características durante a inspeção *post mortem* nos matadouros-frigoríficos aliada à realização dos métodos diretos de diagnóstico da tuberculose são importantes ferramentas na vigilância epidemiológica da doença (BIFFA et al., 2010). A inspeção *post mortem* dos animais destinados ao consumo nos abatedouros tem grande importância na vigilância epidemiológica da tuberculose e, por meio desta medida, países endêmicos que possuem satisfatório desempenho nos seus serviços de inspeção nos abatedouros, juntamente com um consolidado programa de erradicação, têm reduzido a prevalência da doença (DE LA RUA-DOMENECH, 2006; KANTOR e RITACCO, 1994).

Fráguas et al. (2008) avaliaram diferentes métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina e obtiveram maiores concordâncias entre o exame macroscópico anatomopatológico, a caracterização histopatológica e a identificação de BAAR em detrimento aos diagnósticos indiretos como o teste de ELISA e a tuberculinização.

O diagnóstico definitivo da tuberculose depende do isolamento e da identificação do agente etiológico. No entanto, esta metodologia apresenta aspectos restritivos para uso em larga escala, pois requer uma grande quantidade de bacilos viáveis, o que não é frequente em infecções recentes; requer também o uso de métodos drásticos de descontaminação, podendo comprometer a eficácia do cultivo; e o crescimento fastidioso do agente (FURLANETTO et al., 2012; FRÁGUAS et al., 2008).

Uma alternativa que permite a identificação rápida de micobactérias, encontradas em amostras clínicas ou em colônias isoladas, são os ensaios de PCR (FURLANETTO et al., 2012), com o objetivo de agilizar a instituição de tratamentos,

diminuição do tempo de detecção da resistência aos antimicrobianos e determinação de medidas apropriadas para o controle das infecções (OSOBA, 2004).

Na tuberculose, o método de PCR, assim como outros métodos moleculares, vem sendo empregado para a identificação e detecção do *Mycobacterium bovis* tanto em isolados de cultivos como em amostras clínicas (SAKAMOTO et al., 1999). O interesse pelos métodos moleculares tem se intensificado devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da doença em animais, principalmente pelas limitações quanto à sensibilidade e à especificidade do teste de reação cutânea e o longo período para a confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos (RORING et. al., 2000; ZANINI et. al., 2001).

Apesar de Alzamora Filho et al. (2014) afirmar que a combinação do isolamento pela bacteriologia clássica, seguido da identificação por métodos moleculares tem se mostrado eficiente para o diagnóstico direto da tuberculose bovina, Aagaard et al. (2006) afirma que métodos de diagnóstico mais eficientes, programas de vigilância epidemiológica, bem como o planejamento de futuras estratégias de vacinação, são necessários para controlar e erradicar a tuberculose bovina no futuro.

Furlanetto et al. (2012) encontraram quase cinco vezes mais amostras positivas ao avaliarem lesões sugestivas de tuberculose pelo método molecular quando comparado ao cultivo microbiológico. Os autores enfatizam que análises moleculares associadas à inspeção *post mortem* de rotina são promissoras para a vigilância da tuberculose bovina em abatedouros, contribuindo para o sucesso do programa de erradicação da tuberculose bovina. Taylor et al. (2007) também compararam métodos bacteriológicos e moleculares para o diagnóstico da tuberculose bovina, enfatizando a necessidade do uso destes métodos associados.

Segundo Rouquayrol e Goldbaum (1999), a epidemiologia é a ciência que estuda o processo saúde-doença em coletividades humanas, analisando a distribuição e os fatores determinantes das enfermidades, os danos à saúde e os eventos associados à saúde coletiva, propondo medidas específicas de prevenção, controle ou erradicação de doenças, e fornecendo indicadores que sirvam de suporte ao planejamento, à administração e à avaliação das ações de saúde.

O estudo da variação espacial dos eventos produz um diagnóstico comparativo que pode ser utilizado das seguintes maneiras: indicar os riscos a que a população está exposta, acompanhar a disseminação dos agravos à saúde, fornecer subsídios para explicações causais, definir prioridades de intervenção e avaliar o impacto das intervenções (PEREIRA, 2002). O geoprocessamento dos eventos de saúde é importante na análise e avaliação de riscos à saúde coletiva e os mapas temáticos são instrumentos poderosos na análise espacial do risco de determinada doença (SKABA et al., 2004; MALTA et al., 2001)

Neste sentido, conhecimentos sobre os diversos métodos diagnósticos e a ocorrência geográfica do complexo *M. tuberculosis* com o uso de dados geoprocessados referentes à origem dos animais infectados são de grande relevância para a saúde pública.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Comparar métodos de diagnóstico para tuberculose bovina pelo cultivo microbiológico, caracterização histopatológica, identificação de BAAR, identificação molecular da infecção por *M. bovis* a partir de amostras de tecidos com lesões sugestivas desta enfermidade, provenientes de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo e obter dados geoprocessados sobre esta enfermidade. Além de fornecer subsídios para as autoridades de saúde animal e pública para melhoria dos programas de controle e erradicação desta enfermidade.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificar e caracterizar lesões sugestivas de tuberculose em linfonodos de bovinos nas linhas de inspeção durante o abate dos animais.
- ✓ Realizar diagnóstico pelo cultivo microbiológico, pela caracterização histopatológica, pela identificação de BAAR e pela identificação molecular da infecção por *M. bovis* nas amostras.
- ✓ Realizar diagnóstico pela identificação molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose e a partir de DNA extraído das colônias bacterianas geradas pelo cultivo microbiológico.
- ✓ Estimar a sensibilidade e a especificidade dos métodos diagnósticos quando comparados ao padrão ouro (cultivo microbiológico) e calcular a concordância entre os métodos diagnósticos.
- ✓ Realizar o geoprocessamento dos municípios de origem dos animais infectados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de condução do estudo

As coletas de amostras foram realizadas em dois matadouros-frigoríficos sob SIF no nordeste do Estado de São Paulo. O diagnóstico pelo cultivo microbiológico foi realizado no Laboratório de Microbiologia das Enfermidades Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/Unesp/Botucatu/SP. A caracterização histopatológica e a identificação de BAAR foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP/Jaboticabal/SP. Os diagnósticos pela identificação molecular foram realizados no Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp/Jaboticabal/SP e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP/Pirassununga/São Paulo/SP.

4.2. Diagnóstico anatomopatológico e caracterização das amostras

Foram identificadas e coletadas 50 amostras de linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose, de acordo com o Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 1994), em bovinos durante a inspeção na linha de abate em dois matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo durante aproximadamente um ano (de julho de 2013 a julho de 2014). As coletas foram realizadas de acordo com normas específicas para casos suspeitos de tuberculose do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Tais amostras foram utilizadas para o diagnóstico pelo cultivo microbiológico, para a caracterização histopatológica e identificação de BAAR e para os diagnósticos moleculares da tuberculose bovina. As amostras foram coletadas e identificadas em duplicata, sendo armazenadas sob congelamento para os diagnósticos microbiológico e moleculares e mantidas a temperatura ambiente com adição de solução de formol a 10% na proporção 1:10 para os diagnósticos histopatológicos.

Os municípios de origem dos animais cujas lesões foram coletadas foram identificados para posterior geoprocessamento.

4.3. Diagnóstico pelo cultivo microbiológico

Para o cultivo e isolamento do *Mycobacterium bovis* foram utilizados os linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose coletados durante o abate. Foi utilizada a técnica descrita por Franco et al. (2013) com adaptações.

As amostras foram devidamente identificadas, descongeladas e levadas à câmara asséptica, onde foram maceradas. Aproximadamente 1g foi colocado em tubos de ensaio de 10 mL, adicionando-se 2 mL de solução fisiológica em cada tubo.

Procedeu-se, então, à descontaminação pela técnica de Petroff (Balian et al., 2002). Foram adicionados aos tubos 3 mL de hidróxido de sódio a 8%, com adição de 1 gota de solução alcoólica 1,5% de azul de bromotimol para cada 100 mL de hidróxido de sódio. A solução foi homogeneizada em vórtex e colocada em estufa por 30 minutos a 37° C. Posteriormente, foi adicionado aproximadamente 1,5 mL de ácido sulfúrico a 8% para que a solução ficasse com pH neutro ou ligeiramente ácido, sendo tal condição constatada por fitas indicadoras de pH. Os tubos foram centrifugados a 2055 x g por 20 minutos, posteriormente o sobrenadante foi descartado, foram adicionados 5 mL de solução fisiológica e em seguida, homogeneizado em vórtex. Tal procedimento de lavagem se repetiu por mais três vezes para que posteriormente o material fosse semeado.

Os meios Stonebrink-Leslie e Lowenstein-Jensen foram utilizados no cultivo microbiológico. O meio de Stonebrink-Leslie possui piruvato como fonte de carbono para os bacilos e é utilizado, especialmente, para o crescimento do *M. bovis*, uma vez que a glicerina é tóxica para o bacilo bovino. O meio de Lowenstein-Jensen possui a glicerina como fonte de carbono, que é utilizada como fonte de substratos para o crescimento das demais micobactérias.

O meio Stonebrink-Leslie foi preparado com fosfato monopotássico, fosfato dissódico, piruvato de sódio, água destilada, solução verde malaquita a 2% e ovos. O meio Lowenstein-Jensen foi preparado com água destilada, glicerina PA e ovos. Após o preparo dos meios, estes foram colocados em uma estufa por 45 minutos a 85°C. Posteriormente, permaneceram a temperatura ambiente por 12 horas para resfriar. No dia seguinte, as garrafas de cultivo contendo os devidos meios foram colocadas em uma estufa a 37° C por 24 a 48 horas para teste de esterilidade. Sem

qualquer contaminação aparente, os meios foram rotulados e armazenados sob refrigeração (temperatura entre 2° C e 8° C).

Os meios de cultura foram retirados da refrigeração e levados à câmara asséptica do laboratório, juntamente com o material a ser semeado. A entrada nesta área do laboratório foi realizada com uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI), constituído de gorro, avental descartável, luvas de procedimento descartáveis e máscara apropriada (N95).

Com alça bacteriológica estéril foi realizada a semeadura do conteúdo dos tubos nas garrafas de cultivo celular contendo os meios de Stonebrink-Leslie ou Lowenstein-Jensen, estes foram levadas para estufa a 37° C até que as micobactérias crescessem e se desenvolvessem no meio de cultura (de 12 a 90 dias), posteriormente, foram armazenados em temperatura ambiente. O tempo médio de crescimento bacteriano foi de aproximadamente 60 dias.

4.4. Diagnóstico histopatológico

Para os diagnósticos histopatológicos presuntivo e confirmatório foram utilizadas amostras coletadas durante o abate dos bovinos e armazenadas em solução de formol a 10% na proporção 1:10. Foi realizada a fixação do tecido em parafina, e o fragmento foi cortado na espessura de cinco micrômetros para confecção das lâminas. De cada amostra foram confeccionadas duas lâminas, uma foi corada com hematoxilina-eosina e a outra submetida à coloração de Ziehl-Neelsen (BEHMER et al., 1976). Na coloração com hematoxilina-eosina, o objetivo foi a caracterização histopatológica (diagnóstico presuntivo) e na coloração de Ziehl-Neelsen, buscou-se a identificação de BAAR (diagnóstico confirmatório).

4.5. Diagnósticos moleculares

4.5.1. Extração do DNA

As extrações de DNA das lesões e das colônias bacterianas foram realizadas segundo protocolo preconizado por Kuramae-Izioka (1997) e otimizado pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular da FCAV/UNESP/Jaboticabal/SP.

4.5.1.1. Extração do DNA a partir das lesões teciduais sugestivas de tuberculose

As amostras teciduais foram maceradas, e alíquotas de aproximadamente 0,3 g foram transferidas para tubos eppendorf de 2,0 mL. Para preservar o tecido da ação enzimática foram acrescentados aos tubos 800 µL de tampão de extração de DNA composto por 160 mM de Tris-HCl pH 8,0, 60 mM de EDTA pH 8,0, 20 mM de NaCl, SDS 0,5% (p/v) e 0,4% (v/v) de 2-mercaptoetanol. A solução foi agitada em vórtex e mantida a 65°C em equipamento Thermomixer (Eppendorf®) por 60 minutos.

Após a lise celular foram acrescentados 400 µL de acetato de potássio 5M à solução, a qual foi mantida em estante gelada por 30 minutos. Procedeu-se à centrifugação refrigerada a 12.200 x g, à temperatura de 10° C por 10 minutos para precipitação das proteínas e do SDS. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e, então, submetido a duas lavagens com solução de clorofórmio: álcoolisoamílico (24:1). Após as lavagens, obteve-se um sobrenadante translúcido, ao qual foram acrescentados 1.000 µL de álcool etílico absoluto. A mistura foi mantida a -20° C durante 12 horas para precipitação do DNA. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação a 12.200 x g, 10°C por 20 minutos para obtenção do *pellet* de DNA, o qual foi lavado em álcool etílico 70%. Após seco, o *pellet* foi diluído em solução TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado sob congelamento.

A qualidade do DNA foi aferida obtendo-se a relação da absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, desejável entre 1,8 a 2,0 (SAMBROOK e RUSSELL, 2001), com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-1.000 (Thermo Scientific®). A integridade do DNA obtido foi visualizada mediante eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

4.5.1.2. Extração do DNA a partir das colônias bacterianas

As colônias de *M. bovis* foram transferidas para tubos eppendorf de 2,0 mL. Foram acrescentados aos tubos 700 µL de tampão de extração de DNA composto por 160 mM de Tris-HCl pH 8,0, 60 mM de EDTA pH 8,0, 20 mM de NaCl e SDS

0,5% (p/v). A solução foi agitada em vórtex e mantida a 65°C em equipamento Thermomixer (Eppendorf®) por 60 minutos.

Após a lise celular foram acrescentados 350 µL de acetato de potássio 5M à solução, a qual foi mantida em estante gelada por 15 minutos. Procedeu-se a centrifugação refrigerada a 12.200 x g, à temperatura de 10°C por 10 minutos para precipitação das proteínas e do SDS. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e, então, submetido a duas lavagens com solução de clorofórmio: álcoolisoamílico (24:1). Após as lavagens, obteve-se um sobrenadante translúcido, ao qual foram acrescentados 1.000 µL de álcool etílico absoluto. A mistura foi mantida a -20°C durante 12 horas para precipitação do DNA. Posteriormente, procedeu-se à centrifugação a 12.200 x g, 10°C por 20 minutos para obtenção do *pellet* de DNA, o qual foi lavado em álcool etílico 70%. Após seco em estufa de luz por aproximadamente 30 minutos, o *pellet* foi diluído em solução TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado sob congelamento.

A qualidade e integridade do DNA foram aferidas da mesma maneira que se procedeu a análise do DNA extraído das lesões teciduais.

4.5.2. PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais

Os DNAs extraídos das lesões teciduais foram submetidos à PCR para identificação da presença do *Mycobacterium* spp., do complexo *M. tuberculosis* e da espécie *M. bovis*. O par de marcadores SCAR (*Sequenced Characterized Amplified Region Marker*) PT1 (5'-CGGCAACGCGCCGTCGGTGG-3') e PT2 (5'-CCCCCACGGCACCGCCGGG-3') foi desenhado a partir da proteína espécie-específica MTP40 e amplifica um fragmento de 396 pb para o *M. tuberculosis*. Por sua vez, o par de *primers* IS5 (5'-CGGAGACGGTGCGTAAGTGG-3') e IS6 (5'-GATGGACCGCCAGGGCTTGC-3'), desenhado a partir da sequência de inserção IS6110 para bactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, amplifica um fragmento de 984 pb com adição de uma banda de 870 pb para a espécie *M. bovis*. Para complementar, foi utilizado o par de marcadores SCAR MT1 (59TTCCTGACCAGCGAGCTGCCG) e MT2 (59CCCCAGTACTCCCAGCTGTGC), que amplifica um fragmento de 506 pb para todas as bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* spp. (PORTILLO et al., 1996).

Para confirmação da presença de *M. bovis* nas amostras teciduais foi selecionado o par de marcadores SCAR JB21 (5'TCGTCCGCTGATGCAAGTGC 3') e JB22 (5' CGTCCGCTGACCTCA AGAAG 3') para amplificação de um fragmento específico de 500 pb (RODRIGUEZ et al., 1999).

A PCR que possibilitou tais amplificações foi composta por tampão 1x (KCl 50 mM, TRIS-HCl 200 mM, pH 8,4), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 1 U de Taq DNA polimerase, 5 pmol de cada *primer*, 1,2 µL de DNA genômico total e 20 µL de água pura estéril q.s.p. A reação ocorreu em um termociclador Nexus (Eppendorf®) programado para realizar um ciclo a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos a 94°C por um minuto, um minuto a temperatura de anelamento do oligonucleotídeo e 72°C por um minuto e trinta segundos e para finalizar, um ciclo a 72°C por dez minutos. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder®. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de foto-documentação GEL DOC XR®.

Devido ao prévio conhecimento de se tratar de amostras clínicas paucibacilares, foi realizada a nested PCR, análise molecular que se caracteriza como uma modificação da PCR convencional com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção do material genético de determinado agente quando em pequena quantidade na extração (PORTILLO-GÓMEZ et al., 2000; REBOLLO et al., 2006), utilizou-se o mesmo protocolo citado acima, entretanto, foi adicionado o produto da PCR ao invés do DNA extraído.

4.5.3. PCR a partir de DNA extraído das colônias bacterianas

Para confirmação da identificação da presença de *M. bovis* nas colônias bacterianas, foi utilizado o mesmo par de marcadores SCAR utilizado na PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais, assim como as mesmas concentrações dos reagentes citados anteriormente. Esta identificação molecular da presença do *M. bovis* foi realizada nas amostras cujo diagnóstico pelo cultivo microbiológico foi considerado positivo de acordo com as características morfológicas das colônias de *M. bovis* (CORNER, 1994; MOTA et al., 2001). A reação ocorreu em um termociclador Veriti® programado para realizar um ciclo a 94° C por cinco minutos, 40 ciclos a 94°

C por um minuto, 68° C por um minuto e 72° C por um minuto e, para concluir, um ciclo de dez minutos a 72° C. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder®. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de foto-documentação GEL DOC XR®.

4.6. Análise dos dados

A base de dados e a construção de tabelas foram realizadas usando planilhas eletrônicas do programa Microsoft Excel versão 2007. A sensibilidade e a especificidade (Tabela 1), assim como os intervalos de confiança (IC), foram calculadas segundo Thrusfield (2004).

Tabela 1. Classificação para cálculo de sensibilidade e especificidade

Teste avaliado	Teste de Referência (Cultivo microbiológico)	
	Positivo	Negativo
Positivo	Verdadeiro positivo	Falso positivo
Negativo	Falso negativo	Verdadeiro negativo

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiro positivo}}{\text{Verdadeiro positivo} + \text{Falso negativo}} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiro negativo}}{\text{Verdadeiro negativo} + \text{Falso positivo}} \times 100$$

A independência entre os resultados foi calculada com auxílio do coeficiente *kappa*, usando a seguinte fórmula, que avalia a concordância entre dois testes (LANDIS e KOCK, 1977).

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Onde,

Po = proporção de concordâncias observadas

Pe = proporção de concordâncias esperadas

$$Po = \frac{VP + FN}{N}$$

$$Pe = \frac{\{(VP + FN) \times (VP + FP)\} + \{(FP + FN) \times \{(FN + VN)\}\}}{N^2}$$

Onde,

VP = Verdadeiro positivo

VN = Verdadeiro negativo

FP = Falso positivo

FN = Falso negativo

Os resultados foram interpretados segundo Pereira (2002), adaptado de LANDIS e KOCK (1977) conforme a Tabela 2. Os cálculos foram executados usando o pacote EpiR do software estatístico R.

Tabela 2. Interpretação da concordância pelo coeficiente *Kappa*, segundo PEREIRA (2002).

<i>Kappa</i>	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

4.7. Geoprocessamento dos municípios de origem dos animais com lesões teciduais sugestivas de tuberculose

O geoprocessamento dos municípios de origem dos animais positivos nos métodos diagnósticos para tuberculose utilizados foi efetuado com auxílio do software TerraView 4.2.2. Os dados foram colhidos durante abates em dois matadouros-frigoríficos sob SIF do Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 e julho de 2014. A estrutura de independência contida no conjunto de dados foi avaliada pelo índice de Moran, utilizando o teste de pseudo-significância ($\alpha < 0,05$). Mapas temáticos permitiram a visualização dessas distribuições espaciais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Diagnóstico anatomopatológico

Foram coletadas 50 lesões sugestivas de tuberculose provenientes de matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo, sendo 100% (50/50) das lesões classificadas como caseosas (Figura 1).



Figura 1. Amostra 1ITVLRBM referente à lesão tecidual sugestiva de tuberculose bovina coletada em matadouro-frigorífico sob SIF no Estado de São Paulo.

As lesões foram provenientes de vários linfonodos (Tabela 3), sendo o linfonodo retrofaríngeo o mais acometido, com 50% das lesões, seguido dos linfonodos mediastínico, pré-escapular, pré-peitoral, traqueobrônquico, atloideano, isquiático, inguinal e hepático.

Tabela 3. Linfonodos com lesões teciduais sugestivas de tuberculose provenientes de bovinos abatidos em dois matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 e julho de 2014.

Linfonodos	LR ^a	LM ^b	LP ^c	LPP ^d	LT ^e	LA ^f	LIS ^g	LIN ^h	LH ⁱ
Amostras	25/50 50%	11/50 22%	4/50 8%	3/50 6%	2/50 4%	1/50 2%	1/50 2%	1/50 2%	1/50 2%

^aLinfonodo Retrofaríngeo, ^bLinfonodo Mediastínico, ^cLinfonodo Pré-escapular, ^dLinfonodo Pré-peitoral, ^eLinfonodo Traqueobrônquico, ^fLinfonodo Atloideano, ^gLinfonodo Isquiático, ^hLinfonodo Inguinal, ⁱLinfonodo Hepático.

Jorge et al. (2010) encontraram a maioria das lesões sugestivas de tuberculose concentradas na região torácica, assim como no presente estudo. A maior parte dos linfonodos afetados foi encontrada na região da cabeça, podendo-se inferir que a infecção nesses animais provavelmente teve sua origem pela via aerógena. Entretanto, Rezende-Lago et al. (2011) encontraram maior número de lesões sugestivas de tuberculose na região intestinal e pulmonar.

Todas as lesões colhidas (100%) foram classificadas como caseosas, consideradas lesões ativas. Este dado corrobora o de Alzamora Filho et al. (2014), que estudou 180 carcaças com 100% das lesões encontradas classificadas como caseosas ativas. Entretanto, Silva et al. (2014) observaram 100 carcaças com lesões sugestivas de tuberculose, classificando 85% como caseosas e 15% como calcificadas.

Apesar de a tuberculose ser uma enfermidade de caráter crônico, tais dados inferem que a maioria dos animais são abatidos com lesões características de infecções recentes (caseosas), portanto, a tuberculose está presente nos bovinos abatidos nos matadouros-frigoríficos, o que representa um risco aos consumidores dos produtos de origem animal e aos que militam na pecuária bovina, pois estes podem facilmente se infectar com o bacilo, principalmente devido ao contato com lesões ou pela ingestão de produto obtido de animal infectado.

5.2. Diagnóstico pelo cultivo microbiológico

Colônias de *M. bovis* são de coloração amarelo-pálida, pequenas, arredondadas, com bordas irregulares e superfície granular (CORNER, 1994; MOTA et al., 2001), sendo este o padrão considerado positivo para o crescimento de *M. bovis*.

Não houve crescimento bacteriano característico de *Mycobacterium* spp no meio Lowenstein-Jensen em nenhuma das amostras, entretanto, houve crescimento característico de *M. bovis* (Figura 2) em 56% (28/50) das amostras cultivadas em meio Stonebrink-Leslie, caracterizando-as como *M. bovis*.



Figura 2. Amostra 1ITVLRBM, proveniente de lesão tecidual sugestiva de tuberculose bovina, com crescimento de colônias bacterianas características de *M. bovis* em meio sólido Stonebrink-Leslie, sendo o diagnóstico padrão ouro para tuberculose.

Apesar de todas as lesões utilizadas serem sugestivas de tuberculose, o diagnóstico microbiológico possui algumas limitações que podem estar associadas ao baixo número de *M. bovis* nas lesões no momento da colheita das amostras ou ainda a dificuldades inerentes ao isolamento do agente eventualmente presente nas amostras devido ao alto grau de contaminação destas durante a colheita do material (FRÁGUAS et al., 2008).

A ausência de micobactérias pode estar associada a três fatores: deficiência do método de isolamento com morte na descontaminação ou dificuldade de se multiplicar no cultivo; morte da micobactéria após promover a lesão, pela defesa do próprio organismo; lesão causada por outro microrganismo. No entanto, cabe ressaltar que, uma vez isolado e identificado como *M. bovis*, este método é indubitável, uma vez que constitui o padrão ouro para o diagnóstico da tuberculose bovina e apresenta 100% de especificidade (FRÁGUAS et al., 2008).

5.3. Diagnóstico histopatológico

A coloração com hematoxilina-eosina (Figura 3-A) permitiu a classificação de 64,0% (32/50) das amostras como positivas ao caracterizar lesões celulares microscópicas como sugestivas de tuberculose. Ao utilizar a coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 3-B) não foi possível confirmar o diagnóstico pela identificação de

BAAR em 12,0% (6/50) das amostras consideradas positivas pela caracterização histopatológica utilizando-se a coloração com HE (Tabela 4).

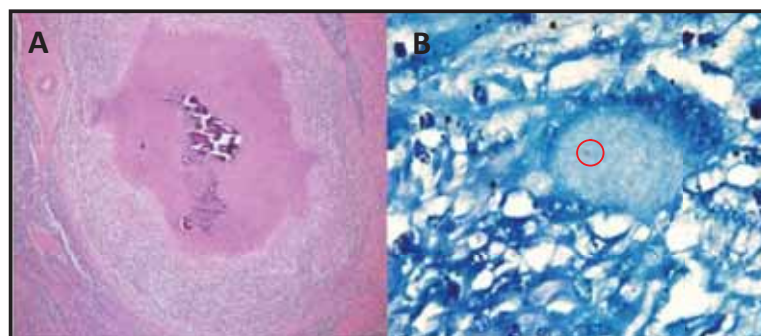


Figura 3. (A) Granuloma característico da tuberculose, proveniente de lesão tecidual sugestiva de tuberculose bovina, presença de área central com calcificação distrófica, necrose subsequente, circundada por infiltrado inflamatório composto principalmente por macrófagos. Coloração HE, aumento de 4x. (B) Corte exibindo BAAR (circulado) no citoplasma de uma célula gigante do tipo Langerhans. Coloração de ZN, aumento de 100x.

As lesões granulomatosas consideradas características de tuberculose apresentavam áreas de necrose caseosa com calcificação distrófica central, circundada por células gigantes tipo Langerhans, infiltrado inflamatório mononuclear (macrófagos em sua maioria, além de linfócitos) e células epitelióides, camadas estas envoltas por uma cápsula de tecido conjuntivo cicatricial (JONES et al., 2000; FRANÇA et al., 2013). As lâminas analisadas e consideradas positivas para tuberculose coincidem com as características citadas e também com aquelas descritas em bovinos naturalmente infectados e reagentes ao teste cutâneo (MEDEIROS et al., 2012) e em bovinos experimentalmente infectados por *M. bovis* (PALMER et al., 2007).

Tabela 4. Diagnóstico histopatológico de linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose provenientes de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014.

Coloração			
Hematoxilina-eosina		Ziehl-Neelsen	
Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
64,0% (32/50)	36,0% (18/50)	52,0% (26/50)	48% (24/50)

Embora a identificação de BAAR (baciloscopia) seja considerada um exame básico em tuberculose humana, sobretudo do escarro, ela não é tão sensível no diagnóstico da tuberculose animal, pois os bacilos nem sempre são visualizados na amostra, mesmo na presença de lesões. Sa'ídu et al. (2015) buscaram a identificação do BAAR em 120 amostras teciduais sugestivas de tuberculose bovina e o identificaram em 29,16% delas.

Varello et al. (2008) avaliaram 173 amostras teciduais sugestivas de tuberculose e classificaram 117 (67,63%) delas como características de tuberculose à coloração com hematoxilina-eosina e apenas em 31 delas (17,91%) o BAAR foi identificado quando coradas pela técnica de ZN. Estes dados evidenciam a necessidade de associação dos métodos histopatológicos, pois assim como na baciloscopia de escarro humana, a identificação do BAAR pode ser limitada, principalmente pela quantidade do bacilo presente na lesão.

Pesquisadores relatam diferentes porcentagens de amostras positivas pela identificação do BAAR à coloração de ZN, variando de 17,9% (VARELLO et al., 2008), 36,8% (LAISSE et al., 2011) a 50,0% (PINTO et al., 2002). Entretanto, Varello et al. (2008) infere que a identificação histológica de BAAR possui alta especificidade apesar de sua baixa sensibilidade e que quando associada à caracterização histopatológica das lesões, que possui alta sensibilidade e especificidade, gera resultados que permitem a identificação de lesões típicas de tuberculose e sua diferenciação de outras causas.

Os resultados deste estudo tanto na caracterização histopatológica quanto na identificação de BAAR foram próximos na quantidade de amostras consideradas positivas, portanto, nota-se a importância da associação da caracterização histopatológica à baciloscopia.

5.4. Diagnóstico molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais

5.4.1. Extração de DNA a partir das lesões teciduais

A quantificação do DNA genômico total de células de lesões sugestivas de tuberculose, em espectrofotômetro, indicou que o protocolo de extração de DNA utilizado possibilitou o rendimento de 1.500 ng/μL a 3.000 ng/μL de DNA por amostra, as quais apresentaram de 1,8 a 1,9 de qualidade, sendo este valor

referente à relação da absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, indicando uma qualidade desejável. No entanto, ressalta-se que esta quantificação é referente, principalmente, ao DNA das células animais, sendo assim desconhecida a quantidade de DNA de células bacterianas. O DNA obtido foi observado em gel de agarose (Figura 4) para analisar sua integridade.

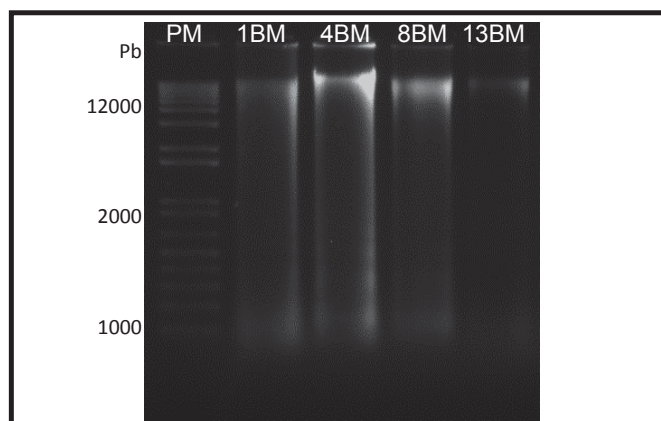


Figura 4. DNA genômico proveniente de lesão tecidual sugestiva de tuberculose bovina coletada durante abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014. PM: padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). 1BM: amostra 1ITVLRBM. 4BM: amostra 4RILRBM. 8BM: amostra 8DELMRBM. 13BM: amostra 13SJBLRBM.

As diferenças na integridade do DNA observadas entre as amostras resultam da atividade enzimática diferencial entre os tecidos lesionados, atividade esta que está diretamente relacionada à evolução da infecção. No entanto, observou-se integridade desejável do DNA obtido, indicando que os procedimentos adotados para evitar a rápida degradação dos tecidos e a composição do tampão de extração foram ideais.

5.4.2. Produto da PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais

As condições de amplificação do produto da PCR de 500 pb, indicador da presença de *Mycobacterium bovis* nas amostras, foram testadas (Figura 4) utilizando-se o DNA de uma cepa padrão de *M. bovis* (cepa IB2 – *M. bovis* AN5), gentilmente cedida pelo Laboratório de Tuberculose do Instituto Biológico de São

Paulo - SP, por meio da pesquisadora Dra. Cristina Corsi Dib, e da amostra 13SJBLRBM, cujos diagnósticos pela identificação anatomopatológica, caracterização histopatológica, identificação do BAAR e pelo cultivo microbiológico (padrão ouro) indicavam a presença de tal espécie bacteriana.

A amostra de lesão utilizada para o teste apresentou amplificação de uma banda de mesmo tamanho molecular daquela apresentada pela cepa padrão de *M. bovis* (Figura 5), indicando assim, que havia células bacterianas de *M. bovis* nessa lesão tecidual. Embora o primeiro teste realizado tenha indicado a sensibilidade da técnica aplicada na identificação de *M. bovis*, salienta-se que tal identificação é inerente à quantidade de células bacterianas presentes na lesão, fato este relacionado à evolução da infecção.

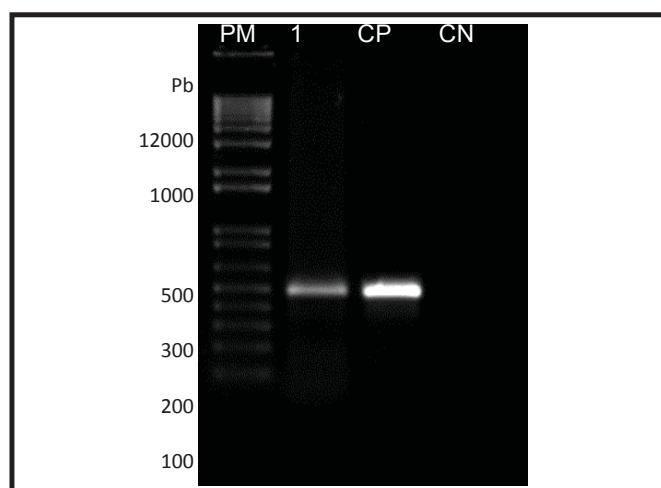


Figura 5. Produto de PCR de 500pb indicador da presença de *Mycobacterium bovis* em amostra de material genético extraído a partir de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina provenientes de abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 e julho de 2014. Linha 1: amostra 13SJBLRBM. CP: cepa padrão de *Mycobacterium bovis*. CN: controle negativo da reação (*mix* sem DNA). PM: padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5.4.2.1. Produto da PCR espécie específica e da nested PCR

A análise molecular das lesões sugestivas de tuberculose pela PCR resultou em 20% (10/50) das amostras positivas para *M. bovis*. Entretanto, ao se utilizar a nested PCR, técnica aplicada às amostras negativas na PCR, 09 amostras (18%)

apresentaram bandas amplificadas, sendo consideradas positivas (Figura 6). Sendo assim, o número de amostras positivas quase dobrou (38% - 19/50), evidenciando a pequena quantidade de DNA bacteriano presente nas lesões sugestivas de tuberculose.

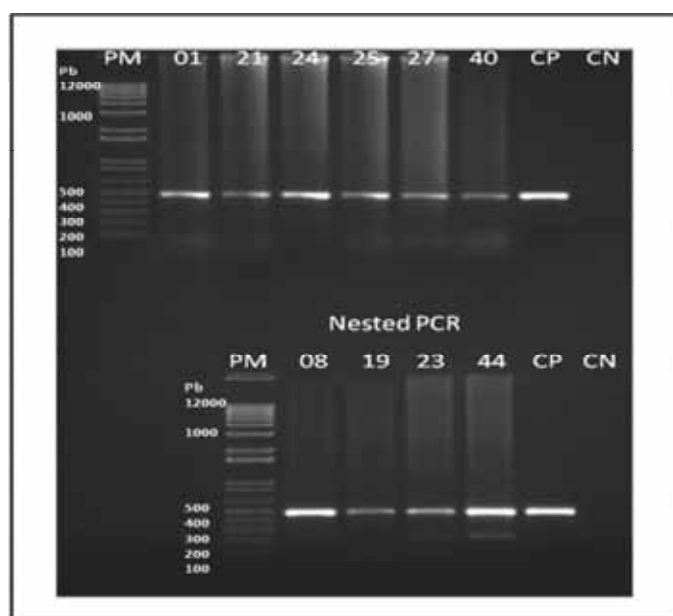


Figura 6. Produtos da PCR de 500 pb indicadores da presença de *M. bovis* em amostra de material genético extraído a partir de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina provenientes de abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de Julho de 2013 e Julho de 2014. PM: Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CP: Controle positivo – Cepa Padrão de *M. bovis*; CN: Controle negativo – Ausência de DNA bacteriano.

Furnaletto et al. (2012) encontraram 7% (14/198) de amostras positivas para *M. bovis* utilizando-se a multiplex PCR ao avaliarem 198 lesões sugestivas de tuberculose. Valor próximo a este também foi encontrado por Figueiredo et al. (2010) ao avaliarem a presença de *M. bovis* a partir de suabes nasais de 34 bovinos, relatando a presença do agente em 5,9% (2/34). Entretanto, Cardoso et al. (2009), relataram que 54,5% (18/33) das amostras teciduais analisadas foram positivas para *M. bovis*. Estes autores inferem que a quantidade de DNA utilizada interfere na

sensibilidade do teste, pois conseguiram aumentar 15% a quantidade de amostras positivas ao dobrar e triplicar a quantidade de DNA utilizado na PCR.

Salazar (2005) não identificou o *M. bovis* pela PCR a partir de DNA extraído de lesões sugestivas de tuberculose, entretanto, Jordão Junior et al. (2005) identificaram *M. bovis* pela PCR em concentrações de até 80 UFC/ mL de leite artificialmente contaminado.

Araújo et al. (2014) ao avaliarem tecidos com lesões de 131 bovinos e bubalinos, obtiveram 53,43% de amostras positivas à nested PCR, valor superior ao encontrado no presente estudo. Entretanto, Costa et al. (2013) obtiveram dados mais próximos aos encontrados no presente estudo. Os autores relatam 40,90% de amostras positivas à nested PCR ao avaliarem tecidos com lesões de 66 bovinos.

A nested PCR auxilia no diagnóstico de diversas enfermidades, gera dados mais fidedignos, contribui para o destino adequado do animal infectado e evita perdas desnecessárias. Além de promissora no diagnóstico animal, esta técnica molecular também melhora a sensibilidade do diagnóstico da tuberculose em humanos.

Embora os resultados sejam promissores, o diagnóstico não deve ser baseado apenas pelos resultados moleculares. Ayele et al. (2004) cita algumas limitações como por exemplo, amostras paucibacilares, presença de inibidores, íons metálicos e contaminantes nas amostras e os autores enfatizam que estas limitações são o ponto crítico da padronização das técnicas moleculares e podem gerar diagnósticos falso-negativos. Sendo assim, é necessária a padronização desta técnica em amostras provenientes de lesões teciduais sugestivas de tuberculose, o que auxiliaria o diagnóstico rápido e fidedigno da tuberculose, contribuindo com a saúde animal e da população.

Os resultados das análises moleculares referentes à identificação molecular a partir de DNA extraído das lesões sugestivas de tuberculose coletados durante o abate dos animais podem ser observados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5. Diagnóstico molecular a partir de DNA extraído de linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose provenientes de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 e julho de 2014.

Lesões	Positivos	Negativos
PCR	20% (10/50)	80% (40/50)
Nested PCR ^a	18% (09/50)	82% (41/50)
PCR + nested PCR	38% (19/50)	62% (31/50)

^aA nested PCR foi realizada somente nas amostras negativas na PCR.

5.4.2.2. Produto da multiplex PCR

Foi realizada também a multiplex PCR do material genético proveniente das lesões sugestivas de tuberculose (Figura 7-B). Nesta análise eram esperados produtos da PCR de 396pb (*M.tuberculosis*), 506pb (*Mycobacterium* spp.) e 984pb (complexo *M. tuberculosis*) com banda adicional de 870pb (*M. bovis*), este perfil foi observado nas amostras de cepas padrões tanto de *M. tuberculosis* quanto de *M. bovis*, entretanto, no material genético referente às lesões teciduais, sabidamente positivas para *M. bovis* pela PCR e nested PCR anteriormente realizadas (amostras 01, 23 e 27 da Figura 6), foi observado apenas o produto da PCR referente à identificação do gênero *Mycobacterium* spp. Em todas as amostras, inclusive nas cepas padrões, foi observado um produto da PCR de aproximadamente 100 a 200 pb não esperado para esta reação multiplex.

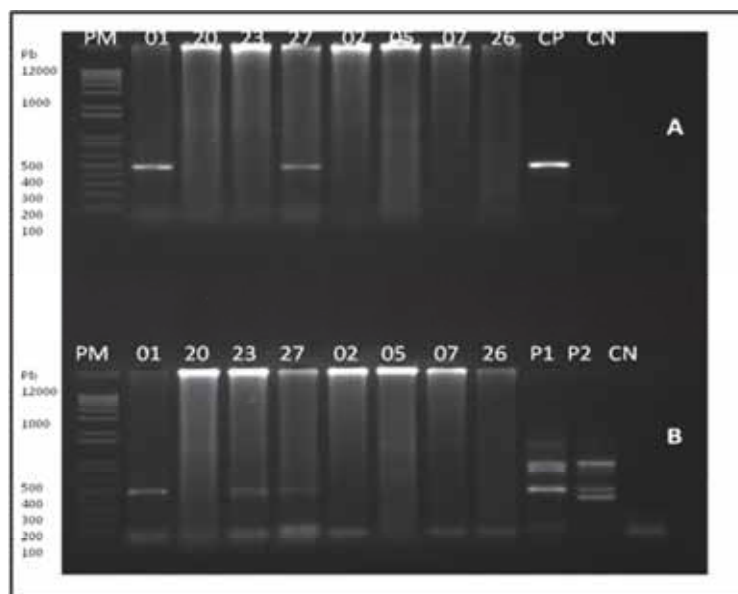


Figura 7. A - Produto da PCR de 500 pb indicador da presença de *M. bovis* em amostra de material genético extraído a partir de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina provenientes de abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 e julho de 2014. PM: Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CP: Controle positivo – Cepa padrão de *M. bovis*; CN: Controle negativo – Ausência de DNA bacteriano. **B** - Produtos da PCR de 396pb (*M. tuberculosis*), 506pb (*Mycobacterium* spp.), 984pb (complexo *M. tuberculosis*) e banda adicional de 870pb (*M. bovis*) (PORTILLO et al., 1996). PM: Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CP e P1: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. bovis*; P2: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. tuberculosis*. CN: Controle negativo – Ausência de DNA bacteriano.

5.5. Identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas

5.5.1. Extração de DNA a partir das colônias bacterianas

A quantificação do DNA genômico de células das colônias de *M. bovis*, em espectrofotômetro, indicou que o protocolo de extração de DNA utilizado possibilitou o rendimento de menos de 100 ng/μL de DNA por amostra, as quais apresentaram de 1,8 a 1,9 de qualidade, sendo este valor referente à relação da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, indicando uma qualidade desejável. O DNA obtido também foi observado em gel de agarose para analisar sua integridade e observou-se integridade desejável do DNA obtido.

5.5.2. Produto da PCR a partir de DNA extraído das colônias bacterianas

5.5.2.1. Produto da PCR espécie específica

As 28 amostras que apresentaram crescimento de colônias características de *M. bovis* no meio sólido de Stonebrink-Leslie foram submetidas à análise molecular com marcadores SCAR específicos para identificação do *M. bovis* (Rodriguez et al., 1999), sendo 100% (28/28) das amostras consideradas positivas (Figura 8).

Considerando o número total de lesões estudadas, tem-se 56% (28/50) de amostras positivas à identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas, número superior ao da análise molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais.



Figura 8. Produto da PCR de 500 pb indicador da presença de *M. bovis* em amostra de material genético extraído a partir de colônias bacterianas provenientes de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina colhidas durante abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 e julho de 2014. PM: Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). P1: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. tuberculosis*; P2: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. bovis*.

5.5.2.2. Produto da multiplex PCR

No material genético extraído das colônias provenientes das lesões teciduais, a multiplex PCR também foi realizada (Figura 9), e todos os produtos da PCR esperados foram observados em todas as amostras. Os produtos referentes à identificação das espécies *M. tuberculosis* e *M. bovis* foram observados em todas as amostras, inclusive nas cepas padrões. Assim como na multiplex PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais, também foi observado um produto da PCR de aproximadamente 100 a 200 pb não esperado para esta reação. Provavelmente este fato seja devido ao pareamento entre os marcadores SCAR utilizados na reação, com consequente formação de dímeros de *primer*.

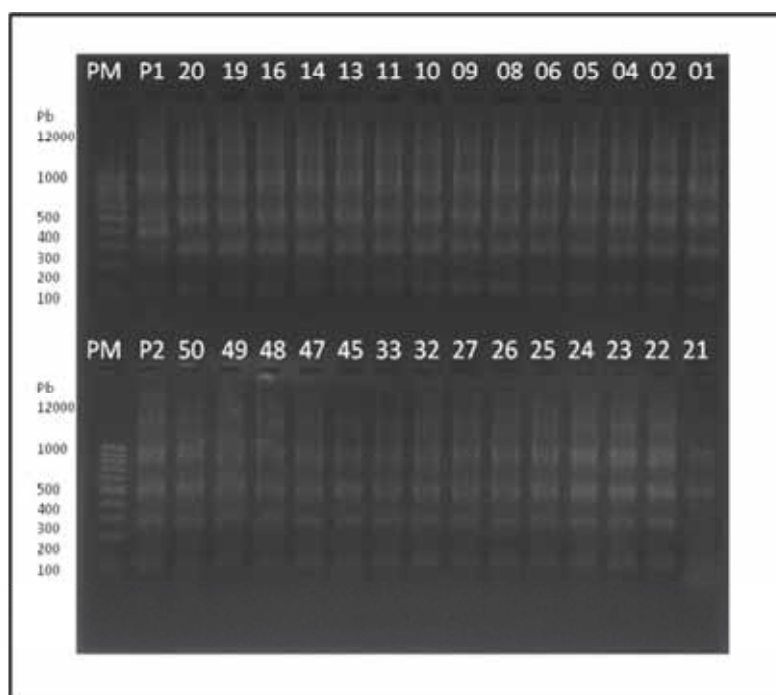


Figura 9. Produtos da PCR de 396pb (*M.tuberculosis*), 506pb (*Mycobacterium* spp.), 984pb (complexo *M. tuberculosis*) e banda adicional de 870pb (*M. bovis*) (PORTILLO et al., 1996) em amostra de material genético extraído a partir de colônias bacterianas provenientes de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina colhidas durante abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 e julho de 2014. PM: Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). P1: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. tuberculosis*; P2: Controle positivo - Cepa Padrão de *M. bovis*.

5.5.2.3. Controle de contaminação das reações

Para controle de contaminação das reações, tanto na PCR a partir de DNA extraído das colônias quanto na multiplex PCR a partir de DNA extraído das colônias, foram utilizados controles negativos, sendo estes a mix PCR sem DNA bacteriano e água pura. Esses controles podem ser visualizados na Figura 10. Entretanto, não houve aparecimento de bandas específicas, sendo a reação ausente de contaminação. As bandas que aparecem nos controles negativos referentes à multiplex PCR (CN1, CN2 e CN3), aproximadamente com 100 a 200 pb, também aparecem na reação com as amostras de campo, caracterizando a presença de dímeros de *primers*.

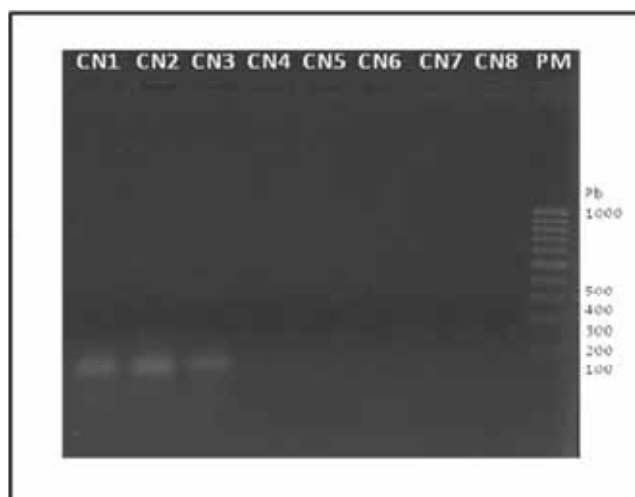


Figura 10. Controles negativos das reações de PCR (CN4 a CN7: água; CN8: mix sem DNA) e multiplex PCR (CN1 a CN3: água) em amostra de material genético extraído a partir de colônias bacterianas provenientes de lesões teciduais sugestivas de tuberculose bovina colhidas durante abate sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 e julho de 2014. PM: Padrão de tamanho molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5.6. Comparação entre os métodos diagnósticos utilizados

Os resultados obtidos em todos os testes diagnósticos para tuberculose bovina estudados (Apêndice A) foram organizados de forma resumida na Tabela 6 para melhor visualização e discussão. A Figura 11 resume a quantidade de amostras consideradas positivas em cada método diagnóstico para tuberculose bovina realizado. Foi realizado o teste de concordância entre os métodos diagnósticos (Tabela 7) expresso pelo coeficiente *Kappa*, utilizando o pacote EpiR do software estatístico R. O coeficiente *Kappa* foi interpretado (Tabela 2) segundo o grau de concordância entre os testes de acordo com Pereira (2002). Os valores de sensibilidade e especificidade foram calculados e posteriormente interpretados com auxílio do índice de Youden (THRUSFIELD, 2004). Tais valores são visualizados na Tabela 8.

Tabela 6. Resumo dos resultados obtidos nos métodos diagnósticos realizados a partir de amostras de lesões teciduais sugestivas de tuberculose provenientes do abate de bovinos sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 e julho de 2014.

Amostras	Quantidade (unidades)	Quantidade (%)
Positivas em todos os métodos diagnósticos	6/50	12
Negativas em todos os métodos diagnósticos	10/50	20
Positivas no cultivo microbiológico e histopatológicos	19/50	38
Positivas no cultivo microbiológico e molecular (Lesões)	15/50	30

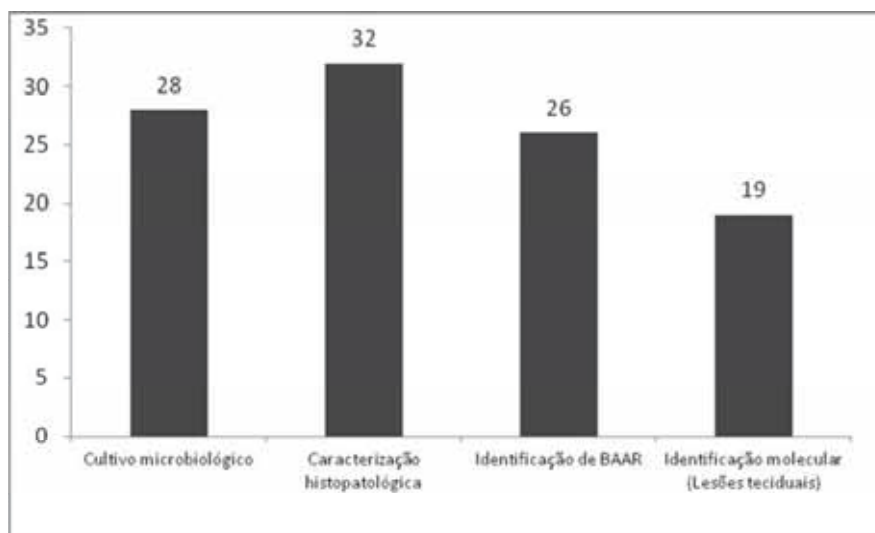


Figura 11. Número de amostras positivas, provenientes de lesões teciduais sugestivas de tuberculose colhidas durante o abate de bovinos em dois matadouros-frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo, em cada método realizado para diagnóstico da tuberculose bovina.

Nota-se que apenas 12% das amostras foram positivas em todos os métodos diagnósticos estudados, sendo 20% negativas em todos eles, entretanto, ao comparar o diagnóstico pelo cultivo microbiológico (padrão ouro) com os demais, há aumento da porcentagem de amostras positivas. Ao associá-lo ao diagnóstico molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose, a quantidade de amostras positivas aumenta mais que o dobro (30%), sendo este aumento maior que três vezes ao associá-lo à caracterização histopatológica (HE) e à identificação de BAAR (ZN).

A maior diferença é observada ao associar o diagnóstico pelo cultivo microbiológico à identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas, obtendo 56% de amostras positivas, pois se trata da identificação do agente que, sabidamente, está presente quando há formação de colônias características de *Mycobacterium bovis* durante o cultivo microbiológico.

O diagnóstico molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais foi o que obteve menor número de amostras positivas (19/50) quando comparado ao cultivo microbiológico (28/50) e aos histopatológicos, HE (32/50) e ZN (26/50), o que denota a importância da associação dos métodos diagnósticos e a confirmação pela identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias.

A utilização da caracterização histopatológica tecidual pela coloração com HE, assim como a identificação do BAAR pela coloração de ZN, é de grande importância no diagnóstico da tuberculose, já que o cultivo microbiológico é geralmente dispendioso e lento e os métodos moleculares possuem algumas dificuldades quanto à padronização de sua utilização e custo elevado.

Tabela 7. Análise da concordância entre os métodos diagnósticos realizados expressa pelo coeficiente *Kappa*.

Testes Diagnósticos	Valor Kappa (IC 95%)	Concordância
Padrão ouro x hematoxilina-eosina	0,420 (0,147 a 0,694)	Regular
Padrão ouro x Ziehl-Neelsen	0,357 (0,081 a 0,633)	Sofrível
Padrão ouro x PCR (lesões)	0,104 (-0,101 a 0,310)	Fraca
Padrão ouro x nested PCR	0,221 (-0,030 a 0,473)	Sofrível
Padrão ouro x PCR (colônias)	1,000 (0,723 a 1,278)	Perfeita
Padrão ouro x multiplex PCR	1,000 (0,723 a 1,278)	Perfeita
Hematoxilina-eosina x Ziehl-Neelsen	0,757 (0,488 a 1,026)	Boa
Hematoxilina-eosina x PCR (lesões)	0,110 (-0,073 a 0,292)	Fraca
Hematoxilina-eosina x nested PCR	0,023 (0,006 a 0,463)	Fraca
Hematoxilina-eosina x PCR (colônias)	0,421 (0,147 a 0,694)	Regular
Hematoxilina-eosina x multiplex PCR	0,421 (0,147 a 0,694)	Regular
Ziehl-Neelsen x PCR (lesões)	0,141 (-0,076 a 0,357)	Fraca
Ziehl-Neelsen x nested PCR	0,280 (0,014 a 0,546)	Sofrível
Ziehl-Neelsen x PCR (colônias)	0,357 (0,081 a 0,633)	Sofrível
Ziehl-Neelsen x multiplex PCR	0,357 (0,081 a 0,633)	Sofrível
PCR (lesões) x nested PCR	0,000 (-2,052 a 2,052)	Fraca
PCR (lesões) x PCR (colônias)	0,104 (-0,101 a 0,310)	Fraca
PCR (lesões) x multiplex PCR	0,104 (-0,101 a 0,310)	Fraca
Nested PCR x PCR (colônias)	0,221 (-0,030 a 0,473)	Sofrível
Nested PCR x multiplex PCR	0,221 (-0,030 a 0,473)	Sofrível
PCR (colônias) x multiplex PCR	1,000 (0,723 a 1,277)	Perfeita

Hematoxilina-eosina = Caracterização histopatológica pela coloração com hematoxilina-eosina, Ziehl-Neelsen = Identificação de BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen, PCR (Lesões) = Identificação molecular pela PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose, nested PCR = Identificação molecular pela nested PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose (amostras negativas à PCR), PCR (Colônias) = Identificação molecular pela PCR a partir de DNA extraído das colônias de *M. bovis*, Multiplex PCR = Identificação molecular pela multiplex PCR a partir de DNA extraído das colônias de *M. bovis*. IC = Intervalo de Confiança de 95%.

Todos os métodos diagnósticos realizados foram comparados entre si, sendo o cultivo microbiológico estabelecido como padrão ouro. Notou-se que o padrão ouro de diagnóstico da tuberculose bovina somente concordou perfeitamente com a identificação molecular a partir do DNA extraído das colônias bacterianas (PCR e multiplex PCR). Ao se analisar a concordância entre o diagnóstico pelo cultivo microbiológico e o diagnóstico pela identificação molecular com DNA proveniente das lesões teciduais sugestivas de tuberculose, constatou-se concordância “fraca” ao utilizar a PCR e “sofrível” a nested PCR.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lima et al. (2008) ao compararem o diagnóstico pelo cultivo microbiológico com a identificação de BAAR e o molecular, obtendo maior concordância no diagnóstico pela identificação molecular do *M. tuberculosis*, seguido da identificação de BAAR, em amostras de escarro humano suspeito de tuberculose.

Fráguas et al. (2008), ao compararem testes diagnósticos pelo cultivo microbiológico e histopatológicos (HE e ZN) em bovinos reagentes ao teste tuberculínico, observaram melhor concordância entre a caracterização histopatológica pela coloração com HE e sua confirmação pela identificação de BAAR utilizando-se a coloração de ZN. Entretanto, ao compararem o cultivo microbiológico aos histopatológicos (HE e ZN) observaram baixa concordância, provavelmente devido ao método de descontaminação de Petroff empregado nas amostras de lesões teciduais sugestivas de tuberculose provenientes do abate dos animais estudados e a possível existência de amostras paucibacilares associada.

Tais dados corroboram aos apresentados neste estudo, já que segundo Pereira (2002) o grau de concordância estabelecida ao comparar as colorações histopatológicas HE e ZN foi “boa”, mas foi de “fraca” a “regular” ao compará-las ao diagnóstico pelo cultivo microbiológico, entretanto, no presente estudo foi realizado o diagnóstico pela identificação molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose e a confirmação da identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas, obtendo-se concordância “sofrível” e “perfeita”, respectivamente.

Nota-se que o diagnóstico pela identificação de BAAR utilizando-se a coloração de ZN possui concordância semelhante ao diagnóstico pela identificação molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose ao compará-los ao diagnóstico pelo cultivo microbiológico. Sendo assim, a identificação bacilar pela coloração de ZN se torna uma alternativa mais barata à identificação molecular.

Furlanetto et al. (2012), ao estudarem métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina, obtiveram resultados que enfatizaram o uso de métodos pela identificação molecular a partir de DNA extraído de lesões ou de colônias obtidas pelo cultivo em meio Stonebrink-Leslie para o diagnóstico da tuberculose bovina, já que obtiveram 1,5% de animais positivos ao cultivo microbiológico e 7% aos métodos diagnósticos pela identificação molecular. Os autores também destacam que o linfonodo retrofaríngeo foi o que obteve maior número de amostras positivas tanto pelo cultivo microbiológico quanto pela identificação molecular, assim como no presente trabalho, em que 50% das lesões estavam presentes nesse linfonodo (Tabela 3).

Figueiredo et al. (2010) também relatam maior porcentagem de amostras positivas ao utilizarem os métodos diagnósticos pela identificação molecular do *M. bovis* em detrimento ao cultivo microbiológico. Entretanto, esses autores discutem a possibilidade da melhoria do diagnóstico no animal vivo, e para tal analisaram suabes nasais de animais submetidos à tuberculinização pelo teste cervical comparativo. A identificação do *M. bovis* a partir de secreções nasais dos animais positivos à tuberculina não obteve sucesso no cultivo microbiológico (sem crescimento bacteriano) nem na identificação molecular (5,9% de animais positivos), mas ao analisarem amostras provenientes dos pulmões e linfonodos, houve crescimento bacteriano em 50% das amostras de animais positivos à tuberculina.

Infelizmente, o diagnóstico direto da tuberculose em animais vivos associado à tuberculinização ainda não atinge resultados satisfatórios (AAGAARD et al., 2006; ZUMÁRRAGA et al., 2005), provavelmente devido ao fato de as amostras colhidas serem paucibacilares ou aos diferentes protocolos, principalmente nos métodos moleculares, mas merece destaque e mais estudos, já que possivelmente evitaria a perda de animais não infectados mesmo quando reagentes à tuberculina. Contudo, nota-se a importância do diagnóstico laboratorial complementar no *post mortem* para obtenção de resultados fidedignos.

No presente estudo, foi observada concordância “perfeita” entre o método diagnóstico pelo cultivo microbiológico e a identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias, já que este confirmou, pela identificação genética, o resultado daquele. Entretanto, a concordância entre o diagnóstico pelo cultivo microbiológico e pela identificação molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose foi “de fraca a sofrível” e quando comparado à caracterização histopatológica e à identificação de BAAR obteve-se concordância “de sofrível a regular”. Pôde-se inferir, então, a importância da manutenção do diagnóstico pelo cultivo microbiológico como padrão ouro do diagnóstico da tuberculose bovina e a associação deste à identificação molecular para especificação de variações do agente etiológico envolvido, apesar de seu alto custo e problemas de padronização ainda existentes.

Tabela 8. Sensibilidade, especificidade e índice de Youden dos testes diagnósticos realizados perante o padrão ouro (diagnóstico pelo cultivo microbiológico).

Métodos de diagnóstico	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade + especificidade	Índice de Youden (%)
Multiplex PCR (Colônias)	100,00	100,00	200,00	100,00
PCR (Colônias)	100,00	100,00	200,00	100,00
Hematoxilina-eosina	82,14	59,09	141,23	41,23
Ziehl-Neelsen	67,86	68,18	136,04	36,04
Nested PCR (Lesões)	33,33	89,47	122,80	22,80
PCR (Lesões)	25,00	86,36	111,36	11,36

Multiplex PCR (Colônias) = Identificação molecular pela multiplex PCR a partir de DNA extraído das colônias de *M. bovis*. PCR (Colônias) = Identificação molecular pela PCR a partir de DNA extraído das colônias de *M. bovis*. Hematoxilina-eosina = Caracterização histopatológica pela coloração com hematoxilina-eosina. Ziehl-Neelsen = Identificação de BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen. Nested PCR (Lesões) = Identificação molecular pela nested PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose (amostras negativas à PCR). PCR (Lesões) = Identificação molecular pela PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose. Índice de Youden = (Sensibilidade + especificidade) – 100.

Os valores da sensibilidade e especificidade dos testes corroboram os inferidos pelo teste de concordância realizado, pois melhores valores foram alcançados com a realização da identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas, seguido da caracterização histopatológica, da identificação de BAAR e dos moleculares a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose.

Apesar dos altos valores de especificidade encontrados nos métodos diagnósticos pela identificação molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais, os seus valores de sensibilidade foram menores quando comparados aos métodos diagnósticos histopatológicos (HE e ZN). Sendo assim, ao somar sensibilidade e especificidade e calcular o índice de Youden, cujo objetivo é a obtenção da menor proporção total possível de erros de classificação (o menor número de diagnósticos incorretos, falsos negativos mais falsos positivos), constatou-se melhor índice na identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas, seguida do diagnóstico pela caracterização histopatológica (HE), pela identificação de BAAR (ZN) e por último, pelos moleculares a partir de DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose (nested PCR e PCR).

Segundo Thrusfield (2004), a sensibilidade do método de diagnóstico é a proporção de positivos verdadeiros detectados por este e a especificidade do método é a proporção de negativos verdadeiros detectados por este. Os resultados

apresentam conformidade com essas definições, já que a identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas obteve 100% de especificidade e sensibilidade, já que identificaram o agente pelo seu material genético.

A caracterização histopatológica pela coloração com HE obteve baixa especificidade (59,09%) e alta sensibilidade (82,14%) quando comparada à identificação de BAAR pela coloração de ZN, que obteve especificidade de 67,86% e sensibilidade de 68,18%. Tais dados se justificam já que pela coloração HE é realizada uma análise microscópica do padrão tecidual granulomatoso característico de tuberculose, portanto, devido à subjetividade do julgamento de cada lesão, aumenta a possibilidade de falsos positivos, ocorrendo baixa especificidade ao comparar este teste ao microbiológico. Entretanto, esperava-se maior sensibilidade à coloração de ZN, já que esta identifica a presença do BAAR, mas este fato pode ser explicado devido à confecção das lâminas, pois o corte da lesão fica restrito a determinada região, dificultando a identificação do bacilo, principalmente em lesões paucibacilares. No cultivo microbiológico, cuja semeadura é proveniente de material extraído de toda a área lesionada, há crescimento de colônias bacterianas com maior número de bacilos, facilitando seu desenvolvimento no meio de cultura.

Lima et al. (2008) relatam sensibilidade da identificação molecular pela PCR a partir de DNA extraído de secreção respiratória de humanos de 77,5% e especificidade de 100% perante o cultivo microbiológico (padrão ouro). Infere-se então, que o tipo de amostra utilizada é de grande relevância no diagnóstico da tuberculose, pois o diagnóstico direto é influenciado pela quantidade de bacilos presentes na amostra.

Os menores valores de sensibilidade dos métodos diagnósticos pela identificação molecular a partir de DNA extraído das lesões teciduais (25,00% a 33,33%), encontrados no presente estudo, são explicados devido à utilização de amostras provenientes de lesões paucibacilares quando comparadas às amostras provenientes das colônias de *M. bovis* desenvolvidas no cultivo microbiológico. Portanto, ao utilizar a identificação do *M. bovis* a partir das lesões pelo diagnóstico molecular deve-se atentar para a ocorrência de alta porcentagem de falsos negativos, prejudicando a qualidade do diagnóstico.

5.7. Geoprocessamento dos municípios de origem dos animais com lesões teciduais sugestivas de tuberculose.

Observa-se que apenas a Figura 12, que mostra os municípios de origem dos animais considerados positivos ao diagnóstico pela identificação molecular do *M. bovis* pela PCR a partir de DNA extraído das lesões sugestivas de tuberculose, possui valor de $P = 0,43$ ($P > 0,05$). Pode-se inferir que não houve dependência espacial entre a ocorrência do *M. bovis* e a localização dos municípios, portanto, a distribuição dos municípios foi determinada ao acaso, sem casualidade aparente.

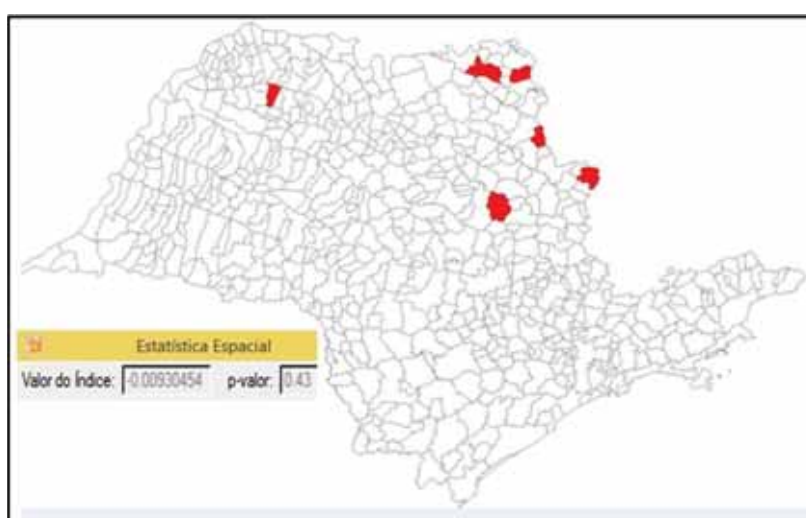


Figura 12. Mapa temático e estatística espacial referente ao diagnóstico pela identificação molecular do *M. bovis* a partir de DNA extraído de lesões sugestivas de tuberculose coletadas no momento da inspeção, em matadouros-frigoríficos de bovinos da região nordeste do Estado de São Paulo durante o período de julho de 2013 a julho de 2014. Regiões pintadas em vermelho referem-se aos municípios cujas amostras foram consideradas positivas pela identificação molecular do *M. bovis* pela PCR.

Entretanto, ao realizar a nested PCR nas amostras (Figura 13), obteve-se o valor de $P = 0,04$ ($P < 0,05$), o que evidencia a necessidade da nested PCR ao se trabalhar com DNA extraído das lesões teciduais sugestivas de tuberculose, já que esta técnica de identificação molecular possibilita a ocorrência de menor número de

resultados falsos negativos e permite a observação de possível casualidade na distribuição espacial dos municípios.

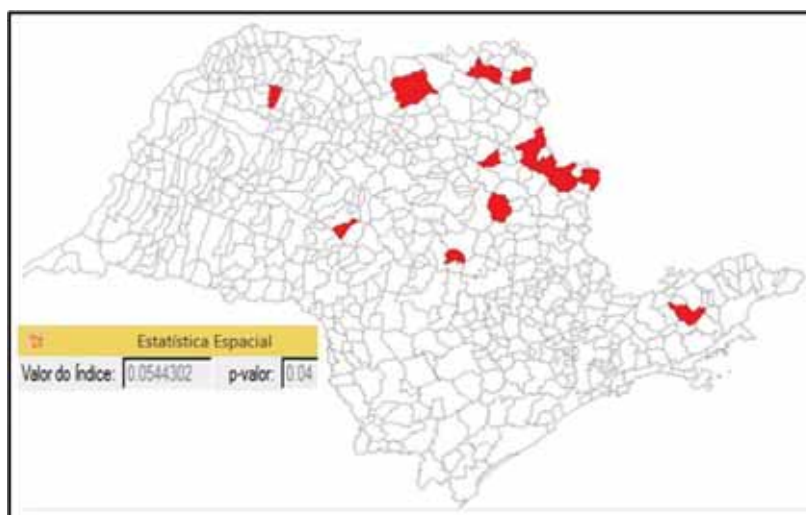


Figura 13. Mapa temático e estatística espacial referente ao diagnóstico pela identificação molecular do *M. bovis* a partir de DNA extraído de lesões sugestivas de tuberculose coletadas no momento da inspeção, em matadouros-frigoríficos de bovinos da região nordeste do Estado de São Paulo durante o período de julho de 2013 a julho de 2014. Regiões pintadas em vermelho referem-se aos municípios cujas amostras foram consideradas positivas pela identificação molecular do *M. bovis* pela nested PCR.

A localização dos municípios (Figura 14) ao redor dos matadouros-frigoríficos (Figura 15) onde os animais estudados foram abatidos permitiu a visualização de dependência espacial significativa ($P = 0,01$) entre a ocorrência de tuberculose, indicada pelo crescimento de colônias bacterianas características de *M. bovis* ao cultivo microbiológico (padrão ouro) e a localização dos municípios, evidenciando relação de casualidade entre os dois fatores. Os outros métodos diagnósticos estudados (caracterização histopatológica, identificação de BAAR, identificação molecular do *M. bovis* a partir de DNA extraído das colônias) também permitiram a visualização de dependência espacial com valores de $P = 0,01$, assim como no padrão ouro de diagnóstico para tuberculose.

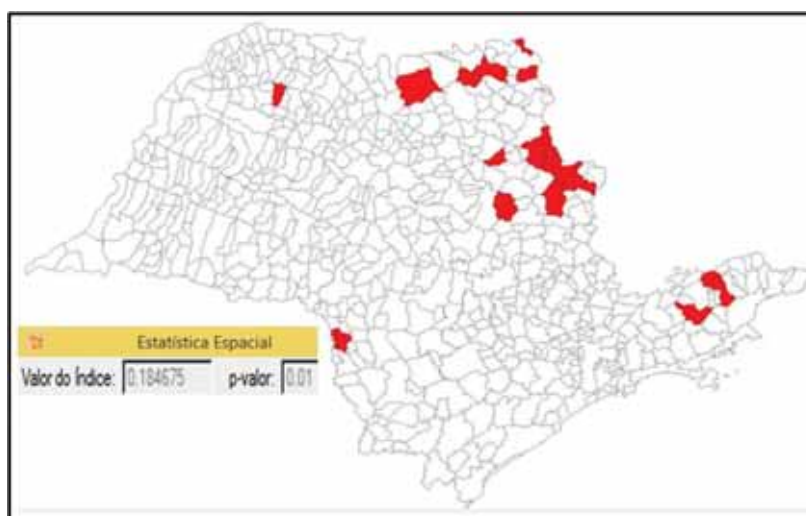


Figura 14. Mapa temático e estatística espacial referente ao diagnóstico pelo cultivo microbiológico do *M. bovis* a partir de lesões sugestivas de tuberculose coletadas no momento da inspeção, em matadouros-frigoríficos de bovinos da região nordeste do Estado de São Paulo durante o período de julho de 2013 a julho de 2014. Regiões pintadas em vermelho referem-se aos municípios cujas amostras foram consideradas positivas ao diagnóstico pelo cultivo microbiológico.



Figura 15. Localização espacial dos municípios (pintados em vermelho) cujos matadouros-frigoríficos foram utilizados como fonte das coletas das lesões sugestivas de tuberculose estudadas durante o período de julho de 2013 a julho de 2014.

Devido a aspectos financeiros, comerciais, de logística e de bem estar animal, os pecuaristas tendem a negociar seus animais com matadouros-frigoríficos próximos a sua propriedade rural, pois a distância e o tempo de transporte podem acarretar em prejuízos aos animais e aos produtores. Tal fato é enfatizado pelos estudos de Moreira et al. (2014) em que os autores observaram 43,75% dos animais com hematomas após percorrerem distâncias menores de 200 km e 95,58% após percorrerem distâncias maiores de 200 km, e de Andrade et al. (2008) que concluíram que as maiores proporções de lesões foram encontradas em animais submetidos ao transporte rodoviário por mais de uma hora e distâncias maiores que 70 km.

Salgado Júnior et al. (2011) destaca a importância da logística na cadeia produtiva da carne e conclui que uma logística de transporte eficiente permite não só a redução nos custos, mas a satisfação tanto do empresário, quanto a de seus clientes e de toda cadeia produtiva, proporcionando assim, uma vantagem competitiva de longo prazo.

Neste contexto, a casualidade presente na dependência espacial entre a localização dos municípios e a ocorrência de tuberculose também pode ser explicada pela presença de importantes rodovias estaduais na região, como a rodovia SP-330 e a SP-310, que facilitam o escoamento dos produtos para a capital do Estado e para o interior, facilitando seu comércio nacional e internacional.

Além dos aspectos comerciais envolvidos, nota-se a importância do conhecimento e de ações no âmbito da vigilância epidemiológica, principalmente quando se trata de doenças infecciosas e de caráter zoonótico que possuem grande impacto econômico e social. Vários pesquisadores (KANTOR e RITACCO, 1994; MALTA et al., 2001; PEREIRA, 2002; SKABA et al., 2004; DE LA RUA-DOMENECH, 2006; MAGALHÃES, 2012) enfatizam a utilização da vigilância epidemiológica com o auxílio do geoprocessamento para visualização espacial dos possíveis fatores de risco envolvidos na ocorrência de determinadas enfermidades em regiões específicas, facilitando ações em saúde pública para o controle e erradicação destas doenças.

Apenas quatro municípios (Figura 16) tiveram animais considerados positivos para tuberculose em todos os métodos diagnósticos. Estes municípios estão

localizados próximos aos matadouros-frigoríficos, entretanto, não houve dependência espacial significativa ($P = 0,29$) entre a localização dos municípios e a ocorrência de tuberculose. Esta ausência de dependência espacial provavelmente ocorreu devido ao reduzido número (12%) de amostras consideradas positivas em todos os métodos diagnósticos, ocasionando baixo número de municípios envolvidos.

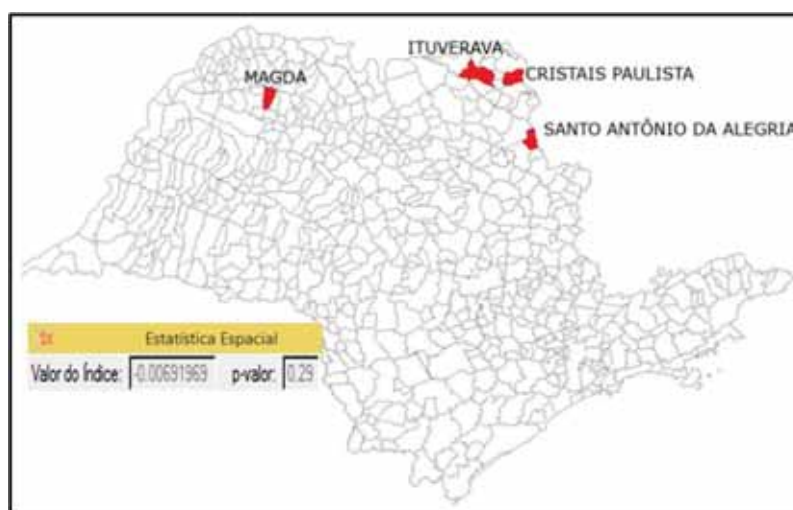


Figura 16. Mapa temático e estatística espacial referente a todos os métodos diagnósticos estudados a partir de lesões sugestivas de tuberculose coletadas no momento da inspeção, em matadouros-frigoríficos de bovinos da região nordeste do Estado de São Paulo durante o período de julho de 2013 a julho de 2014. Regiões pintadas em vermelho referem-se aos municípios cujas amostras foram consideradas positivas em todos os métodos diagnósticos estudados.

Ávila et al. (2013) estudaram a distribuição geográfica de casos de tuberculose bovina no Estado da Bahia e segundo os autores, devido a baixa prevalência da enfermidade os focos encontrados não podem ser explicados por fatores espacialmente estruturados. Este fato também ocorreu no presente estudo, em que a baixa quantidade de animais positivos nos métodos diagnósticos estudados levou a não dependência espacial entre os municípios e a ocorrência da tuberculose bovina.

A tuberculose bovina é endêmica no Brasil (Alzamora Filho et al., 2014), sendo difícil estabelecer uma relação causal específica para sua ocorrência em determinada região do Estado de São Paulo, portanto, ações regionais de vigilância epidemiológica e dados sobre a distribuição espacial da tuberculose são de extrema importância para o sucesso do Programa Nacional Sanitário de combate à esta enfermidade.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as conclusões que se seguem.

A porta de entrada mais provável à infecção pelo *M. bovis* é o sistema respiratório, pois os linfonodos retrofaríngeos foram os mais acometidos com lesões.

A associação da identificação anatomopatológica durante o abate de bovinos em matadouros-frigoríficos, o cultivo microbiológico, a caracterização histopatológica e a identificação do BAAR, é aconselhável para o diagnóstico da tuberculose bovina.

O diagnóstico pela identificação molecular a partir de DNA extraído das lesões sugestivas de tuberculose é possível como alternativa para o diagnóstico rápido da tuberculose bovina, mas não é recomendado e não deve ser utilizado como único método no diagnóstico devido seus baixos valores de sensibilidade, índice de Youden e coeficiente *kappa*.

As melhores concordâncias obtidas entre os métodos diagnósticos estudados foram a identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas, seguida da caracterização histopatológica pela coloração com HE e a identificação de BAAR pela coloração de ZN e as piores foram os moleculares a partir de DNA extraído das lesões sugestivas de tuberculose, perante o diagnóstico microbiológico.

As melhores associações entre sensibilidade e especificidade, aferidas pelo índice de Youden foram encontradas pela identificação molecular a partir de DNA extraído das colônias bacterianas, seguida da caracterização histopatológica pela coloração com HE e a identificação de BAAR pela coloração de ZN, sendo as piores os moleculares a partir de DNA extraído das lesões sugestivas de tuberculose.

O geoprocessamento dos municípios mostrou que não houve dependência espacial significativa entre os municípios e a ocorrência de tuberculose ao avaliar todos os testes diagnósticos. Entretanto, a maioria dos métodos diagnósticos, quando avaliados separadamente, permitiu a visualização geográfica de casualidade entre a localização dos municípios e a ocorrência da tuberculose.

7. REFERÊNCIAS

AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V.; VALLECILLO, A.J.; GUTIERREZ-PABELLO, J.A.; SUAREZ-GÜEMES, F.; McNAIR, J.; CATALDI, A.; ESPITIA, C.; ANDERSEN, P.; POLLOCK, J.M. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalence of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, n.2, p.4326-4335, 2006.

AL-SERHANI, A. Mycobacterial infection of the head and neck: presentation and diagnosis. **The Laryngoscope**. v.111, p.2012-2016.

ALZAMORA FILHO, F.; VASCONCELLOS, S.E.G.; GOMES, H.M.; CAVALCANTE, M.P.; SUFFYS, P.N.; COSTA, J.N. Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.2, p. 103-108, 2014.

ANDRADE, E.N.; SILVA, R.A.M.S.; ROÇA, R.O.; SILVA, L.A.C.; GONÇALVES, H.C.; PINHEIRO, R.S.B. Ocorrência de lesões em carcaças de bovinos de corte no Pantanal em função do transporte. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1991-1996, 2008.

ARAÚJO, C.P.; OSÓRIO, A.L. A.R.; JORGE, K.S.G.; RAMOS, C.A.N.; FILHO, A.F.S.; VIDAL, C.E.S.; ROXO, E.; NISHIBE, C.; ALMEIDA, N.F.; JÚNIOR, A.A. F.; SILVA, M.R.; NETO, D.B.; CERQUEIRA, V.D.; ZUMÁRRAGA, M.; ARAÚJO, F.R. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TBD1. **PLoS ONE**, v.3, n.9, 2014.

ÁVILA, L.N.; PEREZ, A.M.; FERREIRA-NETO, J.S.; FERREIRA, F.; TELLES, E.O.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; GONÇALVES, V.S.P. Análise de detecção de cluster na caracterização espaço-temporal da tuberculose bovina no estado da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.11, p.1313-1318, 2013.

AYELE, W.Y.; NEILL, S.D.; ZINSSTAG, J. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **The International Tuberculosis and Lung Diseases**, v.8, n.8, p.924-937, 2004.

BALIAN, S.C.; PINHEIRO, S.R.; GUERRA, J.L.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n.2, p.11-14, 2002.

BEHMER, O.A., TOLOSA, E.M.C., FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART – São Paulo Livraria Editora, Editora da Universidade de São Paulo, 1976. 241p.

BIFFA, D.; BOGALE, A.; SKJERVE, E. Diagnostic efficiency of abattoir meat inspection service in Ethiopia to detect carcasses infected with *Mycobacterium bovis*: Implications for public health. **BioMed Central Public Health**, v.10, p.462-474, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994. 115 p.

CAMPOS, H. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão**. v.15, n.1, p.29-35, 2006.

CARDOSO, M.A.; CARDOSO, R.F.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H.; LEITE, C.Q.F.; SANTOS, A.C.B.; SIQUEIRA, V.L.D.; OKANO, W.; ROCHA, N.S.; LONARDONI, M.V.C. Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. **Zoonosis and Public Health**, v.56, p.465-470, 2009.

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

COSTA, P.; FERREIRA, A.S.; AMARO, A.; ALBUQUERQUE, T.; BOTELHO, A.; COUTO, I.; CUNHA, M.V.; VIVEIROS, M.; INÁCIO, J. Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal tissues using a Semi-Nested Probe-Based Real-Time PCR. **PLoS ONE**, v.8, n.11, 2013.

CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária (Região Sul). **Manual de Zoonoses: Tuberculose**. 2009.

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

FIGUEIREDO, E.E.S.; CARVALHO, R.C.T.; SILVESTRE, F.G.; LILEMBAUM, W.; FONSECA, L.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.S. Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in nasal swabs from tuberculous cattle by a multiplex PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.2, p.386-390, 2010.

FRÁGUAS, S.A.; CUNHA-ABREU, M.S.; FERREIRA, A.M.R.; MARASSI, C.D.; OELEMANN, W.; FONSECA, L.S.; FERREIRA, R.; LILEMBAUM, W. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.15, n.3, p.117-121, 2008.

FRANCO, M.M.G.; 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 Sao Paulo, Brazil. **BioMed Central Veterinary Research**, v.09, n.85, 2013.

FRANÇA, L.R.; CRUZ, J.F.; NEVES, V.B.F.; CERQUEIRA, R.B. Prevalência e histopatologia de lesões sugestivas de tuberculose em carcaça de bovinos abatidos

no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.14, n.4, p.721-733, 2013.

FURLANETTO, L.V.; FIGUEIREDO, E.E.S.; CONTE JÚNIOR, C.A.; CARVALHO, R.C.T.; SILVA, F.G.S.; SILVA, J.T.; LILENBAUM, W.; PASCHOALIN, V.M.S. Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.11, p.1138-1144, 2012.

HADDAD, N.; MASSELOT, M.; DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. **Review of Main Techniques and Applications**, v.76, p.1-18, 2004.

JONES, T.C.; HURT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole. p.1415, 2000.

JORDÃO JUNIOR, C.M.; LOPES, F.C.M.; PINTO, R.M.A.; ROXO, E.; LEITE, C.Q.F. Padronização da técnica de PCR na detecção de *Mycobacterium bovis* diretamente no leite. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.16, n.1, p.51-55, 2005.

JORGE, K.S.G. **Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica**. 2010, 88f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. Mato Grosso do Sul.

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; JUNIOR, W.C.W. **Diagnóstico Microbiológico**. In: Micobactérias, Medsi, 2001. p.903-946.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloesporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, v.19, p.683-689, 1997.

LAISSE, C.J.M.; GAVIER-WÍDEN, D.; RAMIS, G.; BILA, C.G.; MACHADO, A.; QUEREDA, J.J.; AGREN, E.O.; VAN HELDEN, P.D. Characterization of tuberculous lesions in naturally infected African buffalo (*Syncerus caffer*). **Journal of Veterinary Investigation**, v.23, n.05, p.1022-1027, 2011.

LANDIS, J.R.; KOCK, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1 p.159-174, 1977.

LIMA, S.S.S.; CLEMENTE, W.T.; PALACI, M.; ROSA, R.V.; ANTUNES, C.M.F.; SERUFO, J.C. Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, n.12, p.1056-1062, 2008.

MAGALHÃES, G.B. O uso do geoprocessamento e da estatística nos estudos ecológicos em epidemiologia: o caso da dengue em 2008 na região metropolitana de Fortaleza. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v.8, n.15, p.63-77, 2012.

MALTA, D.C.; ALMEIDA, M.C.M.; DIAS, M.A.S.; MERHY, E.E. A mortalidade infantil em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, por área de abrangência dos Centros de Saúde (1994-1996). **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, n.05, p.1189-1198, 2001.

MARTINS, M. C. **Estudo crítico da utilização das técnicas de biologia molecular na detecção e identificação de micobactérias, em especial, *M. tuberculosis***. 2000. 111f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Saúde Publica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MEDEIROS, L.S.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E.E.S.; LEITE, J.; FERREIRA, A.M.R.; LILENBAUM, W. Assessing the histopathology to depict the different stages of bovine tuberculosis infection in a naturally infected herd. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.2, p.135 - 139, 2012.

MOREIRA, P.S.A.; POLIZEL NETO, A.; MARTINS, L.R.; LOURENÇO, F.J.; PALHARI, C.; FARIA, F.F. Ocorrência de hematomas em carcaças de bovinos transportados por duas distâncias. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, n.3, p.689-695, 2014.

MOTA, P.M.P.C.; LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; LAGE, A.P.; PARREIRAS, P.M. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.4, p.1-3, 2001.

MOTA, P.M.P.C., NAKA/IMA, M. Tuberculose bovina. In: CHARLES, T.P., FURLONG, J. (Ed.). **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1992. P. 97–122.

OIE – **World Organization for Animal Health**. Bovine Tuberculosis; 2005. Disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf. Acesso em 04 de Out de 2014.

OSOBA, A.O. **Microbiology of tuberculosis**. In: MADKOUR, M.M. (ed.) Tuberculosis. 1ª ed. Berlim: Springer-Verlag. 2004. 928p.

PACHECO, A.M.; HAMZÈ, A.L.; PEREIRA, M.F.B., PEREIRA, D.M., CIPRIANO, R.E.P.; LOT, R.F.S. Tuberculose bovina – Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.07, n.03, 2009.

PALMER, M.V.; WATERS, W.R.; THACKER, T.C.; Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Pathology**, v.44, p.863-874, 2007.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia – Teoria e Prática**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002. 596p.

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

PORTILLO-GÓMEZ, L.; MORRIS, S.L.; PANDURO, A. Rapid and efficient detection of extra-pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v.4, n.4, p.361-370, 2000.

PORTILLO, P.; THOMAS, M.C.; MARTÍNEZ, E.; MARAÑÓN, C.; VALLADARES, B.; PATARROYO, M.E.; LOPEZ, M.C. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.2, p.324, 1996.

REBOLLO, M.J.; SAN JUAN GARRIDO, R.; FOLGUEIRA, D.; PALENQUE, E.; DÍAZ-PEDROCHE, C.; LUMBRERAS, C. Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.56, n.2, p.141-146, 2006.

REZENDE-LAGO, N. C. M., REIS, L. S., MARCHI, P. G. F. Levantamento epidemiológico da cisticercose e tuberculose em bovinos abatidos sob inspeção federal no município de Sertãozinho, SP. **Higiene Alimentar**, v.25, n.192/193, p.175-181, 2011.

RODRIGUEZ, J.G.; FISSANOTO, J.C.; PORTILLO, P.D.; PATARROYO, M.E.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A. Amplification of a 500- base-

pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.07, p.2330–2332, 1999.

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

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

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

ROUQUAYROL, M.Z.; GOLDBAUM, M. **Epidemiologia, história natural e prevenção de doenças**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999.

SA'IDU, A.S.; OKOLOCHA, E.C.; DZIKWI, A.A.; KWAGA, J.K.P.; GAMAWA, A.A.; USMAN, A.; MAIGARI, S.A.; IBRAHIM, S. Detection of *Mycobacterium bovis* in Organs of Slaughtered Cattle by DNA-Based Polymerase Chain Reaction and Ziehl-Neelsen Techniques in Bauchi State, Nigeria. **Journal of Veterinary Medicine**, v.01, 2015.

SALAZAR, F. H. P. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil**. 2005 (dissertação). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul.

SALGADO JÚNIOR, A.P.; LIMA, N.C.; PACAGNELLA JUNIOR, A.C.; OLIVEIRA, J.H.C. Um estudo da logística para o escoamento da produção pecuária do sul do Pará. **P&D em Engenharia de Produção**, v.9, n.2, p.94-107, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. Londres: CSHL Press, 2001. 1448 p.

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

SILVA, D.A.V.; BÜRGER, K.P.; MARTINS, A.M.C.V.; PROVIDELLO, A. Identificação de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.08, n.2, p.149-160, 2014.

SKABA, D.A; CARVALHO, M.S; BARCELLOS, C.; MARTINS, P.C; TERRON, S.L. Geoprocessamento dos dados da saúde: o tratamento dos endereços. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.06, p.1753-1756, 2004.

SMITH, N.H.; GORDON, S.V.; DE LA RUA-DOMENECH, R.; CLIFTON-HADLEY, R.S.; HEWINSON, G. Bottleneck and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. **Nature**, v.4, p.670-681, 2006.

TAYLOR, R.N. **Measurement of variation and significance in serological test**. [S.l.]: Academic Press, 1992. 29 p.

TAYLOR,G.M.; WORTH, D.R.; PALMER, S.; JAHANS, K.; HEWINSON, R.G. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BioMed Central Veterinary Research**, v.03, n.12, 2007.

THOEN, C.; LOBUE, P.; KANTOR, I.The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v.112, p.339-345, 2006.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004, 556 p.

UNE, Y.; MORI, T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.30, p.415–425, 2007.

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA E. Comparison of histological techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.164-169, 2008.

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

ZUMÁRRAGA, M.J.; MEIKLE, V.; BERNARDELLI, A.; ABDALA, A.; TARABLA, H.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.232-238, 2005.

APÊNDICE

Apêndice A. Amostras submetidas aos métodos diagnósticos pelo cultivo microbiológico, caracterização histopatológica, identificação de BAAR e pela identificação molecular a partir de linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose provenientes de bovinos abatidos em matadouros frigoríficos sob SIF no Estado de São Paulo entre os meses de julho de 2013 a julho de 2014.

Linfonodo com lesão sugestiva de tuberculose	Amostra	Método de diagnóstico						
		PO ^a	HE ^b	ZN ^c	PCRL ^d	nPCRL ^e	PCRC ^f	mPCR ^g
Retrofaringeo	ITVLRBM*	P	P	P	P	-	P	P
	BALRBM	N	N	N	N	N	N	N
	RILRBM	P	N	N	N	N	P	P
	SJPLRBM	P	N	N	N	N	P	P
	SJPLRBM	P	P	N	N	N	P	P
	DELRBM	N	N	N	N	N	N	N
	MOLRBM*	P	P	P	N	P	P	P
	ANDLRBM	P	P	P	N	N	P	P
	MOLRBM	N	P	P	N	N	N	N
	SJBLRBM*	P	P	P	P	-	P	P
	CBLRBM	N	N	N	N	N	N	N
	TBLRBM*	P	P	P	N	P	P	P
	CRLRBM	P	P	N	N	P	P	P
	CJLRBM*	P	P	P	N	P	P	P
	CPLRBM*	P	P	P	P	-	P	P
	DELRBM	P	P	N	P	-	P	P
	SJBLROD*	P	P	P	P	-	P	P
	FRLRBM	N	N	N	N	N	N	N
	SAJLRBM	N	N	N	N	N	N	N
	CJLRBM	N	N	N	N	N	N	N
	TOLRBM	N	N	N	N	P	N	N
	CALRBM	N	N	N	P	-	N	N
	CCLRBM	P	P	P	N	N	P	P
	SJPLRBM	P	P	P	N	P	P	P
	DILRBM	P	N	N	N	N	P	P
	CGLRBM	P	P	N	N	N	P	P
Mediastínico	ITVLMBM	P	N	N	N	N	P	P
	DELMBM*	P	P	P	N	P	P	P
	SJPLMBM	P	P	P	N	N	P	P
	MALMBM*	P	P	P	P	-	P	P
	PALMBM	N	P	P	N	P	N	N
	CBLMBM	P	P	P	N	N	P	P
	ITVLMBM	P	N	N	N	N	P	P
	DELMBM*	P	P	P	N	P	P	P
	SJPLMBM	P	P	P	N	N	P	P
	SAALMBM*	P	P	P	P	-	P	P
	IPLMOD	P	N	N	N	N	P	P
	NHLMOD	N	P	N	N	N	N	N
	ITALMOD	N	N	N	N	N	N	N
	FARLMOD	N	P	N	N	N	N	N
Pré-escapular	CBLPBM	N	N	N	N	N	N	N
	BALPOD	N	N	N	N	N	N	N
	SSLPOD	P	P	P	N	N	P	P

	IPLPOD	N	P	P	N	N	N	N
Pré-peitoral	IPLPPOD	N	N	N	N	N	N	N
	IPLPPOD	N	P	P	N	N	N	N
	GRLPPBM	P	P	P	N	N	P	P
Traqueobrônquico	BALTOD ^a	P	P	P	N	P	P	P
	GULTOD	N	P	P	N	N	N	N
Atloideano	CGLABM	P	P	P	N	N	P	P
Isquiático	ARLISOD	N	P	P	N	N	N	N
Inguinal	SJBLINOD	N	P	P	P	-	N	N
Hepático	MALHBM	N	N	N	P	-	N	N

Amostras positivas em todos os métodos diagnósticos estudados. ^aDiagnóstico pelo cultivo microbiológico (padrão ouro), ^bCaracterização histopatológica pela coloração com hematoxilina-eosina, ^cIdentificação de BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen, ^dDiagnóstico pela identificação molecular pela PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais, ^eDiagnóstico pela identificação molecular pela nested PCR a partir de DNA extraído das lesões teciduais, ^fIdentificação molecular pela PCR a partir de DNA extraído das colônias bacterianas, ^gIdentificação molecular pela multiplex PCR a partir de DNA extraído das colônias bacterianas.