

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA DE TUBERCULOSE CAUSADA POR *MYCOBACTERIUM BOVIS*
EM BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO SOB SISTEMA DE INSPEÇÃO
ESTADUAL NO ESPÍRITO SANTO, BRASIL

JESSICA NOGUEIRA TEIXEIRA

BOTUCATU

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA DE TUBERCULOSE CAUSADA POR *MYCOBACTERIUM BOVIS*
EM BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO SOB SISTEMA DE INSPEÇÃO
ESTADUAL NO ESPÍRITO SANTO, BRASIL

JESSICA NOGUEIRA TEIXEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Titular. Antônio Carlos Paes

BOTUCATU

2024

T266o	Teixeira, Jessica Nogueira Ocorrência de tuberculose causada por <i>Mycobacterium bovis</i> em bovinos abatidos em frigorífico sob sistema de inspeção estadual no Espírito Santo, Brasil. / Jessica Nogueira Teixeira. -- Botucatu, 2024 100 p. : tabs., fotos, mapas Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientador: Antônio Carlos Paes 1. Tuberculose zoonótica. 2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. 3. Epidemiologia. 4. lesões macroscópicas. 5. rastreabilidade. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Nome da autora: Jessica Nogueira Teixeira

Título: OCORRÊNCIA DE TUBERCULOSE CAUSADA POR *MYCOBACTERIUM BOVIS* EM BOVINOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO SOB SISTEMA DE INSPEÇÃO ESTADUAL NO ESPÍRITO SANTO, BRASIL

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Antônio Carlos Paes

Professor Titular

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - Unesp – Botucatu.

Prof. Rogério Giuffrida

Professor

Universidade do Oeste Paulista

Dra. Ana Paula Flamínio

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - Unesp – Botucatu.

Simone Baldini Lucheis

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - Unesp – Botucatu.

Márcia Marinho

Departamento de Produção Animal e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária (Câmpus de Araçatuba)

Data da Defesa: 12 de março de 2024.

AGRADECIMENTOS

Manifesto agradecimentos especiais as seguintes instituições e pessoas a elas vinculadas:

- Agradeço ao meu orientador Antônio Carlos Paes pela oportunidade e disponibilidade em me aceitar como orientanda. Palavras não iriam descrever a gratidão e honra em tê-lo como orientador.
- Agradeço a Dra. Ana Paula Flamínio por todos ensinamentos, paciência e por ter aceitado contribuir para a pesquisa, cedendo todo seu conhecimento e tempo.
- Agradeço ao Rodrigo Rhoden Barcellos pela oportunidade de realizar o mestrado na mesma instituição em que realizou o próprio mestrado, assim como pelo incentivo e apoio durante o processo.
- Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal (IDAF): a todos os fiscais estaduais agropecuários pela contribuição nas coletas da pesquisa. Em especial, Agostinho Sergio Scofano, por todo apoio e incentivo, contribuindo com sua experiência e conhecimento ao decorrer da pesquisa. Ao Fiscal Agropecuário Estadual, Filipe Gaspari Nascimento, Fiscal Estadual Agropecuário que atua na área de inspeção animal, no qual contribui para as coletas das amostras utilizadas na pesquisa, durante o abate de bovinos.
- Gerência de Diagnóstico Laboratorial do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do ES (GEDLAB/IDAF): Em especial ao Thiago Farias da Silva, pela compreensão em disponibilizar o laboratório do IDAF para acondicionar as amostras, por toda paciência e orientações.
- Subgerência de Fiscalização de Produtos de Origem Animal (SIFP): Em especial ao Rafael Fernandez Ferreira que disponibilizou os dados utilizados na pesquisa e teve compressão durante o percurso.
- Ao Médico Veterinário Leonardo Campos Agostini por ser responsável por coletar

as amostras no frigorífico, sendo um dos principais contribuintes para conseguir o número de amostras desejáveis. Agradeço pelo tempo cedido e pela disposição.

– Ao Médico Veterinário José Júnior, pela compreensão e comprometimento em contribuir para pesquisa, executando as coletas das amostras durante o período da pesquisa.

– Ao professor da Universidade de Vila Velha, Gabriel Augusto Marques Rossi, pelas orientações e auxílio no desenvolvimento dos mapas utilizados na dissertação.

– O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Código de Financiamento 131420/2022-4.

– A todos, agradeço pela contribuição para concluir mais essa etapa em minha vida.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Classificação das Unidades Federativas do Brasil de acordo com grau de risco para tuberculose, 2020	15
QUADRO 2 - Espécies de micobactérias classificadas conforme patogenicidade para seres humanos.....	19
QUADRO 3 - Fatores de patogenicidade de <i>M. bovis</i> , que favorecem a inibição da formação do fagolisossomos.....	26
QUADRO 4 – Parte I: Número de amostras de bovinos com lesões características de tuberculose bovina coletadas durante o período de novembro de 2022 a setembro de 2023 em frigorífico estadual no norte do Espírito Santo, 2023	48
QUADRO 4 – Parte II: Número de amostras de bovinos com lesões características de tuberculose bovina coletadas durante o período de novembro de 2022 a setembro de 2023 em frigorífico estadual no norte do Espírito Santo, 2023.....	49
QUADRO 4 – Parte III: Número de amostras de bovinos com lesões características de tuberculose bovina coletadas durante o período de novembro de 2022 a setembro de 2023 em frigorífico estadual no norte do Espírito Santo, 2023.....	50
QUADRO 5 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo, segundo a literatura citada	51
QUADRO 6 - Total de condenações de bovino com suspeita de tuberculose bovina por frigorífico, no período de julho 2017 a dezembro 2022, Espírito Santo.....	53
QUADRO 7 - Total de condenações de bovinos com suspeita de tuberculose bovina, por ano, no período de julho 2017 a dezembro 2022, Espírito Santo	54
QUADRO 8 – Parte I: Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões suspeitas de tuberculose bovina em animais abatidos em frigorífico estadual no Espírito Santo, 2023	57
QUADRO 8 – Parte II: Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões suspeitas de tuberculose bovina em animais abatidos em frigorífico estadual no Espírito Santo, 2023.....	57
QUADRO 8 – Parte III: Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões suspeitas de tuberculose bovina em animais abatidos em frigorífico estadual no Espírito Santo, 2023	58
QUADRO 9 - Localização dos casos positivos de tuberculose bovina no estado do Espírito Santo por município de origem dos animais, 2023.....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Descrição de prevalência de tuberculose bovina por meio de diagnóstico intradérmico descritas por autores em diferentes Unidades Federativas no Brasil²³

TABELA 2 - Lista de abatedouros ativos sob Serviço de Inspeção Estadual no Espírito Santo, 2023 43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Lesões sugestivas de tuberculose bovina, localizada em pulmões (A e B) e linfonodo (C) de bovinos abatidos em frigorífico no Estado do Espírito Santo, 2022	30
FIGURA 2 - Distribuição geográfica de abatedouros de bovinos no estado do Espírito Santo visitados para inspeção e coleta de amostras sugestivas de tuberculose bovina	42
FIGURA 3 - Mapa do Espírito Santo dividido em macrorregiões	44
FIGURA 4 - Lesão no parênquima pulmonar de bovino caracterizada como sugestiva de tuberculose (necrose de caseificação). B: amostra sugestiva coleta e acondicionada para análise molecular	46
FIGURA 5 - Mapa com a distribuição espacial da prevalência de casos durante o período de julho de 2017 a dezembro de 2022 por município no estado do Espírito Santo, Brasil	55
FIGURA 6 - Mapa com a distribuição de casos durante o período de julho de 2017 a dezembro de 2022 por município no estado do Espírito Santo, Brasil	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DAS MICOBACTÉRIAS	17
2.2 <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i>	20
2.3 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE BOVINA.....	21
2.4 TRANSMISSÃO	23
2.5 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	25
2.6 DIAGNÓSTICO	29
2.6.1 Diagnóstico microbiológico.....	29
2.6.2 Exame necroscópico	29
2.6.3 Inspeção sanitária no frigorífico.....	29
2.6.4 Diagnóstico alérgico-cutâneo	32
2.6.5 Diagnóstico molecular	33
2.7 AÇÕES DE PROFILAXIA E CONTROLE.....	35
2.8 REFLEXOS NA SAÚDE PÚBLICA.....	36
3 OBJETIVOS	40
3.1 Geral.....	40
3.2 Específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 COMISSÃO DE ÉTICA.....	41
4.2 ÁREA DE ESTUDO	41
4.3 ANÁLISE DE DADOS.....	43
4.4 RASTREAMENTO DOS CASOS SUSPEITOS DE TUBERCULOSE BOVINA.....	43
4.5 COLETAS DE AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR)	45
4.5.1 Vigilância ativa em abatedouros.....	45
4.5.2 Rastreabilidade de focos de tuberculose bovina	45
4.5.3 Inspeção e coleta de tecidos e órgãos	45
4.5.4 Planejamento amostral.....	46
4.6 ANÁLISE MOLECULAR	50
4.6.1 Identificação molecular de micobactérias.....	50
4.6.2 Localização dos focos de tuberculose bovina	51

4.6.3 Prevalências de focos e de bovinos com tuberculose	52
5 RESULTADOS	53
5.1 PREVALÊNCIA DOS CASOS SUSPEITOS DE TUBERCULOSE BOVINA NA INSPEÇÃO	53
5.2 RASTREAMENTO DOS CASOS SUSPEITOS DE TUBERCULOSE BOVINA NA INSPEÇÃO	55
5.3 RESULTADO DO ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS E CONFIRMAÇÃO BIOMOLECULAR DE <i>M. BOVIS</i>	57
5.4 LOCALIZAÇÃO DOS FOCOS DE TUBERCULOSE BOVINA POR MUNICÍPIO DO ESPIRITO SANTO	59
5.5 PREVALÊNCIAS DE FOCOS E DE BOVINOS COM TUBERCULOSE.....	60
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	61
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
8 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO A – TOTAL DE CONDECAOCOEAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE POR MACRO REGIÃO DO ES	81
ARTIGO CIENTÍFICO	85

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR: álcool-ácido-resistente

CMTB: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

MNT: Microbactérias não tuberculosas

DIF: Departamento de Inspeção Final

DNA: Desoxirribonucleic Acid - Ácido desoxirribonucleico

EUA: Estados Unidos

IDAF: Instituto De Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo

IFN- γ : Interferon-gama

GEDLAB: Diagnóstico Laboratorial do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAPA: Ministério da Agricultura e Pecuária

M. bovis: *Mycobacterium bovis*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

MOOT: Micobactérias não tuberculosas

OMS: Organização Mundial da Saúde

OIE: World Organization for Animal Health – Organização Mundial da Saúde

PPD: Derivado Proteico Purificado

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

PNCEBT: Programa de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose

RIISPOA: Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produto de Origem Animal.

SIE: Sistema de Inspeção Estadual

SIF: Sistema de Inspeção Federal

SEAG/ES: Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca do Espírito Santo

SIFP: Subgerência de Fiscalização de Produtos de Origem Animal

TBb: tuberculose bovina

UF: Unidade Federativa

TEIXEIRA, J.N. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigorífico sob sistema de inspeção estadual no Estado do Espírito Santo, Brasil**. Botucatu, 2022. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A tuberculose bovina é uma zoonose causada pelo *Mycobacterium bovis*, uma doença crônica debilitante considerada uma das principais causas de morte por um único agente infeccioso e está entre as enfermidades infectocontagiosas com alto acometimento do rebanho bovino do mundo. O presente estudo objetivou determinar a prevalência TBb no estado do Espírito Santo mediante dados de bovinos condenados por lesões sugestivas, no abate, e a procedência dos focos com base na Guia de Trânsito Animal. Assim como, coletar lesões sugestivas para realizar diagnóstico molecular, a fim de confirmar a presença do agente *Mycobacterium bovis*. Para isso, obteve-se dados referentes ao abate de bovinos, de todos os frigoríficos sob Sistema de Inspeção Estadual, de julho de 2017 a dezembro de 2022 para análise descritiva. Em segundo momento foram coletadas amostras de bovinos de um frigorífico sob inspeção estadual para confirma a presença do *M. bovis* pelo qPCR, no período de novembro de 2022 a setembro de 2023. O total de bovinos abatidos no período supracitado foi de 861.849 animais, dos quais 1.772 (0,21%) apresentaram lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose e destinados à condenação total. Em relação a procedência dos animais, 66 municípios do Espírito Santo tiveram pelo menos um caso de tuberculose. Quanto as 74 lesões sugestivas de tuberculose coletada na linha de inspeção de abate de bovinos, 38 (51%) foram confirmadas positivas pelo qPCR e 36 (48%) negativas, representando uma prevalência de 0,07% de tuberculose no frigorífico estudado. Esses resultados reforçam a necessidade de rastrear as propriedades focos e aplicar medidas de prevenção, controle e erradicação, por meio da implantação do PNCEBT.

Palavras-chave: lesões macroscópicas, epidemiologia, rastreabilidade, tuberculose zoonótica e reação em cadeia da polimerase em tempo real.

TEIXEIRA, J.N. **Occurrence of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in cattle slaughtered in a slaughterhouse under the state inspection system in the state of Espírito Santo, Brazil.** Botucatu, 2022. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*, a debilitating chronic disease considered one of the main causes of death from a single infectious agent and is among the infectious diseases with a high incidence of cattle herd in the world. The present study aimed to determine the prevalence of TBb in the state of Espírito Santo using data from cattle condemned for suggestive lesions at slaughter, and the origin of the outbreaks based on the Animal Transit Guide. As well as collecting suggestive lesions to perform molecular diagnosis, in order to confirm the presence of the *Mycobacterium bovis* agent. For this, data relating to the slaughter of cattle was obtained from all slaughterhouses under the State Inspection System, from July 2017 to December 2022 for descriptive analysis. Secondly, samples were collected from cattle from a slaughterhouse under state inspection to confirm the presence of *M. bovis* by qPCR, from November 2022 to September 2023. The total number of cattle slaughtered in the aforementioned period was 861,849 animals, of which 1,772 (0.21%) presented macroscopic lesions suggestive of tuberculosis and were destined for total condemnation. Regarding the origin of the animals, 66 municipalities in Espírito Santo had at least one case of tuberculosis. As for the 74 lesions suggestive of tuberculosis collected on the cattle slaughter inspection line, 38 (51%) were confirmed positive by qPCR and 36 (48%) negative, representing a prevalence of 0.07% of tuberculosis in the slaughterhouse studied. These results reinforce the need to track the focus properties and apply prevention, control and eradication measures, through the implementation of the PNCEBT.

Key words: macroscopic lesions, epidemiology, traceability, zoonotic tuberculosis and real-time polymerase chain reaction.

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose permanece como problema de saúde pública mundial. Estima-se que em 2021, aproximadamente 10,6 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose e 1,4 milhões morreram devido à doença (OMS, 2022). No Brasil, a enfermidade se apresenta como problema de saúde prioritário, visto que o país continua entre os 30 países com maiores prevalências da doença no mundo (Brasil, 2022). Os índices de mortalidade e morbidade são altos em humanos, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (Pinto, 2003). O Estado do Espírito Santo está entre as treze unidades federativas (UF) com altos coeficientes de mortalidade para tuberculose humana, com mortalidade estimada em 2,3 por 100.00 habitantes, e incidência estimada em 30 por 100.000 habitantes (Brasil, 2022).

A tuberculose bovina, causada pelo agente etiológico *Mycobacterium bovis*, é uma doença crônica debilitante considerada a principal causa de morte por um único agente infeccioso, figura entre as enfermidades infectocontagiosas com maior acometimento de bovinos do mundo (Tiveron, 2012). No Espírito Santo, entre o período de 2012 a 2021, 327 casos e 83 focos de TBb foram registrados, enquanto no Brasil, entre 1999 e 2022, 87.427 casos e 19.402 focos foram notificados (MAPA, 2022).

A primeira iniciativa para controlar a doença foi realizada em 1999 pela Associação Brasileira de Buiatria. Em 2001, foi deflagrado em bovinos e búfalos o Programa de controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), com o objetivo de reduzir a incidência e prevalência das enfermidades, almejando a erradicação. Além disso, o programa visa aumentar a competitividade dos produtos de origem bovina e bubalina para o mercado externo e promover a qualidade dos produtos de origem animal (Brasil, 2006; Carneiro *et al.*, 2019).

Em 2017, o programa foi alterado e as novas atualizações passaram a classificar os estados da federação quanto ao grau de risco para tuberculose animal e brucelose (Instrução Normativa SDA 10/2017- alterada pela Instrução Normativa 11/2020), atribuindo ao estado do Espírito Santo em uma escala de A a E, o grau “D” para tuberculose com prevalência de focos igual ou maior que 6%. As escalas de risco A, correspondem a prevalência menor que 2%, B maior que 2% e menor que 3%, C maior que 3% e menor que 6% e E prevalência desconhecida (Quadro 1). Além disso,

a classificação quanto ao grau de risco impõe aos estados da federação medidas a serem executadas em cada escala. Para o estado do Espírito Santo as medidas incluem a realização de vigilância para estas doenças, eliminação dos casos positivos, controle ou erradicação dos focos, estudos epidemiológicos de prevalência e certificação voluntária de propriedade livres (MAPA, 2020).

QUADRO 1 - Classificação das Unidades Federativas do Brasil de acordo com grau de risco para tuberculose, 2020.

Unidade Federativa	Grau de Risco Para Tuberculose
Acre	E
Alagoas	E
Amapá	E
Amazonas	E
Bahia	A
Ceará	E
Distrito Federal	C
Espírito Santo	D
Goiás	C
Maranhão	E
Mato Grosso	A
Mato Grosso do Sul	A
Minas Gerais	C
Pará	E
Paraíba	E
Paraná	B
Pernambuco	B
Piauí	E
Rio de Janeiro	E
Rio grande do Norte	E
Rio Grande do Sul	B
Rondônia	B
Roraima	E
Santa Catarina	A
São Paulo	D
Sergipe	E
Tocantins	A

A inspeção sanitária realizada durante o abate visa a detecção de doenças, contribuindo para saúde pública ao impedir que carnes impróprias para consumo sejam comercializadas, garantindo produção adequada, através da utilização de procedimentos tecnológicos, higiênicos e sanitários (Santos e Junior, 2021). Em casos de tuberculose bovina, o julgamento dos animais acometidos pela doença é realizado pelo médico veterinário oficial. A identificação da TBb é realizada mediante avaliação macroscópicas de lesões sugestivas de acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produto de Origem Animal (RIISPOA), que estabelece no artigo 171, os critérios subjetivos para o destino dos animais (Brasil, 2020). Entretanto, outros patógenos como, *Actinomyces bovis*, *Actinobacillus lignieresii*, *Trueperella pyogenes* e *Rhodococcus equi* podem induzir lesões semelhantes ao *Mycobacterium bovis*, assim como outros patógenos considerados como diagnósticos diferenciais. Desse modo, necessita-se de exame complementar, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para determinar qual é o agente envolvido (Medonça, 2022).

Existem poucos estudos com informações sobre prevalência e distribuição da TBb no Espírito Santo, utilizando dados provenientes da vigilância em frigoríficos. Desta forma, o presente estudo teve por objetivos estimar a prevalência de TBb nas diferentes regiões do estado, utilizando dados de bovinos abatidos em frigoríficos estaduais no período de julho de 2017 a dezembro de 2022. Além disso, utilizar o diagnóstico molecular para confirmar a presença do agente em amostras sugestivas de TBb coletadas em frigorífico e rastrear os municípios de origem dos focos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DAS MICOBACTÉRIAS

A tuberculose é provocada por micobactérias aeróbicas restritas, em forma de bastonete imóveis, não formadora de esporos e desprovidas de cápsulas ou flagelos (Ruggiero *et al.*, 2007). São classificadas como gram-positivas, embora, o alto conteúdo de ácido micólico e de lipídeos na sua parede celular, a entrada de corantes empregados na técnica de coloração de Gram são impedidas. Os bacilos por sua vez irão se corar de vermelho, pois os lipídeos da parede celular ligam-se a fucsina carbólica que não é removida pelo descorante álcool-ácido, sendo designados de bacilos-álcool-ácido-resistentes (Paes; Franco, 2016).

O termo micobactéria, que significa fungo-bactéria. Estes agentes possuem a parede celular composta em sua maioria por conteúdo lipídico, como ácido micólicos e micosídeos, correspondendo a 60% do seu peso seco. A parede celular é formada pela membrana citoplasmática, que corresponde a face interna, uma camada intermediária de peptidoglicano e uma camada externa de ácidos micólicos ligados ao arabinogalactano, no qual formam o complexo micolilarabinogalactano. Desta forma, o complexo a torna resistente a compostos hidrofílicos, dessecação, captação de nutrientes e retardo do crescimento (Almeida *et al.*, 2004, Paes; Franco, 2016). Além disso, a parede é responsável pela resistência inata aos antimicrobianos, a adversidade do meio ambiente e a desinfetantes comuns, contribuindo para sua patogenicidade (Quinn *et al.*, 2005).

As micobactérias são isoladas e visualizadas em seres humanos, diversos animais e meio ambiente. Desde 2018, foi declarada a existência de 188 espécies e 13 subespécies divididas em dois grupos, microrganismo pertencentes ao CMT (complexo *Mycobacterium tuberculosis*) e as MNT (micobactérias não tuberculosas). As espécies podem ser diferenciadas de acordo com o tempo de crescimento *in vitro*, produção de pigmentos e patogenicidade aos seres humanos (Brasil, 2022).

Micobactérias patogênicas multiplicam-se lentamente, as colônias se tornam evidentes após incubação em um período mínimo de três semanas. *Mycobacterium* multiplica-se em meios especiais compostos por ovos e amidos enriquecidos com asparagina e malaquita, que inibe contaminantes. As colônias de *M. bovis* aparecem em meio sólido como lisas e não produzem a enzima nitrato redutase. O *M.*

tuberculosis por sua vez apresenta morfologia áspera ou granular (Almea *et al.*, 2020; Almeida *et al.*, 2004).

As micobacterioses são associadas a micobactérias não tuberculosas ou atípicas. Esses microrganismos são patógenos oportunistas, que acometem principalmente indivíduos imunodeprimidos. As espécies têm sido isoladas de diversas fontes ambientais, assim como em animais, microbiota epidérmica, trato respiratório e gastrointestinal de humanos. Entre as espécies, destacam-se como importantes patógenos oportunistas para humanos as *M. avium*, *M. kansasii* e *M. abscessus* (Andreazza *et al.*, 2015).

QUADRO 2 - Espécies de micobactérias patogênicas para seres humanos (Brasil, 2022).

Patogênicas				
M. leprae	M. tuberculosis	M. bovis	M. africanum	M. microti M. pinnipedii
M. caprae				
Potencialmente patogênicas				
M. avium	M. branderi	M. genavense	M. malmoense	M. simiae
M. avium subsp paratuberculosis	M. celatum	M. haemophilum	M. marinum	M. szulgai
M. abscessus	M. chelonae	M. intracellulare	M. peregrinum	M. ulcerans
M. asiaticum	M. fortuitum	M. kansasii	M. scrofulaceum	M. xenopi
Raramente patogênicas				
M. agri	M. cooki	M. gordonae	M. phlei	M. terrae
M. alchiense	M. diernhoferi	M. hassiacum	M. porcinum	M. thermoresi stible
M. alvei	M. duvalii	M. homossenze	M. pulveris	M. tokaiense
M. brumae	M. fallax	M. lepraemurium	M. rhodesiae	M. triviale
M. austroafricanum	M. farcinogenes	M. mucogenicum	M. senegalense	M. vaccae
M. chitae	M. flavescens	M. nonchromogen icm	M. shimoidei	M. gilvum
M. chubuense	M. gadium	M. neoaurum	M. smegmatis	M. aurum
M. confluentis	M. gastri	M. obuense	M. sphagni	

Fonte: Brasil (2020)

2.2 MYCOBACTERIUM BOVIS

A TBb é uma doença infectocontagiosa, crônica, granulomatosa e com potencial zoonótico, caracterizada por estruturas histológicas específicas denominadas granulomas. O agente etiológico é o *Mycobacterium bovis*, pertencente ao gênero *Mycobacterium*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* (Oliveira *et al.*, 2007). São bacilos curtos aeróbicos, imóveis, não capsulados, não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, sendo a álcool-ácido-resistência sua propriedade mais característica (Marques *et al.*, 2009).

M. bovis, possui formato bacilar, delgada e alongada, com aproximadamente 4 µm de comprimento por 0,5 µm de largura. O método de coloração para visualização desse agente é o de Ziehl-Neelsen, resultando em coloração vermelha devido a fucsina fenicada. Os bacilos da tuberculose, humana e bovina, são álcool-ácido-resistentes (BAAR), portanto apresentam dificuldade de coloração pelos métodos convencionais, em decorrência da resistência da membrana celular ao meio ambiente e aos desinfetantes comuns (Greene e Gunn-Moore, 2015).

As principais espécies de grande importância epidemiológica constituem o complexo *M. tuberculosis*, que envolve: *M. tuberculosis*, agente da tuberculose humana, *M. bovis* BCG, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. canetti* e *M. mungi*. *M. bovis* está inserido neste complexo, devido a semelhança genética de 99,9% de homologia e sequência idêntica à do gene 16SrRNA, porém apresentam se diferencia em relação à características fenotípicas, epidemiológicas e patogênicas (Murakami *et al.*, 2009; Paes; Franco, 2016).

Mycobacterium bovis tem amplo espectro de patogenicidade para as espécies domésticas e silvestres, é o principal agente causal da tuberculose em bovinos, caprinos e bubalinos, sendo rara em ovinos. Os animais silvestres, por exemplo alces e veados, podem desenvolver a doença e serem reservatórios da doença (Greene e Gunn-Moore, 2015).

M. bovis é resistente a desinfetantes comuns, sendo necessário a utilização de fenol orgânico a 3%. Fora do hospedeiro, a bactéria pode ser destruída pela exposição direta da luz solar, após aproximadamente 12 horas. No entanto, ao abrigo da luz, o agente pode permanecer no meio ambiente por até 332 dias ou até dois anos. Em carcaças enterradas, podem resistir por 30 dias e por até 10 meses em carcaças no pasto. Em comparação, água corrente, sobrevivem até 400 dias e em água parada

por até um ano. Em fezes, podem permanecer variáveis 2 e 6 meses (Paes; Franco, 2016).

Mycobacterium tuberculosis, agente associado a tuberculose em humanos, pode causar doença autolimitante em bovinos, não progressiva, mas que torna o animal positivo temporariamente, ao teste intradérmico de tuberculinização, o que pode acarretar prejuízos em decorrência do abate sanitário dos animais falsos-positivos (Brasil, 2022).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE BOVINA

A TBb é uma zoonose de distribuição global, considerada grave problema a saúde pública e animal, principalmente em desenvolvimento onde a prevalência é maior, como na África, Ásia e América Latina (Paes; Franco, 2016).

De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população bovina do Brasil é de 224.602.112 milhões de cabeças. O Espírito Santo possui um rebanho de 2.213.129 milhões de cabeças, ocupando o 17º lugar com maior número de cabeças no país (IBGE, 2021). A TBb está disseminada por todo território nacional. No Brasil, entre 1999 e 2022, foram notificados 87.427 casos e 19.402 focos de TBb, enquanto no Espírito Santo foram notificados 327 casos e 83 focos, no período de 2012 a 2022 (MAPA, 2022).

Com base em programas sanitários, alguns países obtiveram sucesso na erradicação da tuberculose bovina. Atualmente, Austrália, Islândia, Dinamarca, Suécia, Noruega, Finlândia, Áustria, Suíça, Luxemburgo, Letônia, Eslováquia, Lituânia, Estônia, República Tcheca, Canadá, Cingapura, Jamaica, Barbados e Israel são considerados livres de tuberculose bovina. Europa, Japão, Nova Zelândia, Estado Unidos, México, América Central e América do Sul estão em progresso de controle e erradicação, estando em estágios avançados (Ruggiero *et al.*, 2007).

Garcia *et al.* (2021) em estudo da TBb na América do Sul, no período de 2012 a 2018, relataram que Argentina e Chile foram os países com maior número de casos de TBb, com destaque para Argentina que notificaram 8,9 vezes a mais em relação aos outros países. Estima-se que Brasil e Argentina tenham 3,5 milhões de bovinos infectados, representando 2% da população bovina nestes países (Roxo, 2008).

Em Portugal, 3.279.548 animais foram abatidos de outubro de 2012 a janeiro de 2020. Desses, 808 animais foram classificados como casos suspeitos de

tuberculose, representando prevalência de 0,024%. Dos casos suspeitos, 306 (80,3%) foram confirmados por diagnóstico laboratorial (Gonçalves *et al.*, 2022).

No Brasil, prevalências de tuberculose em bovinos já foram descritas por Jorge *et al.* (2011) com frequência de 11,5% (23) em 200 bovinos avaliados no Mato Grosso do Sul. Wurfel *et al.* (2009) no Rio Grande do Sul, observaram prevalência de 0,28% (1.139) em 403.246 bovinos abatidos. Rodrigues *et al.* (2021) em Santa Catarina, em 52.872 bovinos abatidos descreveram a ocorrência de 0,0061%. Lopes *et al.* (2021) registraram prevalência de 0,00087% em Rondônia. Tiveron (2014) em estudo realizado em frigorífico localizado em Barretos, São Paulo, no período de 2007 a 2012, de 1.067.584 bovinos abatidos, 557 (0,052%) apresentaram lesões sugestivas de TBb. A taxa de infecção em rebanhos de bovinos brasileiros foi 0,9% a 2,9% em 454.108 animais testados para TBb.

Salazar (2005) analisando o abate de 57.641 bovinos no Mato Grosso, entre novembro de 2004 e agosto de 2005 em frigoríficos sob inspeção estadual, descreveram que 27 animais foram condenados mediante achados de lesões correspondentes a TBb, apresentando prevalência de 0,05%. Nascimento (2017), entre janeiro de 2007 e dezembro de 2016, descreveram frequência de 0,020% na Bahia, em 857.776 bovinos abatidos.

Souza *et al.* (2022) em estudo realizado na região central de Rondônia, de março de 2018 a fevereiro de 2019, de 208.157 bovinos abatidos, 43 carcaças apresentaram lesões sugestivas de TBb, resultando em ocorrência de 0,02%. Costa (2018) entre 2012 a 2017, de 1.342.774 bovinos abatidos, 24 animais com suspeita de TBb foram condenados, nas cidades de Nova Brasilândia do Oeste e Novo Horizonte D'Oeste, resultando em prevalência de 0,02%.

A TBb é uma zoonose que vem sendo registrada em bovinos de todo território nacional. Conforme estudos de caracterização epidemiológica padronizados em várias unidades federativas do Brasil, obteve-se o diagnóstico situacional do PNCEBT. Mediante a análise, pode-se observar que existem diferentes prevalências da enfermidade entre as UF's, diferenças econômicas, extensão territorial, rebanho e característica de produção. Dentre o período de 2005 a 2014, foram realizados estudos epidemiológicos em 14 estados brasileiros (Tabela 1) (MAPA, 2020).

TABELA 1 - Descrição de prevalência de tuberculose bovina por meio de diagnóstico intradérmico descritas por autores em diferentes Unidades Federativas no Brasil

Autor	Estado	Prevalência (focos)
Galvis et al.(2016)	Espírito Santo	7,6%
Bahiense et al.(2016)	Bahia	1.6%
Lima et al.(2016)	Pernambuco	2.87%
Queiroz et al.(2016)	Rio Grande do Sul	2,8%
Ribeiro et al.(2016) Nascimento (2016)	Distrito Federal	0,05% 3,44%
Veloso et al.(2016)	Santa Catarina	0,50%.
Silva et al.(2016)	Paraná	2,15%.
Vendrame et al.(2016)	Roraima	2,3%
Rocha et al.(2016)	Goiás	3,43%.
Dias et al.(2016)	São Paulo	9%
Barbieri et al.(2016)	Minas Gerais	4,25%
Guedes (2016)	Mato grosso do Sul	1,3%
Néspoli (2016)	Mato Grosso	1,30%
Neto (2021)	Tocantins	0,16%

Fonte: Brasil (2020)

A doença causa prejuízos econômicos pela redução da produção de leite, entre 10% e 18%, diminuição em 20% da conversão alimentar, redução de nascimento em 5% e mortalidade perinatal de bezerros a 1%. Além de reduzir a eficiência produtiva de 10 a 25 %, aproximadamente. Estima-se que a doença afete cerca de 10% das vacas leiteiras e 20% das propriedades de rebanho leiteiro (Homem, 2013; Abrahão et al., 2005).

2.4 TRANSMISSÃO

A introdução da doença no rebanho ocorre principalmente pelo contato com animais portadores, que eliminam o agente, *M. bovis*, pelas secreções (Paes; Franco,

2016). A via aerógena é a principal via de ingresso, seguida da via digestória. A primeira, ocorre por inalação de gotículas infectadas, representando 70% dos casos pulmonares (Murakami *et al.*, 2009). Além da disseminação pela via respiratória, a eliminação do bacilo pode ocorrer pelo corrimento nasal, fezes, urina, secreção vaginal, uterina e sêmen (Ruggiero *et al.*, 2007). Embora ocorra transmissão pela urina e o sêmen, estes materiais biológicos apresentam menor potencial de infecção, sendo a tuberculose genital considerada rara. Animais que eliminam os bacilos pelas fezes, contribuem com a disseminação do agente na propriedade pela contaminação do ambiente, água e alimentos (Paes; Franco, 2016).

Secreções do aparelho respiratório podem contaminar água e alimentos causando tuberculose no sistema digestório de bovinos. Trabalhadores em contato com secreções respiratórias dos aerossóis expelidos pelos bovinos infectados também podem se expor ao agente. A ingestão de leite e o colostro de vacas infectadas também é a via de transmissão para bezerros lactantes e para pessoas que consomem leite *in natura*, queijos artesanais, entre outros derivados lácteos (Paes; Franco, 2016). Em estudo realizado por Ramos *et al.* (2016), em 16 vacas positivas no teste de tuberculinização na Paraíba, cinco apresentaram micobactérias em amostras de leite (32,25%), sendo que três dessas amostras foram por *M. bovis*.

Na América do Norte, 79% das doenças de animais domésticos têm os animais selvagens associados com a transmissão, manutenção ou ciclo de vida do patógeno. Entre essas doenças, 40% são zoonóticas. *M. bovis*, está entre os patógenos mais isolados em espécies selvagens, como gambá-de-cauda-escovador (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia, cervo-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) nos Estados Unidos, texugo eurasiático (*Meles meles*) no Reino Unido e Irlanda, búfalo africano (*Syncerus caffer*) na África do Sul, javali (*Sus scrofa*) na Espanha e bisão de madeira (*bisão bison*) no Canadá (Mohamed, 2020).

Lima *et al.* (2021) relataram casos de tuberculose em cervídeos sambar (*Cervus unicolor*), veado-vermelho (*Cervus elaphus*) e gamo (*Dama dama*), no Parque safári no Estado do Rio Grande do Sul. Das 21 amostras analisadas, 14 (66,7%) animais apresentaram lesões com aspecto granulomatoso. No entanto, com base no PCR, 17 amostras foram positivas para *M. bovis*, confirmando o surto de TBb em cervídeos. Animais silvestres de cativeiro representam risco aos tratadores e visitantes de parques zoológicos, animais domésticos de fazendas vizinhas e

comércio de animais silvestres infectados, prejudicam os programas de erradicação de TBb.

Nesse contexto, além dos reservatórios silvestres e bovinos assintomáticos, outros desafios que dificultam a erradicação da TBb são a ausência de vacina e tratamento. Entre as doenças incluídas nos programas de saúde animal do MAPA, como raiva em herbívoros, febre aftosa e brucelose, a TBb é a única que não possui vacinação e o tratamento não é recomendado como forma de controle. Desta forma, a prevenção e controle da doença se restringe a identificação subjetiva de lesões sugestivas de TBb em abate de bovinos e realização de testes intradérmicos em animais *in vivo* em rebanhos bovinos (Brasil, 2020).

2.5 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

Nos bovinos a tuberculose apresenta-se como doença granulomatosa crônica, altamente contagiosa e de caráter progressivo. Após o contato inicial com o microrganismo, os bacilos inalados por via aerossóis se instalam nos pulmões e são fagocitados pelos macrófagos pulmonares não ativados. Contudo, o patógeno consegue sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos devido aos fatores de patogenicidade presentes na membrana celular lipoprotéica (Quadro 3) (Murakami *et al.*, 2009).

QUADRO 3 - Fatores de patogenicidade de *M. bovis*, que favorecem a inibição da formação do fagolisossomos

Fatores de patogenicidade	Mecanismo de ação
Inibição da fusão dos fagossomos	A não liberação dos íons de cálcio leva ao bloqueio da mobilização e da associação de proteínas mediadoras da fusão de fagossomo e lisossomo.
Produção de amônia	A produção de amônia pelo <i>M. bovis</i> por meio da enzima glutamina sintetase alcaliniza o meio no lisossomo, diminuindo a potência das enzimas lisossomais, que mesmo com a fusão, o ambiente modificado, será favorável a sobrevivência do agente.
Ferro intracelular	Retarda a fusão do fagolisossomo, possibilitando a fuga de <i>M. bovis</i> . A afinidade entre os sideróforos e íons ferro (Fe^{3+}), permite que o patógeno transfira o ferro para a micobactina. A diminuição dos íons de ferro nos macrófagos leva a perda da capacidade bactericida, restrição da maturação do fagossomo, o que permite a elisão do agente para o citoplasma do macrófago.
lipídeos sulfatados ou sulfolipídios	A glicoproteína da parede celular (Trealose-2-sulfato) libera derivados de sulfatos, essa proteína é retirada no fagossomo primário pelo patógeno e impede a fusão com os lisossomos maduros. Esses lipídios sulfatados inibem a fosforilação oxidativa de mitocôndrias dos macrófagos.
Fator corda	O fator corda é um componente da parede celular do <i>M. bovis</i> , considerado um dos mecanismos de hipervirulência. Esse inibe a formação do fagolisossomo induzida pelos íons de cálcio, retarda a acidificação do lisossomo, inibe a respiração e a fosforilação oxidativa dos macrófagos e diminui a produção de citocinas e óxido nítrico pelos macrófagos.
Glicolipídios fenólicos e fosfatidil-inositol	Inibem o mecanismo bactericida dos macrófagos e inibem a proliferação dessas células e dos linfócitos.
Proteína ESAT-6	São mediadores da lise celular que inibem a produção de interleucina 12(IL-12) por macrófagos, prejudicando a sinalização dos receptores de células (TCD4 e TCD8) e impedem a secreção de interferon-gama, aumentando as lesões tuberculosas.

Fonte: Adaptado de Paes e Franco (2016)

Após a primeira resposta imune inespecífica do organismo frente ao bacilo, ocorre a ativação da resposta imune inespecífica, mediante apresentação de antígenos. Assim, os linfócitos liberam linfocinas que atraem, ativam e aumentam o número de células mononucleares no local da infecção e os macrófagos ativados passam a secretar citocinas, enzimas e óxido nítrico (Santos *et al.*, 2016).

Os macrófagos alveolares são os principais mecanismos de defesa, pela ação de linfocinas, citocinas e interleucinas. As linfocinas atraem essas células ao local de ingresso de *M. bovis* e ativam os macrófagos, mediados por linfócitos T, para inativar o agente. Os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ são as células mais potentes na ativação de macrófagos devido ao reconhecimento dos antígenos e outros constituintes do bacilo (Paes; Franco, 2016). Linfócitos T-helper, produzem Interferon-Gama (IFN- γ) estimulando a ativação dos macrófagos, e T citotóxicos atuam na lise das células infectadas para serem ingeridas e mortas por macrófagos ativos. Além de secretar IFN- γ , esses mecanismos celulares auxiliam na intervenção da infecção, atuando na eliminação do microrganismo da célula hospedeira (Murakami *et al.*, 2007).

As vias de disseminação no organismo podem ocorrer pela via linfática, com acometimentos secundários dos linfonodos mediastinais, que formam o complexo primário da tuberculose, lesão primária e lesão no linfonodo regional, o que resulta na formação do granuloma. Com o decorrer da doença, as células centrais do granuloma sofrem necrose caseosa e podem sofrer calcificação. Nesta condição, os bacilos sobrevivem por anos em estado de latência, podendo o indivíduo não manifestar a doença, devida à inibição da multiplicação dos bacilos em material caseoso (Santos *et al.*, 2016; Ruggiero *et al.*, 2007), não é uma regra em bovinos.

A lesão clássica tecidual característica da infecção por *M. bovis* são os granulomas. O granuloma tuberculoso é formado pelo sistema de defesa do hospedeiro frente a um processo infeccioso, que objetiva eliminar o agente, *M. bovis*, além de restringir a ocorrência de danos aos tecidos periféricos e de lesões por reação inflamatória. O granuloma é formado por neutrófilos, macrófagos mononucleares, células gigantes multinucleadas, linfócitos, células mononucleares e pela proliferação de tecido conectivo na periferia, encapsulando a lesão, promovendo uma barreira física para evitar a disseminação do bacilo (Mukarami *et al.*, 2009; Silva, 2007).

A formação ocorre através do recrutamento de células através da liberação de citocinas, como a TNF-alfa, e quimiocinas produzidas pelos macrófagos infectados, além da participação dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Os linfócitos TCD4⁺ produzem as

citocinas, TNF-alfa e INF- γ , esta última regula o processo inflamatório e estimula macrófagos para impedir a multiplicação do bacilo. Como nos bovinos a necrose tem tendência a liquefação, ocorre a disseminação bacilar pela árvore brônquica e formação de novos granulomas (Palmer, 2007).

Nos bovinos a evolução dos sinais clínicos ocorre de maneira rápida com febre discreta, apatia, alteração do apetite, rápido emagrecimento, caquexia e morte. Nas manifestações respiratórias, o animal apresenta cansaço, intolerância ao exercício, aumento dos linfonodos retrofaríngeos e supraescapulares, descarga nasal mucopurulenta, meteorismo crônico e queda na produção de leite. Devido ao comprometimento pulmonar nos espaços alveolares, brônquios e bronquíolos, observa-se clinicamente tosse frequente, estertores, crepitação, roce pleural e áreas de silêncio (Paes; Franco, 2016), ocorrendo na generalização precoce.

As manifestações digestivas, decorrentes da ingestão do bacilo, causam lesões tuberculosas nos linfonodos da orofaringe, havendo disseminação através dos macrófagos para os linfonodos do mesentério, via importante em bezerros que se amamentam de vacas infectadas. No entanto, em razão da constante renovação epitelial não há multiplicação na mucosa intestinal. Nas glândulas mamárias ocorre aumento de volume e endurecimento típico das lesões granulomatosas, mas o leite não apresenta, inicialmente, alterações visíveis, porém com a evolução da doença flocos finos de coloração âmbar podem estar presentes no leite ordenhado (CFSPH, 2007; Filho *et al.*, 2011).

A TBb generalizada ocorre principalmente nos bovinos, apresentando caquexia, graves problemas respiratórios e geralmente vêm ao óbito em alguns meses. Em situações de estresse, imunossupressão ou quando o sistema imune está incapaz de combater a infecção, pequenos tubérculos localizados em vasos sanguíneos e linfáticos são disseminados por todo organismo do animal, acometendo as membranas serosas de todos os órgãos, parênquima pulmonar, hepática e glândula mamária. Nesses animais, no exame necroscópico, são encontradas quantidades significativas de pequenos focos com conteúdo caseoso nas superfícies da pleura, pericárdio e peritônio, pulmões, fígado e baço (Paes; Franco, 2016).

2.6 DIAGNÓSTICO

2.6.1 Diagnóstico microbiológico

O diagnóstico pode ser realizado de forma direta ou indireta, por métodos clínicos, anatomopatológicos ou laboratoriais (Filho *et al.*, 2017). O diagnóstico definitivo consiste no isolamento do agente etiológico por meio da cultura microbiológica, considerada a técnica padrão-ouro, porém necessita de confirmação etiológica por métodos bioquímicos (Bacanelli *et al.*, 2020). Amostras de leite, fragmentos de órgãos, conteúdos de granulomas e caseum podem ser analisados. O material a ser cultivado deve ser incubado em atmosfera de aerobiose a 37°C durante 90 dias, não indicando o descarte antes desse tempo, utilizando meios de cultura que contenham piruvato e sem glicerol, como Stonebrink. A visualização dos bacilos é observada pela coloração vermelha com o método de Zeehl-Nielsen, característica do patógeno (Paes; Franco, 2016; Furlanetto *et al.*, 2012).

2.6.2 Exame necroscópico

No exame necroscópico a doença é identificada por lesões, características, formadas por granulomas nos pulmões, linfonodos mediastínicos, cavidade abdominal, linfonodos mesentéricos e glândula mamária, apresentando diferentes tamanhos. Também podem ser observados pus caseoso na traquéia e na cavidade torácica (Santos *et al.*, 2016).

2.6.3 Inspeção sanitária no frigorífico

A inspeção sanitária em frigoríficos é realizada em estabelecimentos com serviço de inspeção oficial por médicos veterinários, constituindo importante procedimento no diagnóstico da TBb. A inspeção é realizada em dois momentos, *ante mortem*, capaz de visualizar infecções nos animais vivos, podendo ser separados dos restantes em casos específicos, com o objetivo de evitar que animais com doenças infectocontagiosas ou não infecciosas sejam abatidos. E *post mortem*, no qual realiza-se exames nas vísceras e linfonodos durante a linha de inspeção, na sala de matança a fim de garantir a qualidade do produto (MAPA, 2007). As lesões provocadas por *M.*

bovis não são patognomônicas e sim sugestivas da doença. Apresentam coloração amarelada em bovinos, e ligeiramente esbranquiçadas em búfalos. São nódulos de 1 a 3 cm de diâmetro, de aspecto purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar necrose de caseificação no centro da lesão (Figura 1) (Brasil, 2006).

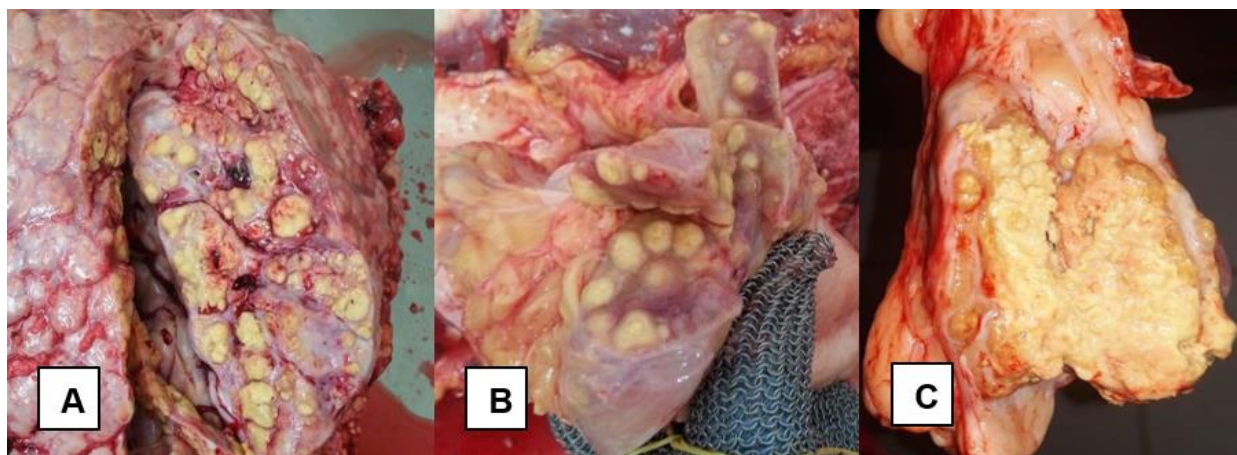


FIGURA 1 - Lesões sugestivas de tuberculose bovina, localizada em pulmões (A e B) e linfonodo (C) de bovinos abatidos em frigorífico no Estado do Espírito Santo, 2022. Fonte própria.

Segundo o RIISPOA, animais devem receber condenação total em casos de estado febril em avaliação *ante mortem*, ou acompanhados de caquexia; ou se apresentarem lesões tuberculóides nos músculos, nos ossos, nas articulações ou nos linfonodos que drenam a linfa dessas regiões; ou apresentarem lesões caseosas concomitantes em órgãos ou serosas do tórax e do abdômen; ou lesões miliares ou perláceas de parênquimas ou serosas; ou lesões múltiplas, agudas e ativamente progressivas, identificadas pela inflamação aguda nas proximidades das lesões, necrose de liquefação ou presença de tubérculos jovens; ou linfonodos hipertrofiados, edemaciados, com caseificação de aspecto raiado ou estrelado em mais de um local de eleição; ou que existam lesões caseosas ou calcificadas generalizadas, e sempre que houver evidência da entrada do bacilo na circulação sistêmica; ou se as partes das carcaças e os órgãos que se contaminarem com material tuberculoso, por contato accidental de qualquer natureza (Brasil, 2020).

No entanto, existem situações em que as carcaças acometidas com TBb podem receber tratamento condicional por esterilização pelo calor. Esses tratamentos

podem ser realizados por esterilização pelo calor através do cozimento em temperatura de 76,6°C, fusão pelo calor em temperatura mínima de 121 °C ou esterilização por calor úmido, com valor de F0 igual ou maior que três minutos ou redução de doze ciclos logaritmos de *Clostridium botulinum*, seguido de resfriamento imediato (Brasil, 2020).

Após remoção e condenação das áreas atingidas, as carcaças podem receber os tratamentos quando, os órgãos apresentarem lesões caseosas discretas, localizadas ou encapsuladas, limitadas a linfonodos do mesmo órgão; ou os linfonodos da carcaça ou da cabeça apresentarem lesões caseosas discretas, localizadas ou encapsuladas; ou existam lesões concomitantes em linfonodos e em órgãos pertencentes à mesma cavidade. Animais reagentes positivos ao teste de diagnóstico intradérmico também podem receber esterilização por calor. Entretanto, carcaças que apresentem apenas uma lesão tuberculosa discreta, localizada e completamente calcificada em um único órgão ou linfonodo podem ser liberadas, depois de removidas as áreas atingidas (Brasil, 2020).

A inspeção em frigoríficos oferece a oportunidade para rastrear a fonte de infecção de volta ao rebanho de origem, auxiliando nas medidas direcionadas sobre como reduzir o risco de transmissão de TBb em áreas geográficas específicas, além de se obter um produto de qualidade (Zhu *et al.*, 2021)

Biffa *et al.* (2010) descreveram que a sensibilidade da inspeção em matadouros na Etiópia foi de 55,2% e a especificidade, para lesões identificadas como TBb, foi de 84,1%, utilizando a cultura e microscopia para confirmação do resultado.

Saenz *et al.* (2015) em estudo realizado em abatedouros de bovinos na Catalunha, obtiveram a média de sensibilidade de 31,4 % correspondente a 36 frigoríficos avaliados durante a inspeção. Esse resultado foi relacionado com a baixa probabilidade de animais infectados apresentarem durante a inspeção *post mortem*, lesões sugestivas de tuberculose bovina.

Zhu *et al.* (2021) em estudo avaliando o abate de vacas leiteiras, relataram que 28,1% dos animais foram detectados na inspeção com lesões sugestivas de TBb, dos quais ao serem confirmados pelo PCR, obteve-se 25,2%. Todavia, 123 carcaças e vísceras sem lesões sugestivas, apresentaram positividade de 6,5% (8/123) no PCR.

2.6.4 Diagnóstico alérgico-cutâneo

As provas tuberculínicas intradérmicas, são testes de diagnóstico indiretos da tuberculose, utilizados de forma individual em bovinos e bubalinos com idade igual ou superior a seis semanas, realizados por médico veterinário habilitado ou oficial. A técnica é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como teste de referência, capaz de revelar infecções a partir de 3 a 8 semanas após a exposição ao *Mycobacterium*.

Considerando que a tuberculose é uma doença com alta capacidade de se propagar pelo rebanho, são necessários métodos de diagnóstico que possibilitem a identificação da infecção clínica e subclínica em vários animais (Paes; Franco, 2016). Nesse contexto, o método utilizado é o teste de tuberculinização intradérmica, descrito na IN 10 de 3 de março de 2017 (Brasil, 2017). Para realização do diagnóstico utiliza-se tuberculina, uma proteína extraída de caldos de cultura de *M. bovis* e *M. avium*. O Derivado Protéico Purificado (PPD) é separado por precipitação com sulfato de amônio ou ácido picloroacético e purificadas por lavagens com ácidos e fosfatos diluídos (Paes; Franco, 2016).

Entre os testes intradérmico regulamentados, existem o teste da prega caudal, realizado apenas em bovinos de corte para fins de triagem, o teste cervical simples realizado em bovinos de leite para triagem, ambos obtidos pela cepa-padrão de *M. bovis*, denominada AN5 e o teste cervical comparativo, que por sua vez, utiliza simultaneamente os PPD (derivado proteico purificado) bovino e aviário. Os testes são realizados em bovinos e búfalos com idade igual ou superior a 6 semanas, através da inoculação da PPD na região escapular, sendo o pescoço a região preferencial, no teste cervical simples ou comparativo, e na base da cauda em caso do teste da prega caudal. Utilizando uma dose de 0,1 ml, por meio da inoculação intradérmica (Brasil, 2017).

O teste cervical simples pode apresentar falsos-positivos, pois caso os animais tenham contato prévio com *M. avium* e/ou micobactérias não tuberculosas (MNT) que não são patogênicas para os animais, estas provocam no local de inoculação, aumento de volume por reação não específica. Diante disso, não será capaz de identificar todos os animais doentes, resultando em falhas na sensibilidade e especificidade. A fim de evitar a ocorrência de falsos-positivos, o mais indicado é a realização do teste cervical comparativo, a reação ao PPD aviário equilibra a resposta

do teste, apresentando melhor sensibilidade e especificidade. Indicado para rebanhos em que a tuberculose é endêmica ou em rebanhos controlados (Paes; Franco, 2016).

Os testes também podem ocasionar falsos-negativos pela falta de reatividade no teste cutâneo, principalmente quando a infecção é recente por *M.bovis*, cerca de 30 a 50 dias, ou em casos de final da gestação, pós-parto e desnutrição. Desta forma, fêmeas submetidas ao teste no intervalo de quinze dias antes até quinze dias depois do parto ou aborto, cujo resultado foi negativo, devem ser retestada entre sessenta e noventa dias após parto ou aborto, com intervalo mínimo de sessenta dias (Brasil, 2020). Entretanto, variações inerentes ao teste, como dose, conservação, tuberculina utilizada e forma de execução, leitura e interpretação dos resultados podem contribuir para falsos-negativos. Em casos de dessensibilização transitória pode seguir-se à injeção de tuberculina, essa reatividade retorna em 60 dias (Quinn *et al.*, 2005).

2.6.5 Diagnóstico molecular

Os métodos tradicionais de isolamento, como o diagnóstico microbiológico, são diagnósticos diretos demorados, em média 90 dias, embora o cultivo ainda seja o padrão ouro. Os métodos moleculares vêm sendo utilizados principalmente pela rapidez no resultado. O PCR é uma técnica altamente sensível, no qual visa ampliar em pequenas quantidades de DNA ou RNA do agente, permitindo que esse material genético alcance um limiar de detecção amostra (Ruggiero *et al.*, 2007).

A técnica de PCR foi introduzida em 1986 por Mullis e Faloona, da qual possibilita através da enzima Taq polimerase, proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*, em poucas horas à amplificação *in vitro* e a identificação de uma sequência alvo de DNA. Para realização do método, são utilizados *primers*, sequências de oligonucleotídeos, que agem como sondas e garantem a especificidade da reação. A amplificação do DNA será possível se houver a hibridização do *primer* com a sequência alvo de DNA da amostra (Costa, 2009).

Outra técnica baseia-se no choque térmico de 65 KDa (hsp65), presente no gênero *Mycobacterium*, com análise da restrição pelas enzimas BstEII e HaeII, que permite a classificação do microrganismo, diferenciando micobactérias de não-micobactérias. Após a identificação, o agente é submetido a genotipagem, a fim de obter a tipificação das estirpes e estudo de dispersão geográfica. Entre esses métodos, o spoligotyping identifica poliformismo com base na presença ou ausência

de pequenas sequências espaçadoras de 34 a 41 pares de base (pg), que intercala com pequenas sequências repetidas de 36 pb, formando o locus de região de repetição direta, apresentando resultados em forma binária padronizada (Paes; Franco, 2016).

Diversos *primers* são utilizados para amplificar a sequência de RNAr 16S-23S, sequência de inserção em cromossomo das micobactérias, como por exemplo: IS6110 e IS1081. Além disso, existem genes codificadores das proteínas, tais como: MPB70 de 24 KDa, Antígeno B de 38KDa e a HSP de 65 KDa (Salazar *et al.*, 2005).

O gene IS6110 é exclusivo do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), que possui múltiplas cópias no DNA. Dependendo da espécie, varia no número de repetições de 1 a 22. Nesse contexto, a diferenciação entre as espécies de micobactérias é estabelecido pelo número de cópias de IS6110 que os microrganismos apresentam. Em cepas de *M. bovis* há de 2 a 6 cópias e somente uma no *M. bovis* BCG (Ruggiero *et al.*, 2007; Pedroso, 2016).

A tipificação é realizada com base no poliformismo pela mudança na sequência dos nucleotídeos e pela variação do número de sequências repetitivas organizadas em tandem, localizadas no genoma, nas regiões intergênicas e não intergênicas. Esse método é realizado com oligonucleotídeos iniciadores destinados a amplificar individualmente os loci de repetição em sequência selecionada, sendo que os tamanhos dos produtos determinam os números de cópias das VNTR amplificadas (Paes; Franco, 2016).

O PCR em Tempo Real, permite determinar valores durante a fase exponencial da reação, possibilitando quantificar fragmentos de DNA e RNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade. Para execução da técnica são utilizados termociclador com sistema ótico para excitação da fluorescência e na coleção da emissão, computador com software para aquisição de dados e análise final da reação. Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, permitindo o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. Os compostos fluorescentes geram um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR, esses valores de fluorescência são gravados durante cada ciclo e representa quantidade de produto amplificado. Os mais utilizados são o *SYBR Green* e *TaqMan* (Novais e Alves, 2004).

A técnica depende da qualidade do DNA, além da escolha correta dos *primers* para amplificação do material e emprego da técnica de extração adequada. Os *primers*

utilizados podem ser do gênero *Mycobacterium*, gênero- específicos que detectam as micobactérias do complexo *M. tuberculosis* ou espécie- específicos que reconhecem sequências do DNA do *M. bovis*, mas não diferencia do *M. tuberculosis*. A sensibilidade da reação de PCR pode ser influenciada pelas soluções empregadas, lise da parede celular, pequeno número de bacilos, parâmetros cíclicos e procedimentos empregados para detectar e identificar o produto (Ruggiero *et al.*, 2007).

O diagnóstico molecular para TBb é baseado na amplificação e detecção de sequências específicas do RNA ou DNA de micobactérias, os resultados podem ser fornecidos em períodos de 24-48 horas, sendo considerados rápidos, seguros, decisivos e econômicos (FLAMINIO, 2019).

2.7 AÇÕES DE PROFILAXIA E CONTROLE

Para o controle e erradicação da doença, deflagrou-se em 2001, o Programa Nacional de controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) para bovinos e bubalinos, estabelecendo normas e procedimentos quanto ao diagnóstico da tuberculose. Segundo o programa, algumas medidas devem ser realizadas, como identificar rebanhos infectados por meio da execução do teste de tuberculina intradérmica em bovinos e bubalinos com mais de seis semanas de idade e abate sanitário de animais positivos ou inconclusivos. O saneamento de animais positivos é obrigatório com base na classificação das Unidades Federativas, devendo ser realizado em até 30 dias (Brasil, 2001).

O monitoramento da doença pela inspeção sanitária em frigoríficos por médicos veterinários oficiais é importante para identificação da enfermidade, que consiste em julgar, mediante legislação vigente, as lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina. Além de realizar o controle de trânsito e participação em exposições, feiras e leilões (Brasil, 2020; Brasil, 2006).

Outra medida profilática é a proibição do consumo de leite cru, além da fabricação de queijos e outros derivados provenientes de rebanho infectados. De acordo com o Decreto 9.013, artigo 243, apenas será permitido o envio do leite de fêmeas clinicamente sãs que não apresentem diagnóstico clínico ou resultado de provas diagnósticas que indiquem a presença de doenças infecto contagiosas que possam ser transmitidas ao ser humano pelo leite (Brasil, 2020). Além disso, para o

médico veterinário responsável pelo rebanho é obrigatório o controle de tuberculose, respeitando as normas e procedimentos estabelecidos pelo programa PNCEBT, devendo-se abolir a utilização de leite de vacas reagentes para qualquer finalidade e circunstância (MAPA, 2018).

A fabricação de queijos com leite cru é permitida para os queijos artesanais que tradicionalmente são elaborados com leite cru, porém devem ser maturados por período inferior a 60 dias. Ficando restrita a queijaria situada em região de indicação geográfica registrada ou em propriedades certificadas como livre de tuberculose ou controlada (Mapa, 2013).

Além disso, o leite deve ser fervido para ser consumido, sem que ocorra ebulição, mantendo o leite em temperatura de fervura por no mínimo 5 minutos. A pasteurização destrói além das micobactérias a maioria dos microrganismos não-esporulados. Embora o *M. bovis* não resista a pasteurização, pode sobreviver a autoclave até 20 minutos e em temperatura de fervura até 5 minutos (Paes; Franco, 2016; Roxo *et al.*, 1997). Antes da pasteurização, aproximadamente 20-40% dos casos de TB em humanos resultam da infecção por *M. bovis* (Waters *et al.*, 2014).

Deve-se destruir cochos de madeira ou de alvenaria porosos, sendo indicado substituí-los por cochos de plásticos não porosos, que permitem ser lavados e desinfetados. É importante que a saúde dos trabalhadores da propriedade seja rotineiramente controlada. Funcionários que mantiveram contato com animais infectados, devem ser encaminhados para consulta médica para avaliação (Paes; Franco, 2016).

Na compra de animais, antes da introdução no rebanho, deve-se realizar teste no local de origem e testá-los no local de destino, respeitando o intervalo mínimo de 60 dias entre os testes. Deve-se priorizar adquirir animais de propriedade certificadas como livres, no qual apresentam risco de infecção menor (Brasil, 2006).

2.8 REFLEXOS NA SAÚDE PÚBLICA

A TBb permanece sendo um desafio à saúde pública mundial. Em 2020, 9,9 milhões de pessoas no mundo foram acometidas pela tuberculose, dos quais vieram a óbito 1,3 milhões de pessoas sem infecção concomitante ao HIV. Em 2021, foram notificados 68.271 novos casos e 4.543 óbitos, resultando em coeficiente de

incidência de 32,0 casos por 100 mil habitantes e coeficiente de mortalidade de 2,1 óbitos por 100 mil habitantes (OMS, 2021).

A tuberculose zoonótica, TBb, causada pelo *M. bovis*, foi responsável por 121.268 novos casos no mundo em 2010, dos quais 10.545 vieram a óbito. Em 2016, foram descritos 147 mil novos casos e 12.500 óbitos (OIE, 2017). Recentemente, em 2019, 140.000 novos casos e 11.400 mortes foram relatadas (OMS, 2020). Atualmente a tuberculose zoonótica representa cerca de 1,4% dos casos de tuberculose em humanos (Olea-Popelka *et al.*, 2017), correspondendo à segunda causa mais comum de tuberculose em humanos, depois de *Mycobacterium tuberculosis* (Almea *et al.*, 2020).

O Estado do Espírito Santo está entre as treze unidades federativas (UF) com maiores coeficientes de mortalidade para tuberculose, com 2,3 por 100.00 habitantes, e coeficiente de incidência de 30 por 100.000 habitantes. No Brasil, os estados com maiores coeficientes de incidência são Amazonas, Rio de Janeiro, Roraima, Acre, Pernambuco, Pará, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Amapá e São Paulo (Brasil, 2022).

Na América latina cerca de 60% da população humana vive em países onde a TBb não está controlada ou o controle é limitado. Estima-se que dos casos de tuberculose humana, 2 % dos quadros pulmonares e 8% dos casos extrapulmonares são causados por *M. bovis*. Além disso, 70 a 80% de tuberculose dos linfonodos cervicais em crianças e 20 % de tuberculose renal em adultos foram causadas pelo agente. A infecção em pessoas jovens, em países sem controle para a enfermidade, ocorre principalmente pela ingestão ou manipulação de leite infectado (Ruggiero *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2010).

Na província de Santa Fé, Argentina, casos de tuberculose, por *M. bovis*, são registrados desde 1977. Esse patógeno foi responsável de 1984 a 1989, por 2% a 6,2% de casos humanos. Já no período de 1988 a 2006, foram registradas prevalências de 2,7% em 2.485 casos de tuberculose pulmonar causada pelo patógeno (Rivera *et al.*, 2010).

Em San Diego, Califórnia e Estado Unidos, a tuberculose zoonótica foi responsável por 45 % dos casos em crianças e 6% em adultos. Nos Estados Unidos, *M. bovis*, é responsável por 1,4% dos casos anuais de tuberculose humana. No México já foram descritos prevalência de 28%, na Nigéria 15%, Tanzânia 16%, Etiópia

17%, Índia 9% e Turquia 5%. Na África estima-se que 70.000 casos de tuberculose ocorrem anualmente no continente (Olea-Popelka *et al.*, 2017).

Davidson *et al.* (2017) entre 2002 a 2014, descreveram 357 casos de tuberculose confirmados por cultura em humanos por *M. bovis*. Neste período, as proporções de casos aumentaram de 0,4% para 0,9% e o número de casos anual foi de 17 em 2002 para 35 em 2014. As pessoas pertenciam à ocupação agrícola ou tiveram contato com animais. Além disso, no mesmo estudo, relataram que dos 272 pacientes infectados 65,5% consumiram produtos lácteos não pasteurizados. Desses, 85,9% eram pessoas com mais de 50 anos e haviam consumido os produtos, cinco anos antes do diagnóstico de TB. Enquanto o contato com humanos infectados foi de 18,2%.

Palacios *et al.* (2016) relataram que dos 1.586 casos de tuberculose na população da Astúrias, durante 2006 a 2014, 1.567 (98,80%) corresponderam a infecção por *M. tuberculosis*, porém 19 (1,20%) casos foram por *M. bovis*, apresentando o trato gastrointestinal como sítio primário da doença.

Em humanos, a principal via de infecção ocorre pela ingestão de leite cru e seus derivados, no Brasil, a taxa de consumo atual de queijo feito com leite cru encontrado em estudo realizado por Rocha *et al.* (2014) foi de 30,7% na região de Juiz de Fora, Minas Gerais. Ao estudar essa população, de 189 pacientes com tuberculose, três (1,6%) infecções foram por *M. bovis*. Todavia, existe o risco de acometimento pelo consumo de carne contaminada, principalmente em decorrência dos abates clandestinos (Paes; Franco, 2016). Na Bahia, em 2001, estimou-se que 60% da população do estado consumia carne sem inspeção. Enquanto em São Paulo, cerca de 30% da carne vendida no mercado varejista era proveniente de abate sem inspeção (Abrahao *et al.*, 2005).

Em estudo realizado por Almeida *et al.* (2010) avaliando 15 açougues na cidade de Diamantina, Minas Gerais, concluíram que 80% das carnes moídas e 40% das amostras de bife estavam contaminados por patógenos e que 100 % dos estabelecimentos que comercializavam essas carnes não possuem inspeção sanitária.

Bezerra *et al.* (2020) em abate clandestino no interior do Alagoas, descreveram como as instalações físicas são precárias e inadequadas, ignorando todo fluxograma de abate preconizado pela legislação, apresentando risco a saúde dos trabalhadores envolvidos e o bem-estar animal.

A transmissão de *M. bovis*, pelo consumo de carne é pouco documentada como risco à saúde pública. Esse fato pode ser explicado, pois as lesões de TB no músculo esquelético são raras, sendo observados em animais com infecção avançada ou tuberculose miliar (disseminada), existindo maior chance da carne ser contaminada durante o processo de inspeção de animais com lesões graves em outros órgãos. O fato da bactéria não se multiplicar fora do hospedeiro vivo, associada a baixa temperatura de armazenamento da carne e curto prazo de validade do produto, faz com que a multiplicação do bacilo na carne seja pouco significativa. Além disso, o patógeno é sensível ao tratamento térmico, produtos cárneos com presença de *M. bovis* submetidos a temperatura de 60°C por 6 minutos não deixam unidades viáveis. Por fim, a transmissão por ingestão é uma via menos eficiente, quando comparada a inalação, necessária maior administração de bacilos viáveis para ocorrer a infecção (Domenech, 2006).

Almea *et al.*, (2020) relataram rara apresentação da doença de Pott causada por *M. bovis* transmitidas por bovinos infectados. A identificação do agente foi possível, pois o laboratório de diagnóstico utilizou meio de cultura contendo piruvato de sódio para o isolamento, meio este ignorado na maioria das organizações internacionais de saúde. Por fim, os autores destacam a necessidade de melhorar a vigilância da tuberculose zoonótica, a fim de aumentar a taxa de notificação do patógeno em humanos.

Os resultados referentes à incidência e prevalência da tuberculose zoonótica são incertos pela subnotificação dos casos ou pela ausência de dados na maioria dos países. Em humanos, o diagnóstico laboratorial é realizado pelo exame microscópico de escarro e o cultivo para isolamento é realizado em meio de cultura a base de glicerol, o que inibe o crescimento do *M. bovis*, dificultando a identificação da tuberculose zoonótica em humanos e gerando a falta de dados (Rocha *et al.*, 2012). Além disso, o problema na identificação e correto diagnósticos na tuberculose influencia no tratamento da doença, devido à resistência de *M. bovis* a pirazinamida, medicamento utilizado no tratamento da tuberculose causada por *M. tuberculosis*. Nos EUA, o tempo de tratamento se diferencia entre os agentes, *M. bovis* e *M. tuberculosis*, sendo recomendado 9 meses e 6 meses, respectivamente (Olea-Popelka *et al.*, 2017). Essa falha na distinção da espécie dos bacilos, induz a falsa impressão de que medidas de controle para bovinos estejam sendo suficientes (Abrahão *et al.*, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Identificar lesões granulomatosas compatíveis com TBb em bovinos abatidos sob inspeção estadual no Espírito Santo no período de julho de 2017 a dezembro de 2022;
- Empregar a técnica de PCR em tempo real para a detecção do DNA de *Mycobacterium bovis* em amostras suspeitas, proveniente de abatedouro-frigorífico de bovinos sob Sistema de Inspeção Estadual (SIE), com vistas a avaliação do processo de identificação macroscópicas das lesões de tuberculose.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar *M. bovis* em lesões inflamatórias, de aspecto “tuberculóide” ou não, em abatedouro sob Serviço de Inspeção Estadual do Espírito Santo, utilizando métodos de diagnósticos moleculares (PCR em tempo real);
- Localizar a procedência dos bovinos abatidos com base na Guia de Trânsito Animal dos animais, expedidas pela Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca do Espírito Santo (SEAG/ES) com diagnóstico confirmado de TBb;
- Mapear as propriedades e seus respectivos municípios com animais que apresentaram lesões macroscópicas sugestivas de TBb durante a inspeção estadual no estado do Espírito Santo;
- Estabelecer a prevalência anual de lesões sugestivas de TBb no período de julho 2017 a dezembro de 2022, através dos dados disponibilizados pela Subgerência de Fiscalização de Produtos de Origem Animal (SIFP).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMISSÃO DE ÉTICA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, sob número 0101/2022.

4.2 ÁREA DE ESTUDO

O Espírito Santo é uma das 27 unidades federativas do Brasil, considerada o quarto menor estado. Possui área de 46.095,583 km² no litoral do Brasil, localizado na região sudeste, fazendo divisa com os estados de Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro. Na pecuária, há criação de gado de corte e leiteiro, possuindo rebanho de 2.131.129 milhões de cabeças, ocupando o 17º lugar com maior número de cabeças no país.

O estudo foi realizado utilizando o total de nove abatedouros- frigoríficos de bovinos com cadastro ativo no Serviço de Inspeção Estadual (SIE) (Tabela 4). Os abatedouros estão localizados nos municípios de Atílio Vivácqua, Cachoeiro do Itapemirim, Muniz Freire, Montanha, Guaçuí, Fundão, Anchieta e Colatina. Dos estabelecimentos supracitados foram obtidos os mapas nosográficos da relação de abate no período de julho de 2017 a dezembro de 2022. Esses dados foram obtidos na Subgerência de Fiscalização de Produtos de Origem Animal (SIFP) do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF).

Os relatórios de abate obtidos no SIE abrangem informações correspondentes ao abate de todos os bovinos dos abatedouros-frigoríficos de bovinos cadastrados, situações observadas durante a inspeção das carcaças e vísceras, o sexo (macho ou fêmea), espécie animal, destinação por condenação total, cozimento, fusão pelo calor, esterilização pelo calor úmido ou condenação parcial.

Para o cálculo da prevalência de TBb no Espírito Santo, foram utilizadas as informações do total de bovinos abatidos no período, dos frigoríficos incluídos no estudo (Figura 2), e o total de condenações de carcaças e vísceras em decorrência de lesões sugestivas de tuberculose, de acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2020).

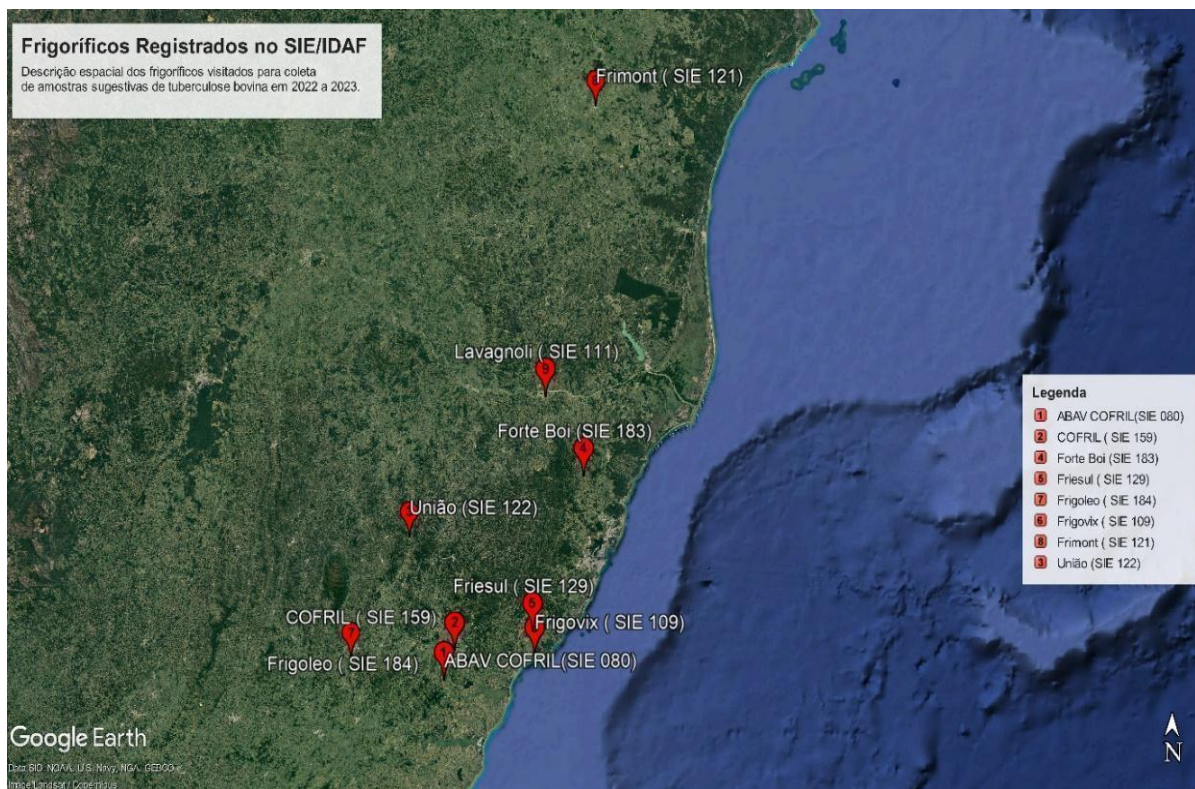


FIGURA 2 - Distribuição geográfica de abatedouros de bovinos no estado do Espírito Santo visitados para inspeção e coleta de amostras sugestivas de tuberculose bovina

TABELA 2 - Lista de abatedouros ativos sob Serviço de Inspeção Estadual no Espírito Santo, 2023

Inspeção (Nº SIE)	Abatedouro	Município
080	Abatedouro Atílio Vivácqua LTDA	Atílio Vivácqua
109	Frigorífico Anchieta Eireli	Anchieta
111	Frilav – Frigorífico Lavagnoli Limitada	Colatina
121	Frigorífico Montanha LTDA	Montanha
122	Frigorífico União LTDA	Muniz Freire
183	Frigorífico Estrela do Sul LTDA	Anchieta
159	Frigorífico Cofril LTDA	Cachoeiro de Itapemirim
129	Forte boi Indústria de Alimentos LTDA	Fundão
184	Frigorífico Caparaó Eireli	Guaçuí

4.3 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram tabulados no programa Excel e analisados por meio de estatísticas descritivas. Com essas informações também foi possível elaborar mapas e tabelas para demonstrar a distribuição de casos de TBb neste período.

4.4 RASTREAMENTO DOS CASOS SUSPEITOS DE TUBERCULOSE BOVINA

Após a análise dos mapas nosográficos, os animais que apresentaram lesões sugestivas de TBb durante a inspeção *post mortem* nos frigoríficos, tiveram a Guia de Trânsito Animal (GTA) consultada, com a finalidade de se obter a origem desses animais, localizando assim o município de origem.

As regiões foram divididas em quatro macrorregiões de planejamento, de acordo com a Secretaria de Economia e Planejamento do Governo do Estado do Espírito Santo (Figura 3).

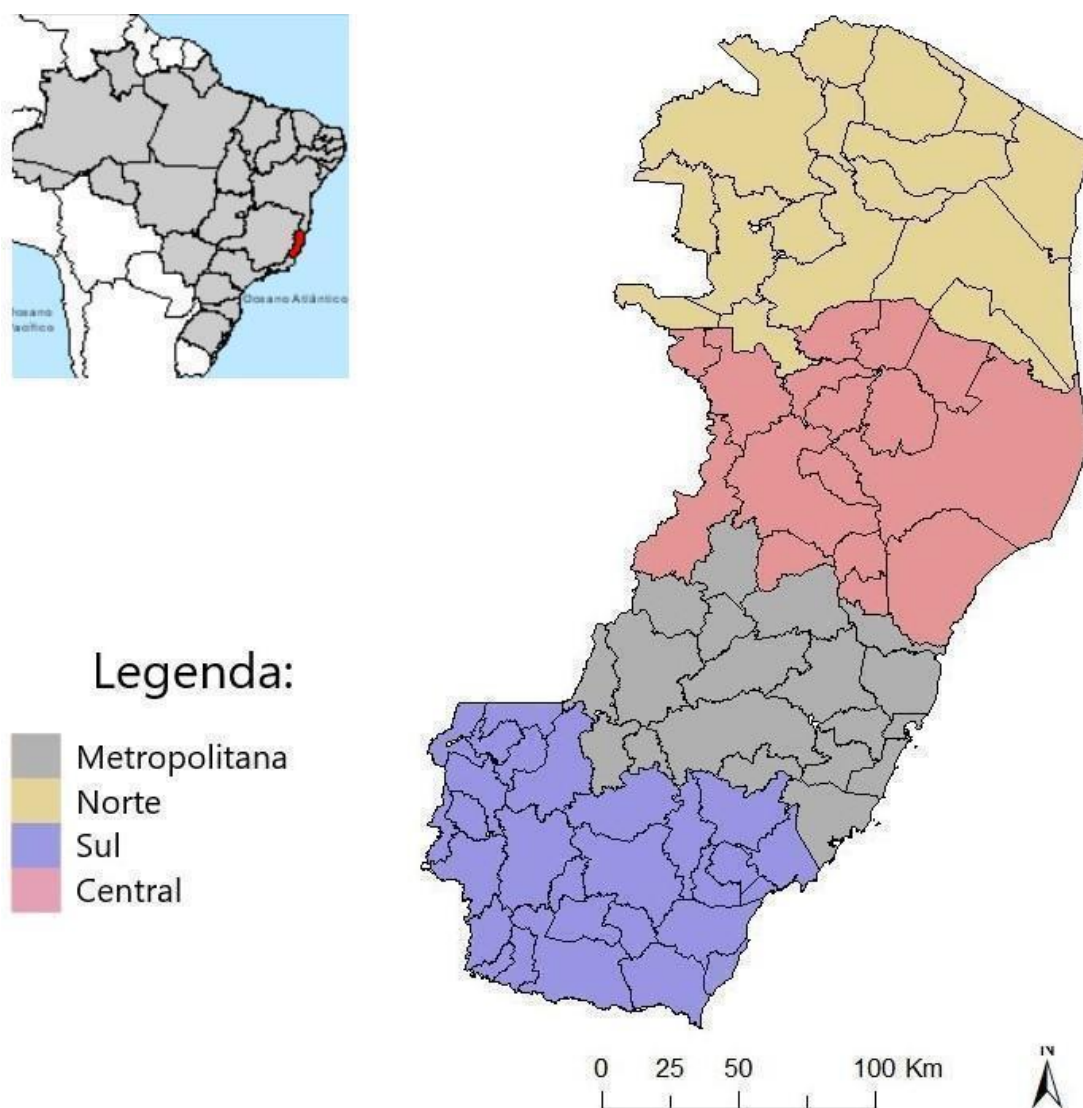


FIGURA 3 - Mapa do Espírito Santo dividido em macrorregiões

4.5 COLETAS DE AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TBb PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR em tempo real)

4.5.1 Vigilância ativa em abatedouros

No período de novembro de 2022 a setembro de 2023, foi selecionado um único frigorífico localizado no norte do Espírito Santo para realizar a coleta das amostras sugestivas de tuberculose durante a inspeção na linha de abate. Os materiais para coleta e a explicação do procedimento correto para obtenção das amostras foi comunicado aos funcionários, fiscal estadual agropecuário e médico veterinário privado da empresa. Desta forma, os profissionais citados anteriormente, durante o abate de bovinos, ao se deparar com amostras de caráter sugestivo para TBb ou linfadenite, as coletaram e acondicionaram em temperatura de congelamento (-20°C). Uma vez coletadas, foi realizado uma visita no estabelecimento para recolher o material congelado e encaminhá-los por meio de caixa isotérmica com gelo para a Gerência de Diagnóstico Laboratorial do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do ES (GEDLAB/IDAF), onde permaneceram até o envio para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da UNESP, Campus de Botucatu (SP) para o diagnóstico molecular.

4.5.2 Rastreabilidade de focos de TBb

As amostras de bovinos coletadas com suspeita de TBb tiveram a Guia de Trânsito Animal (GTA) consultadas para obter informações sobre o município de origem, a fim de estabelecer as regiões com focos da doença no estado.

4.5.3 Inspeção e coleta de tecidos e órgãos

Após a inspeção sanitária nas linhas de inspeção, as carcaças e vísceras com lesões sugestivas de TBb foram desviadas e encaminhadas para o Departamento de Inspeção Final (DIF), para serem examinadas e julgadas pelo médico veterinário oficial. Em seguida, as amostras eram coletadas e armazenadas em sacos plásticos estéril (21X15 cm) e acondicionadas em frascos de tampa rosca estéril (coletores universais estéreis). Esses frascos foram etiquetados com informações como: data,

número do animal, número da amostra, nome do tecido coletado e sexo do animal. Posteriormente, a fim de evitar vazamentos e/ou acidentes por quebra dos frascos, colocou-se um segundo saco plástico estéril.

Durante o período de novembro de 2022 a setembro de 2023, foram coletadas amostras sugestivas de TBb de todos os animais, que durante a linha de inspeção, apresentaram lesões sugestivas de TBb, classificadas de acordo com (RIISPOA), de acordo com o artigo 171, ou lesões identificadas como linfadenite. Esse regulamento caracteriza como macroscopicamente (exame visual) como lesão sugestiva de TBb que apresentam, em suas carcaças e/ou vísceras, lesões tuberculóides, lesões caseosas ou calcificadas, lesões com necrose de liquefação ou presença de tubérculos jovens, lesões miliares ou linfonodos hipertrofiados, edemaciado com caseificação de aspecto raiado ou estrelado.

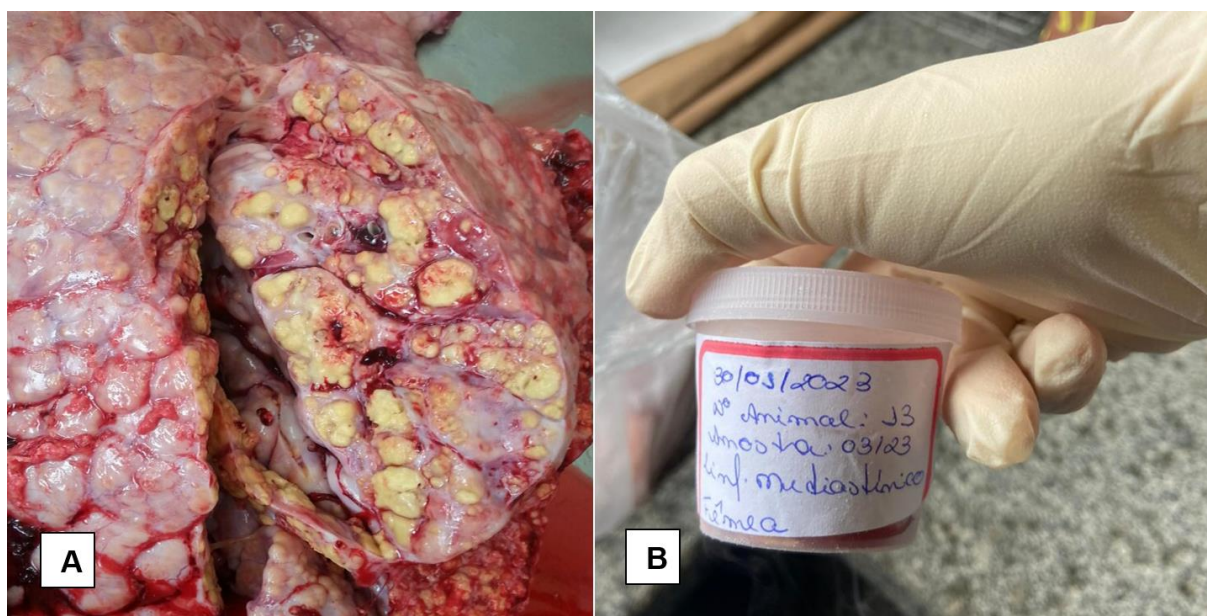


FIGURA 4 - Lesão no parênquima pulmonar de bovino caracterizada como sugestiva de tuberculose (necrose de caseificação). B: amostra sugestiva coletada e acondicionada para análise molecular. Fonte própria.

4.5.4 Planejamento amostral

O cálculo estatístico foi realizado através do programa sigmasta 3.5 pelo cálculo do poder do teste.

O planejamento da quantidade de amostras a serem obtidas no estudo foi calculado a partir dos dados obtidos de bovinos condenados no período de 2017 a 2022 nos frigoríficos estaduais do Espírito Santo. Nesse período foram condenados 1.772 bovinos que apresentaram durante a inspeção na linha de abate lesões compatíveis ou sugestivas para TBb. O total de animais abatidos foi 861.849 bovinos, a porcentagem de incidência de TBb foi de 0,21% nos frigoríficos estaduais do Espírito Santo.

O frigorífico selecionado para coleta das amostras, considerando o número de animais abatidos nesse estabelecimento, 56.397 bovinos abatidos, seria esperado um total de 112,8 amostras com lesões característica de TBb, considerando que a prevalência nos frigoríficos estaduais foi de 0,21%.

As amostras foram submetidas ao congelamento a -20°C na Gerência de Diagnóstico Laboratorial do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (GEDLAB/IDAF), localizada em Cariacica, sendo o transporte realizado em caixas isotérmicas com gelo. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Análises, Biotecnologia e Brioprocessos de Tuberculose do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da UNESP, Campus de Botucatu (SP), por meio de empresa especializada em transporte de amostras biológicas, sendo entregue em condições adequadas para posterior análise.

QUADRO 4 – Parte I: Número de amostras de bovinos com lesões características de tuberculose bovina coletadas durante o período de novembro de 2022 a setembro de 2023 em frigorífico estadual no norte do Espírito Santo, 2023

DATA	ANIMAL	LOCALIZAÇÃO	SEXO	MUNICÍPIO DE ORIGEM
02/12/2022	187	pré-escapular	macho	Linhares
30/01/2023	13	mediastino	fêmea	Aracruz
30/12/2022	149	pré-escapular e mediastino	macho	Linhares
07/12/2022	01	mediastino	macho	Linhares
27/12/2022	152	mediastino	macho	São Mateus
04/11/2022	129	mediastino	macho	São Mateus
21/11/2022	01	mediastino	macho	Baixo Guandu
23/11/2022	97	linfonodo hepático	macho	Mucurici
16/12/2022	08	linfonodo mesentérico	macho	Presidente Kennedy
11/11/2022	237	retrofaríngeo	macho	Linhares
23/11/2022	273	pré-escapular	macho	Linhares
25/01/2023	126	poplíteo e parotídeo	macho	Jerônimo Monteiro
23/01/2023	247	parênquima pulmonar	macho	Montanha
27/02/2023	1	linfonodo submandibular	macho	Colatina
27/02/2023	1	mesentérico	macho	Jerônimo Monteiro
20/03/2023	143	parênquima renal	macho	Mucurici
28/04/2023	282	mediastino	macho	Castelo
19/04/2023	69	parênquima pulmonar	macho	Linhares
27/02/2023	160	parotídeo	macho	Colatina
21/03/2023	60	mediastino	macho	Ecoporanga
27/02/2023	08	mesentérico	macho	Jerônimo Monteiro
15/03/2023	109	mesentérico	macho	Linhares
13/03/2023	341	pré-escapular	macho	Linhares
10/02/2023	250	parotídeo	macho	Linhares
02/05/2023	253	parotídeo	macho	Mimoso do Sul
18/04/2023	148	mediastino	macho	Ecoporanga
19/04/2023	119	mediastino	macho	Linhares
03/03/2023	71	parotídeo	macho	Atílio Vivacqua
08/05/2023	89	peitoral	fêmea	Colatina

QUADRO 5 – Parte II: Número de amostras de bovinos com lesões características de tuberculose bovina coletadas durante o período de novembro de 2022 a setembro de 2023 em frigorífico estadual no norte do Espírito Santo, 2023

DATA	ANIMAL	LOCALIZAÇÃO	SEXO	MUNICÍPIO DE ORIGEM
17/03/2023	270	mediastino	macho	Linhares
27/04/2023	306	parotídeo	macho	Barra de São Francisco
17/03/2023	139	mediastino	macho	Marataízes
27/04/2023	296	mediastino	fêmea	Pancas
10/05/2023	171	parotídeo	macho	Linhares
02/05/2023	265	parotídeo	macho	Colatina
08/03/2023	287	fígado e parotídeo	macho	Ecoporanga
18/07/2023	01	mediastino	macho	Cachoeiro de Itapemirim
17/08/2023	04	parotídeo	macho	Jerônimo Monteiro
23/08/2023	1	hepático	fêmea	Viana
11/09/2023	1	pré-escapular	macho	Baixo Guandu
07/08/2023	01	poplíteo	macho	Boa Esperança
21/08/2023	01	poplíteo	macho	Conceição da Barra
08/09/2023	01	mediastino	macho	São Roque do Canaã
20/07/2023	1	mediastino	macho	Linhares
08/09/2023	02	mediastino	macho	Pancas
17/08/2023	03	parotídeo	macho	Linhares
17/07/2023	1	retrofaríngeo	fêmea	Jerônimo Monteiro
28/07/2023	01	hepático	fêmea	Ecoporanga
04/08/2023	01	parotídeo	fêmea	Cachoeiro de Itapemirim
04/08/2023	1	hepático	macho	Cachoeiro de Itapemirim
07/08/2023	03	parotídeo	macho	Venda Nova do Imigrante
07/08/2023	04	parotídeo	macho	Presidente Kennedy
23/08/2023	01	mediastino	macho	Serra
17/08/2023	01	parotídeo	macho	Cachoeiro de Itapemirim
18/07/2023	02	pré-escapular	macho	Baixo Guandu
07/08/2023	02	pré-escapular	macho	Cachoeiro de Itapemirim
28/07/2023	02	peitoral	macho	Serra
19/07/2023	01	mediastino	macho	Colatina
11/08/2023	1	mediastino	macho	Cachoeiro de Itapemirim
08/09/2023	03	mediastino	macho	Santa Leopoldina
23/08/2023	02	mediastino	fêmea	Viana

QUADRO 6 – Parte III: Número de amostras de bovinos com lesões características de tuberculose bovina coletadas durante o período de novembro de 2022 a setembro de 2023 em frigorífico estadual no norte do Espírito Santo, 2023

DATA	ANIMAL	LOCALIZAÇÃO	SEXO	MUNICÍPIO DE ORIGEM
06/09/2023	1	mediastino	fêmea	Barra de São Francisco
14/08/2023	01	mesentérico	fêmea	Fundão
07/08/2023	05	poplíteo	macho	Boa Esperança
14/07/2023	1	mediastino	macho	Cachoeiro do Itapemirim
17/08/2023	02	parotídeo	macho	Cachoeiro de Itapemirim
14/08/2023	02	mediastino	fêmea	Mimoso do Sul
26/07/2023	1	mediastino	macho	Serra
28/07/2023	1	mediastino e peitoral	fêmea	Serra
21/07/2023	01	mediastino	macho	Nova Venécia
26/07/2023	02	mediastino	macho	Serra
09/08/2023	01	pré-escapular	macho	Afonso Cláudio
19/07/2023	02	mediastino	macho	Colatina
19/07/2023	01	mediastino	macho	Colatina

4.6 ANÁLISE MOLECULAR

4.6.1 Identificação molecular de micobactérias

As amostras sugestivas de TBb coletadas no frigorífico no norte do Espírito Santo foram encaminhadas ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva FMVZ- UNESP, Botucatu, SP, laboratório de biologia molecular, onde foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica de PCR em tempo real. Após verificação das condições das amostras foram acondicionadas até o início do protocolo de identificação molecular.

O protocolo de coleta, extração e amplificação do DNA alvo para o *Mycobacterium bovis* utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi realizado de acordo com o descrito na tese de doutorado de Flaminio (2019) e adaptado conforme literatura citada por Dykema *et al.* (2016) e USDA (2018), incluiu a sonda *TB 100 PROBE* desenhada (sob patente nº 102021018832) conforme Quadro 5.

QUADRO 7 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo, segundo a literatura citada

For/Rev/probe	Sequence	Amplicon Size (bp)
IS1081 F	GACGGCTACCGAGAGATTCTC	84
IS1081 R	GACCAGGTCCCGGAGAGAT	
TB 100 PROBE	TCCAGGTCAGCTCCGAGACGAC	

A extração foi realizada utilizando o kit de extração *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit* (Applied Biosystems™ - Thermo Fisher, USA), com as recomendações definidas de acordo com as instruções do fabricante.

O sistema de reagentes para as amplificações utilizado foi o *VetMAX™-Plus qPCR Master Mix* (Applied Biosystems™ - Thermo Fisher, EUA). As concentrações e a temperatura foram definidas de acordo com as instruções do fabricante e foram realizadas modificações no protocolo para melhorar a sensibilidade e especificidade analítica do teste conforme descritas em Flaminio (2019). Todas as reações de qPCR relatadas neste estudo foram realizadas em volumes totais de reação de 20 µl: 10 µl *VetMAX™-Plus qPCR Master Mix* (Applied Biosystems™ - Thermo Fisher, EUA), 1 µl *primer F*, 1 µl *primer R* e 1 µl sonda, 2 µl de água *nuclease free* e 5 µl de amostra de DNA extraído e purificado.

A mistura reacional foi inicialmente incubada a 50 °C por 2 minutos, depois a 95 °C por 10 minutos. A amplificação ocorreu em 40 ciclos: desnaturação a 95 °C por 15 segundos, e recozimento/extensão a 60 °C por 60 segundos. A reação de qPCR foi realizada em um sistema de qPCR *Step One™* com o software *StepOne™ Software v2.3* (Applied Biosystems).

Toda a validação do teste foi de acordo com o Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (OIE, 2019), seguindo os Princípios e métodos de validação de ensaios diagnósticos para doenças infecciosas propostos no Capítulo 1.1.6 conforme descrito por Flaminio (2019).

4.6.2 Localização dos focos de TBb

Com base nas Guias de Trânsito Animal (GTA's), foi possível localizar com exatidão os municípios de origem dos animais que foram condenados por apresentar lesões sugestivas de tuberculose e após a confirmação do diagnóstico de TBb pelo qPCR nesses animais identificar os municípios que foram foco da doença.

4.6.3 Prevalências de focos e de bovinos com TBb

A prevalência foi calculada utilizando os resultados positivos de TBb mediante ao diagnóstico molecular com o total de bovinos abatidos no período da coleta das amostras sugestivas.

5 RESULTADOS

5.1 PREVALÊNCIA DOS CASOS SUSPEITOS DE TBb NA INSPEÇÃO

O número de bovinos abatidos durante o período de julho de 2017 a dezembro de 2022 foi de 861.849 bovinos. Desse total, foram verificadas durante o exame post-mortem presença de lesões sugestivas de TBb em 1.772 carcaças, correspondendo a uma frequência percentual de 0,21% nos anos pesquisados. Os dados correspondentes às condenações em cada ano analisado foram descritos nos Quadros 6 e 7.

QUADRO 8 - Total de condenações de bovino com suspeita de tuberculose bovina por frigorífico, no período de julho 2017 a dezembro 2022, Espírito Santo

Frigorífico (SIE)	Casos 2017	Casos 2018	Casos 2019	Casos 2020	Casos 2021	Casos 2022
SIE 080	22	88	76	58	38	15
SIE 159	99	127	112	66	65	53
SIE 183	0	55	88	68	49	55
SIE 129	44	22	8	30	8	19
SIE 111	3	5	0	7	0	0
SIE 121	3	10	5	3	28	9
SIE 122	25	0	30	27	0	40
SIE 184	0	1	13	26	17	13
SIE 109	43	90	63	24	15	7
Total	239	398	395	309	220	211

QUADRO 9 - Total de condenações de bovinos com suspeita de tuberculose bovina, por ano, no período de julho 2017 a dezembro 2022, Espírito Santo

Ano	Nº Total	Nº Condenações	Prevalência (%)
2017	65.751	239	0,36%
2018	101.763	398	0,39%
2019	275.914	395	0,14%
2020	162.627	309	0,19%
2021	128.877	220	0,17%
2022	126.917	211	0,17%
TOTAL	861.849	1.772	0,21%

O mapa apresentado na (Figura 5) possibilita identificar as áreas geográficas de acordo com a prevalência de casos de TBb no território do Espírito Santo. Neste mapa, observa-se que na região sul foram observados os municípios com maiores prevalências da enfermidade.

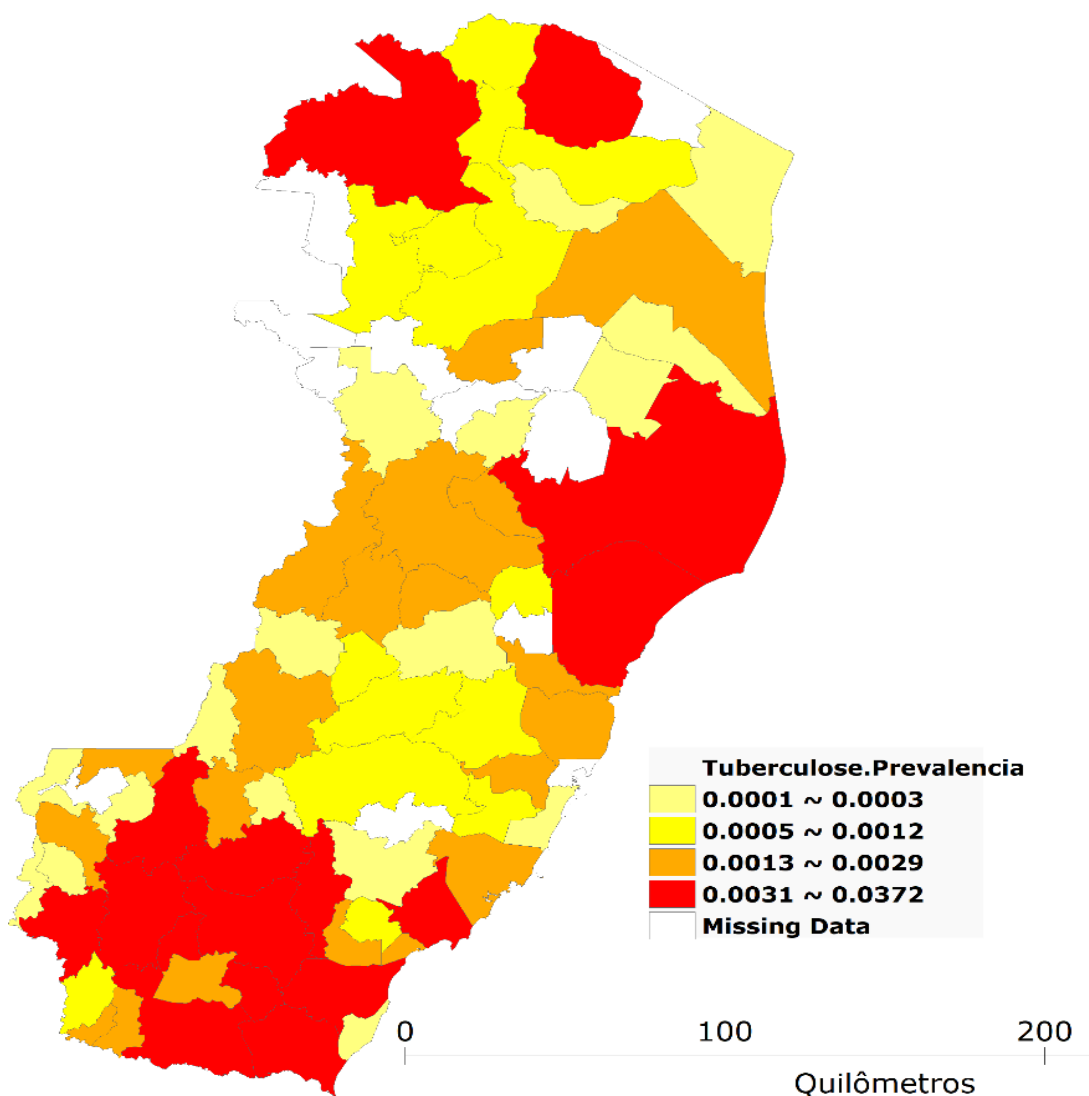


FIGURA 5 - Mapa com a distribuição espacial da prevalência de casos durante o período de julho de 2017 a dezembro de 2022 por município no estado do Espírito Santo, Brasil

5.2 RASTREAMENTO DOS CASOS SUSPEITOS DE TBb NA INSPEÇÃO

As Guias de Trânsito Animal (GTA) possibilitaram a localização de propriedades rurais e municípios de origem dos bovinos abatidos. Ao consultar as informações sobre os municípios de origem dos animais que apresentaram lesões sugestivas de TBb durante o abate, os 1.772 animais condenados eram provenientes de 66 municípios do estado do Espírito Santo.

Entre as regiões que apresentaram casos de condenações por TBbdurante a inspeção em abatedouros- frigoríficos de bovinos, os municípios pertencentes a região

sul, apresentou maior índice de rejeição de animais, apresentando um total de 1.226 animais condenados, correspondendo a uma prevalência de 0,14%. A segunda região com maior frequência foi a central com 264 condenações, resultando em prevalência de 0,03%. Seguido da região metropolitana com 164 descartes e prevalência de 0,02% e região norte com 118 condenações e prevalência de 0,001%.

Foram constatadas lesões de TBb em bovinos abatidos nas quatro regiões de estudo, com diferenças significativas em relação ao número de bovinos com essas lesões por região.

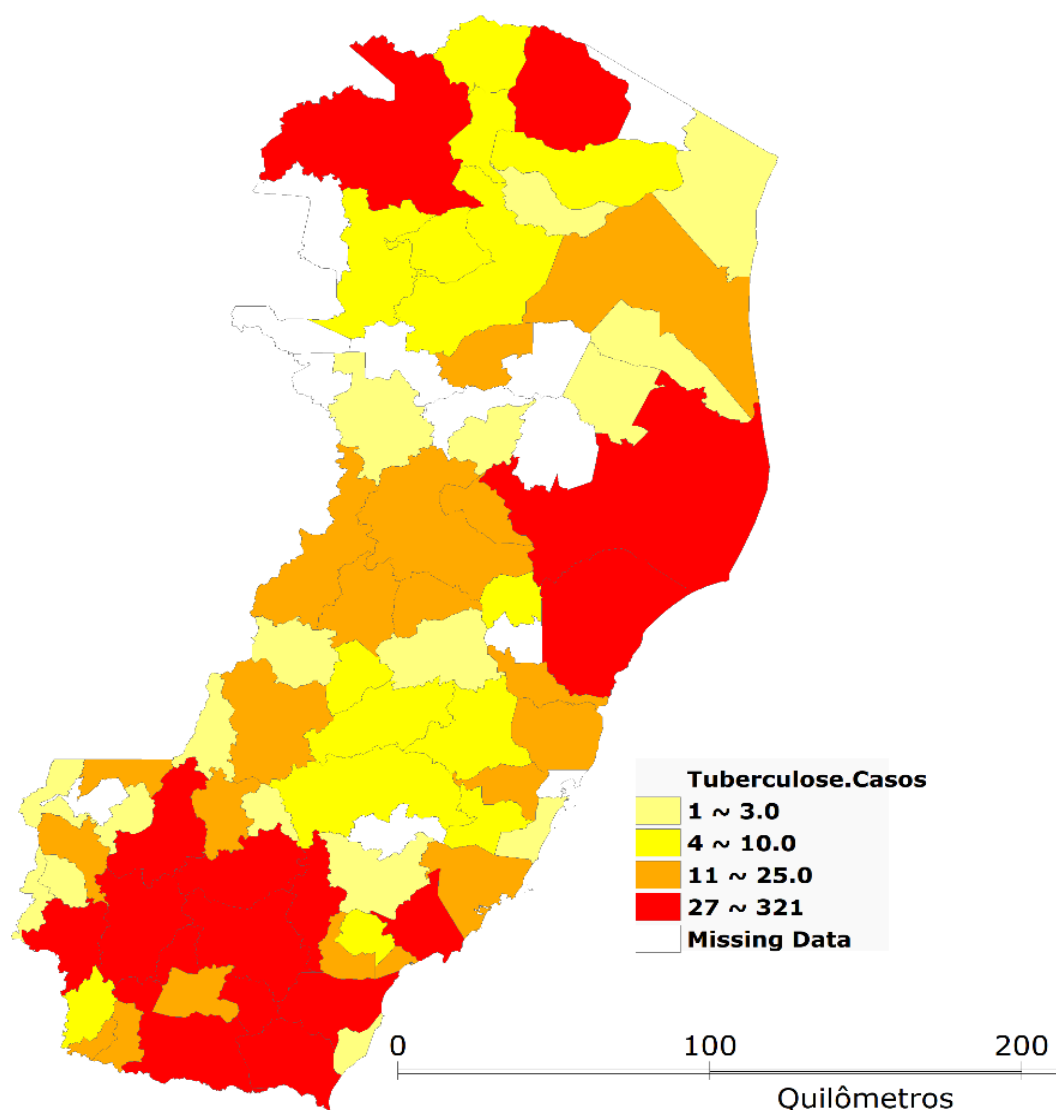


FIGURA 6 - Mapa com a distribuição de casos durante o período de julho de 2017 a dezembro de 2022 por município no estado do Espírito Santo, Brasil

5.3 RESULTADO DA DETECÇÃO DE MICOBACTÉRIAS E CONFIRMAÇÃO COM DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *M. BOVIS*

As amostras identificadas por meio da inspeção visual que apresentaram lesões com nódulos granulomatosos de aspecto purulento ou caseoso, com presença de capsula fibrosa ou presença de calcificação no centro da lesão, foram coletadas e submetidas ao diagnóstico molecular. Dentre as 74 amostras de bovinos com lesões sugestivas de TBb no estado do Espírito Santo, 38 amostras foram positivas para tuberculose (51%) e 36 (48%) negativas no qPCR.

QUADRO 10 – Parte I: Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões suspeitas de tuberculose bovina em animais abatidos em frigorífico estadual no Espírito Santo, 2023

Amostras	Sexo	Localização	Resultado	Ct
1	M	pré-escapular	negativo	INDET
2	F	mediastino	negativo	INDET
3	M	pré-escapular e mediastínico	positivo	31,00
4	M	mediastino	positivo	24,11
5	M	mediastino	positivo	34,06
6	M	mediastino	positivo	36,56
7	M	mediastino	positivo	35,85
8	M	linfonodo hepático	positivo	34,51
9	M	linfonodo mesentérico	negativo	INDET
10	M	retrofaríngeo	negativo	INDET
11	M	pré-escapular	negativo	INDET
12	M	poplíteo e parotídeo	negativo	INDET
13	M	parênquima pulmonar	negativo	INDET
14	M	linfonodo submandibular	negativo	INDET
15	M	mesentérico	negativo	INDET

QUADRO 11 – Parte II: Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões suspeitas de tuberculose bovina em animais abatidos em frigorífico estadual no Espírito Santo, 2023

Amostras	Sexo	Localização	Resultado	Ct
16	M	parênquima renal	positivo	26,37

17	M	mediastino	positivo	28,94
18	M	parênquima pulmonar	positivo	21,39
19	M	parotídeo	negativo	INDET
20	M	mediastino	negativo	INDET
21	M	mesentérico	positivo	29,05
22	M	mesentérico	negativo	INDET
23	M	pré-escapular	positivo	29,71
24	M	parotídeo	negativo	INDET
25	M	parotídeo	negativo	INDET
26	M	mediastino	negativo	INDET
27	M	mediastino	negativo	INDET
28	M	parotídeo	negativo	INDET
29	F	peitoral	negativo	INDET
30	M	mediastino	negativo	INDET
31	M	parotídeo	negativo	INDET
32	M	mediastino	positivo	24,81
33	F	mediastino	positivo	30,55
34	M	parotídeo	positivo	28,00
35	M	parotídeo	positivo	28,73
36	M	fígado e parotídeo	negativo	INDET
37	M	mediastino	positivo	35,98
38	M	parotídeo	positivo	30,97
39	F	hepático	negativo	INDET
40	M	pré-escapular	negativo	INDET
41	M	Poplíteo	negativo	INDET
42	M	Poplíteo	positivo	32,46
43	M	Mediastino	positivo	37,00
44	M	Mediastino	negativo	INDET
45	M	Mediastino	negativo	INDET
46	M	Parotídeo	positivo	29,80
47	F	retrofaringeo	positivo	33,75
48	M	Hepático	positivo	34,26
49	F	Parotídeo	negativo	INDET

QUADRO 12 – Parte III: Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões suspeitas de tuberculose bovina em animais abatidos em frigorífico estadual no Espírito Santo, 2023

Amostras	Sexo	Localização	Resultado	Ct
50	M	hepático	negativo	INDET
51	M	parotídeo	positivo	36,18
52	M	parotídeo	positivo	32,33

53	M	mediastino	negativo	INDET
54	M	parotídeo	positivo	28,58
55	M	pré-escapular	negativo	INDET
56	M	pré-escapular	negativo	INDET
57	F	hepático	positivo	27,58
58	M	mediastino	positivo	30,49
59	M	mediastino	negativo	INDET
60	M	mediastino	negativo	INDET
61	F	mediastino	positivo	28,88
62	F	mediastino	positivo	30,92
63	F	mesentérico	negativo	INDET
64	M	parotídeo	positivo	33,48
65	M	mediastino	positivo	23,63
66	M	parotídeo	positivo	27,61
67	F	mediastino	positivo	33,70
68	M	mediastino	positivo	26,47
69	F	mediastino e peitoral	positivo	33,61
70	M	mediastino	positivo	37,00
71	M	mediastino	positivo	26,32
72	M	pré-escapular	negativo	INDET
73	M	mediastino	positivo	29,55
74	M	mediastino	positivo	33,51

5.4 LOCALIZAÇÃO DOS FOCOS DE TBb POR MUNICÍPIO DO ESPÍRITO SANTO

Com base nas Guias de Trânsito Animal (GTA's) foi possível identificar os municípios de origem de cada animal positivo para TBb no diagnóstico molecular pela técnica de qPCR em bovinos abatidos no frigorífico sob inspeção estadual utilizado no estudo.

QUADRO 13 - Localização dos casos positivos de TBb no estado do Espírito Santo por município de origem dos animais, 2023

Amostras	Município
3	Linhares
4	Linhares
5	São Mateus
6	São Mateus
7	Baixo Guandu
8	Mucurici

16	Mucurici
17	Castelo
18	Linhares
21	Jerônimo Monteiro
23	Linhares
32	Marataízes
33	Pancas
34	Linhares
35	Colatina
37	Cachoeiro de Itapemirim
38	Jerônimo Monteiro
42	Conceição da Barra
43	São Roque do Canaã
46	Linhares
47	Jerônimo Monteiro
48	Ecoporanga
51	Venda Nova do Imigrante
52	Presidente Kennedy
54	Cachoeiro de Itapemirim
57	Serra
58	Colatina
61	Viana
62	Barra de São Francisco
64	Boa Esperança
65	Cachoeiro do Itapemirim
66	Cachoeiro de Itapemirim
67	Mimoso do Sul
68	Serra
69	Serra
70	Nova Venécia
71	Serra
73	Colatina
74	Colatina

5.5 PREVALÊNCIAS DE FOCOS E DE BOVINOS COM TBb

A prevalência de TBb no frigorífico utilizado na pesquisa após o resultado confirmatório das lesões sugestivas pelo qPCR foi de 0,07%, considerando que no período de novembro de 2022 a setembro de 2023 foram abatidos 56.397 animais.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O PNCEBT, classifica as Unidades da Federação (UF) de acordo com o grau de risco para tuberculose em classes de A a E, com base nas prevalências estimadas por estudos padronizados pelo MAPA. Além disso, classifica em níveis de 0 a 3, levando em consideração a execução das ações de defesa sanitária animal previstas no plano de ação. O estado do Espírito Santo, está classificado como classe D, apresentando prevalência de focos maior ou igual a 6%, com risco alto para TBb, fato esse que implica em medidas sanitárias como vigilância para detecção de focos e saneamento obrigatório dos focos detectados (MAPA, 2017; MAPA, 2020).

No presente estudo, a prevalência de tuberculose nos bovinos abatidos no Espírito Santo, baseados nos dados dos frigoríficos fiscalizados pelo SIE, foi de 0,21%. Este resultado é condizente com o reportado por Calegari *et al.* (2020), que ao inspecionar 26 mil bovinos abatidos em frigorífico sob supervisão estadual no sul do Espírito Santo, obteve prevalência de 0,24 %. E por Paoli *et al.* (2013) com prevalência de tuberculose ao abate de 0,23%. No entanto, superior ao relatado por Assunção *et al.* (2014) que de 72.434 bovinos abatidos em Campina Verde, Minas Gerais, no ano de 2013, 74 animais foram condenados por tuberculose, correspondendo a uma prevalência de 0,10%. Estudos esses baseados também em análise de dados sobre condenações por lesões sugestivas de TBb.

No Brasil, prevalências de TBb vêm sendo relatadas pelos estados brasileiros, como descrito por Carvalho *et al.* (2013) no Mato Grosso, após inspecionar 41.193 carcaças bovinas, no período de maio a outubro de 2009, obteve-se 198 (0,48%) animais com lesões suspeitas de TBb. Em São Paulo, Silva *et al.* (2014), ao avaliar 38.172 bovinos, a incidência foi de 0,16% de lesões sugestivas de TBb caseosa e 0,11% de lesões sugestivas de tuberculose calcificada. Assim como, Rondônia e Pará com prevalências de 0,005 % e 0,006%, respectivamente (PASTER *et al.*, 2022; DOURADO *et al.*, 2018).

Coimbra *et al.* (2021) em estudo observacional na região Nordeste do Brasil durante 2020 a 2021, relatou frequências de TBb distribuídos em três estados, Alagoas (6,25%), Bahia (31,25%) e Ceará (62,5%). Em 2019, no Paraná, a tuberculose foi a principal causa de condenações de órgãos, apresentando uma prevalência de 55,10% por lesões sugestivas (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

As GTA'S possibilitaram a localização de propriedades rurais e municípios de origem dos bovinos abatidos, os casos de TBb estavam distribuídos em 66 municípios. A movimentação de animais em uma rede de propriedades é um dos principais fatores de dispersão de doenças no rebanho, utilizadas para planejar medidas de vigilância epidemiológica e para obter informações necessárias para desenvolver planos de prevenção. Wang *et al.* (2022) descrevem a movimentação de bovinos como um dos principais fatores de risco para TBb. O trânsito de animais entre propriedades rurais favorece a introdução e disseminação de agentes infecciosos nos rebanhos. Desta forma, as propriedades que recebem animais provenientes de diferentes origens e/ou os enviem para diferentes destinos podem desempenhar um papel central na introdução e disseminação de doenças dentro de uma rede de trânsito animal (IDAF, 2021).

Picasso *et al.* (2017) em estudo no Uruguai descreveu que os aumentos da incidência de TBb nas propriedades estudadas estiveram relacionados à movimentação dos animais, favorecendo a disseminação de doenças. Portanto, a rastreabilidade dos casos, contribui para direcionar as atividades de vigilância nas fazendas de alto risco, já que a aglomeração e circulação de animais infectados são fatores de risco para transmissão (WATER *et al.*, 2014).

Em 2020, 882.759 bovinos e bubalinos transitaram entre propriedades no Estado, sendo essas espécies responsáveis por mais da metade do trânsito interestadual no estado. Os municípios de Mucurici, Linhares, Montanha, Colatina e Cachoeiro do Itapemirim foram considerados regiões com maior vulnerabilidade, em relação a entrada de agentes infecciosos, via movimentação de animais. Principalmente, os três últimos, por possuírem abatedouros localizados em seu território (IDAF, 2021).

Os resultados das condenações por municípios, demonstraram que as regiões metropolitana e norte apresentaram menores índices de casos no Estado. Esse fato pode ser relacionado com a tipologia de propriedades que predominam nessas regiões, pois a maioria possui características de exploração da pecuária de corte (IDAF, 2020), autores como (ABRAHÃO *et al.*, 2005) relatam que gado de corte tendem a apresentar menor prevalência quando comparados ao gado de leite, devido o tipo de criação ser em sistema extensivos e por serem abatidos precocemente. Desta forma, a região sul, por predominar propriedades com aptidão leiteira, observou-se maior índice de condenações com origem desses municípios. Fato que

corroborar com o estudo realizado por Oliveira *et al.* (2020) no Maranhão, de 2013 a 2018, relatam prevalência de 0,003%, onde a baixa frequência encontrada no estudo foi associada com o perfil dos animais abatidos, pois mais de 94% dos bovinos eram machos e a grande maioria aptidão de corte. Assim como, Alcantra *et al.* (2021) que descreveram prevalência de 0,84% para TBb, no qual 70,2% dos animais eram fêmeas e 29,8% machos.

Em estudo realizado por Garcia *et al.* (2021), os estados que mais notificaram casos de TBb eram representativos na bovinocultura leiteira, com destaque para Rio Grande do Sul (12.390 notificações), Santa Catarina (8.898 notificações), Paraná (8.262 notificações) e Minas Gerais (3.274 notificações).

A distribuição espacial dos casos de TBb descrita pela autora Paoli *et al.* (2013) indicou que dos 78 municípios do Espírito Santo, 52 (66,7%) apresentaram pelo menos um bovino com lesões sugestivas ao abate. Contudo, dados referentes aos animais amostrados, demonstraram resultados superiores, indicando que 66 (84,7%) dos municípios apresentaram pelo menos um caso de tuberculose bovina.

Lavgnoli *et al.* (2010) em 32.052 bovinos examinados, oriundos de 1.933 propriedades de vários municípios do Espírito Santo, observou que 163 animais apresentaram reação positiva para TBb no teste de tuberculinização. Nesse contexto, a região norte apresentou prevalência de 1,41%, seguida da região sul com 0,62%, noroeste 0,38% e metropolitana 0,32%. A prevalência no Estado do Espírito Santo foi de 0,54%. Todavia, no presente estudo, a frequência de animais condenados em frigoríficos foi maior em animais da região sul com prevalência de 0,14% e menor na região norte com prevalência de 0,001%.

Segundo estudo de Hoffmann *et al.* (2022) os casos de condenações por TBb no Espírito Santo, estavam distribuídas principalmente nos municípios de Colatina (33,33%) e Linhares com (23,83%). Teixeira *et al.* (2022) descreveram a prevalência de 0,80% de lesões sugestivas para TBb em frigorífico no sul do Espírito Santo. Dentre os municípios mencionados, Cachoeiro do Itapemirim apresentou maior índice de casos, assemelhando-se ao presente trabalho.

Um dos principais desafios da epidemiologia de *M. bovis* frente a erradicação da TBb é a definição da fonte de infecção e da rota de transmissão (Rocha *et al.*, 2012). Em 2020, 20.497 bovinos entraram no Espírito Santo com origem de outras unidades federativas, como Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, com destino a 57 municípios do Espírito Santo (IDAF, 2021).

Conhecer a classificação dos estados, quanto o grau de risco, e obter informações sobre a epidemiologia e o rastreamento da doença em cada estado, permite que os produtores adquiram animais de propriedade e regiões certificadas livres para TBb ou controlada. Por exemplo, nos estados referidos, como no Rio Grande do Sul, houve aumento de 52% no número de animais positivos para TBb em 2015 em relação a 2014, apresentando uma prevalência de 0,72%. Em Minas Gerais, Campos (2019) no período de 2006 a 2016 em Uberaba, consultando dados de condenações de 457.318 bovinos, 2.180 foram condenados, resultando em uma frequência de 0,48%. Sendo que os municípios de Patos de Minas obtiveram maior número de casos com 1,18%, seguida da região de Araxá com 0,849%. Em relação ao estado do Rio de Janeiro, quanto ao grau de risco, o estado é classificado como “E” para TBb, o que significa que sua prevalência é desconhecida. Adquirir animais de status desconhecidos ou de regiões cujo as prevalências são altas, apresentam risco de introdução da doença na propriedade e no estado.

Em avaliações *in vivo* utilizando diagnósticos indiretos preconizados pelo PNCEBT, verifica-se no estado do Espírito Santo prevalências maiores àquelas encontradas em abatedouro. Neto *et al.* (2019) avaliou 48 propriedades no município de Ibitirama no Estado do Espírito Santo, utilizando teste cervical simples em 901 bovinos. O estudo relatou prevalência de 4,44% para animais positivos e focos de 39,58%. Ressaltando que esses resultados ocorreram, principalmente, pela introdução de animais na propriedade sem serem testados ou submetidos a quarentena. A doença encontrava-se disseminada na localidade e a cada dez propriedades avaliadas, pelo menos quatro apresentavam pelo menos um caso da enfermidade.

Em estudo transversal realizado por Galvis *et al.* (2016) entre janeiro de 2012 e maio de 2014, a prevalência de TBb foi de 7,6% utilizando o teste cervical comparativo nos bovinos amostrados. A região sul do estado obteve maior prevalência no rebanho com 11%, semelhante ao presente estudo, e a região norte apresentou prevalência moderada com 5%.

Alcantra *et al.* (2021) em análise de dados fornecidos pelo Sistema de Inspeção Municipal no Ceará, dos 4.416 animais abatidos, esses eram oriundos de 36 municípios do estado. A prevalência encontrada foi de 0,84%. Garcia *et al.* (2021) entre 2012 a 2018, após consulta dos dados do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), o Brasil apresentou prevalência média de 0,02%, com taxas mais elevadas

nos estados de Santa Catarina (0,21%), Distrito Federal (0,11%), Rio Grande do Sul (0,09%) e Paraná (0,09%). Em relação a prevalência de focos, os destaques foram Paraná com 1,35%, Distrito Federal com 1,29% e Santa Catarina com 0,88%.

Segundo IBGE, o Espírito Santo possui 33.128 propriedades pecuárias, destes apenas dois estabelecimentos, localizados nos municípios de Colatina e Santa Teresa apresentam certificação de livre para TBb. A certificação de estabelecimento de criação é de adesão voluntária, essas propriedades ficam obrigadas a cumprir medidas de controle e erradicação da tuberculose, assim como possuir supervisão técnica de médico veterinário habilitado, utilizar sistema de identificação individual dos animais e custear as atividades de controle e erradicação para a doença. Para a obtenção da certificação a propriedade fica condicionada a realização de dois testes de rebanho negativos consecutivos, realizados em bovinos a partir de seis semanas, com intervalo de seis a doze meses (Mapa, 2017).

De acordo com as informações obtidas pelo Diagnóstico Situacional para a Tuberculose realizado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária, o diagnóstico para a TBb no Espírito Santo apresentou uma queda linear entre os anos de 2014 e 2018, havendo uma redução total de 51,7% do número de exames realizados no rebanho total. Demonstrando a necessidade de mais pesquisas no campo da epidemiologia da TBb no Espírito Santo (Mapa, 2020).

A confirmação do diagnóstico para TBb das amostras sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos em um frigorífico no Espírito Santo, analisadas por meio da técnica de qPCR, resultou em 38 amostras positivas (51%) e 36 amostras negativas (48%), das 74 amostras coletadas com alterações macroscópicas sugestivas da doença. Em estudo conduzido por Hoffmann *et al.* (2022) no mesmo estado, dentre 31 (0,12%) amostras de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, 24 (77,42%) foram positivas e 7 (22,58%) negativas por meio do PCR. Flaminio (2019) no Centro-Oeste do Estado de São Paulo, relata que de 30 lesões suspeitas de tuberculose coletadas em frigoríficos federais, 24 (80%) foram confirmados positivos para *M. bovis* e /ou *M. tuberculosis* e 6(20%) foram confirmadas negativas, através do PCR em tempo real.

Silva (2016) em frigorífico localizado em Garanhuns, Pernambuco, de 3.180 pulmões de bovinos abatidos, 32 animais apresentaram lesões sugestivas de TBb, das quais 18 (56,25%) amostras foram positivas para *M. bovis* e 2 positivas para *Mycobacterium sp.* por meio da técnica de PCR (multiplex PCR). Grande *et al.* (2020),

por meio do PCR, em estudo realizado no Amazonas, 35 (55,6%) amostras foram positivas e 28 (44,4%) negativas. Gonçalves *et al.* (2022) em Portugal obteve 306 (80,3%) positivas para TBb utilizando o PCR.

Resultados diferentes da presente pesquisa, no que se refere a quantidade de amostras positivas em relação as negativas, foram encontradas por Amorim *et al.* (2022) no Ceara que das 44 lesões sugestivas de tuberculose, 7(15,9%) foram positivas e 37 (84,09%) negativas. Carvalho *et al.* (2013) em estudo no Mato Grosso, obteve das 198 amostras, uma prevalência de 28(14,14%) casos positivos e 170 (85,86%) negativos. Castro *et al.* (2022) das 167 lesões de frigoríficos de Santa Catarina e Mato grosso, 73(43,71%) foram positivas e 94 (56,28%) negativas. Costa *et al.* (2020) que de 43 amostras, 7 (16,28%) positivas e 36 (83,7%) negativas. Almeida (2021), em 12 (3,9%) amostras isoladas no meio seletivo de Stonebrink-Leslie, 8(2,65%) obtiveram confirmação de *M. bovis* por meio do PCR. Os resultados óbitos nesses trabalhos, demonstram que a porcentagem de lesões sugestivas positivas no PCR são, na sua maioria, menores do que os casos negativos.

A prevalência de TBb no frigorífico utilizado no estudo foi de 0,07%. Ressalta-se que a diferença na detecção de lesões sugestivas entre os frigoríficos de abate de bovinos, depende do tempo disponível para examinar a carcaça e o tempo de experiência do fiscal responsável. Desta forma, as quantidades de condenação variam entre frigoríficos em diferentes regiões.

Destaca-se com esses resultados descritos na literatura que os animais condenados com suspeita de TBb pela inspeção visual não são diagnósticos precisos. Souza *et al.* (2016) em estudo demonstraram que a inspeção macroscópica não detectou lesões sugestivas em 45% das carcaças. Diversos fatores podem influenciar nesse resultado, como estágio da doença, contato dos animais com outras micobactérias, pequena quantidade de bacilo no tubérculo, entre outros. Desta forma, a utilização de técnicas como o qPCR apresenta vantagens em relação a outros meios de diagnóstico. Uma das vantagens do qPCR é o tempo de processamento, em até 24-48 horas, quando comparado a cultura bacteriológica, ainda considerada padrão ouro no diagnóstico, que apresenta resultados entre 60 a 90 dias. Além disso, o qPCR apresenta maior rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade quando comparada ao PCR convencional (Flaminio, 2019; Castro, 2022).

Filho *et al.* (2014), ressalta a importância da associação do exame *post mortem* com o PCR na identificação da TBb, em seu estudo a utilização da técnica permitiu

identificar o agente da doença no estado da Bahia de forma rápida e em regiões onde o *status* sanitário era de baixa prevalência.

A imprecisão da inspeção visual das lesões característica de TBb ocorre, pois, lesões granulomatosas em bovinos durante a linha de abate causadas por agentes como, *Trueperella pyogenes*, *Rhodococcus equi*, *Nocardia spp* e actinomicetos aeróbicos não são distinguíveis das micobactérias pela avaliação das lesões macroscópicas, tornando-se necessário a realização do diagnóstico diferencial em bovinos suspeitos de TBb (Almeida, 2021). Como demonstrado no estudo, 36 (48%) amostras caracterizadas como lesões sugestivas de TBb foram negativas pela técnica qPCR, nesses casos os envolvimento desses outros agentes bacterianos podem ter causado lesões semelhantes ao *M. bovis* resultando em equívocos na inspeção visual. Entretanto, mesmo diante dos erros na condenação dos bovinos, a lei regulamenta que em casos de dúvida e/ou presença de lesões com necrose de caseificação ou nódulos granulomatosos, os mesmos sejam descartados como forma de prevenção e controle da doença.

O percentual de resultados positivos de 51% ressalta a necessidade de implementar medidas de vigilância nos municípios de origem dos focos a fim de investigar a saúde animal do rebanho dos animais positivo, assim como a saúde dos trabalhadores, visto que a TBb é uma doença zoonótica que coloca em risco a saúde de pessoas que mantem contato com animais infectados.

O estudo destaca a necessidade de implementação de protocolos de diagnósticos capazes de detectar e confirmar a presença de *M. bovis*, como o qPCR, na rotina dos frigoríficos por se tratar de uma doença de caráter zoonótica e que atualmente é diagnóstica por método de inspeção visual através de lesões presuntivas de TBb. Esse método pode ser eficaz para impedir bovinos que apresentam lesões características de TBb, mesmo que erroneamente classificados com TBb como demonstrado pelo estudo, mas o risco ainda existe naqueles bovinos infectados que não apresentam alterações visíveis ou que apresentam lesões classificadas como adenite, como demonstrado no estudo por Flaminio (2019), que por vezes são alterações negligenciados pela fiscalização. A utilização da técnica além de permitir o diagnóstico preciso, evita prejuízos econômicos aos produtores e desclassificação do lote para exportação como o caso de importadores chineses.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- No período de julho de 2017 a dezembro de 2022, 1.772 bovinos apresentaram lesões sugestivas de TBb ao abate, correspondendo a uma prevalência de 0,21%.
- Quanto à origem desses animais condenados pela enfermidade, dos 78 municípios do estado, 66 desses obtiveram pelo menos um caso de TBb no Espírito Santo.
- A região sul possui municípios com maiores frequências de casos suspeitos de TBb, seguida da região central, metropolitana e norte.
- Das 74 amostras suspeitas de TBb submetidas ao qPCR, 38 (51%) foram positivas e 36 (48%) negativas para TBb.
- A prevalência de focos de TBb no frigorífico utilizado no estudo foi de 51%.
- A prevalência de TBb foi de 0,07% a partir das amostras sugestivas coletadas em frigorífico sob inspeção estadual no norte do Espírito Santo e submetidas ao diagnóstico confirmatório qPCR.

8 CONCLUSÃO

Os dados demonstraram que a tuberculose está presente nos animais abatidos nos frigoríficos estaduais localizados no Espírito Santo. A prevalência de TBb no estado com base em dados de frigoríficos estaduais foi de 0,21%, com frequências mais altas para os municípios da região sul. A prevalência de lesões positivas confirmadas através do qPCR das 74 amostras suspeitas foi 51% de amostras positivas e 48% negativas para TBb, focos esses distribuídos por vários municípios do estado. Esses resultados reforçam a necessidade de rastrear as propriedades focos e aplicar medidas de prevenção, controle e erradicação, por meio da implantação do PNCEBT. Além disso, a utilização de métodos mais eficazes nos diagnósticos, como o PCR, permite o diagnóstico preciso quanto ao patógeno envolvido, evitando perdas econômicas aos produtores e erros na identificação da doença.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, 2005. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5380/avs.v10i2.4409>
- ALMEIDA, A. C. *et al.* Determinação de perigos microbiológicos em carnes bovinas resfriadas provenientes de abates clandestinos e comércio ilegal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 4, p. 278-285, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.21708/avb.2010.4.4.1580>
- AMORIM, J. Q. *et al.* Isolamento e identificação molecular de *Mycobacterium bovis* em lesões teciduais de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos localizados no estado do Ceará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 74, p. 338-344, 2022.
- ANDREAZZA, D. *et al.* Caracterização histológica e imuno-histoquímica das lesões de tuberculose em bovinos e de linfadenite granulomatosa em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 129-136, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000200006>
- ASSUNÇÃO, E. F.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F. Prevalência de cisticercose e tuberculose bovina em frigorífico exportador de Campina Verde, MG. **PUBVET**, v. 8, p. 2292-2450, 2014, disponível em: <https://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v8n19.1783>
- BACANELLI, G. M. *et al.* Diagnóstico de tuberculose bovina. Avanços na identificação de *Mycobacterium bovis* por espectrometria de massas MALDI-TO 2020. Embrapa. Brasília (DF).2020. Disponível em: COT-146-Final-em-Alta.pdf (embrapa.br)
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Pecuária. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), Brasília, 2001.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Brasília, 2006.
- BRASIL, Decreto nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2020. Disponível em: D9013 (planalto.gov.br). Acessado em: 23 fevereiro 2023.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico Tuberculose 2022.Secretaria de Vigilância e Saúde**. Brasília (DF).2022. Disponível em: Boletim Epidemiológico de Tuberculose - Número Especial - março 2022. Ministério da Saúde (www.gov.br). Acessado em: 23 dezembro. 2022

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil** Brasília : Ministério da Saúde, 2022.

BAHIENSE, L. *et al.* Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3549-3559, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3549>.

BATISTA M. S.; CERQUEIRA R. B.; SOUZA, E. O.; GONÇALVES, V. P.; PEREZ, A.; ÁVILA, L. N. Identificação de focos de tuberculose bovina na Bahia a partir da vigilância em matadouros frigoríficos inspecionados. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 2, p. 67-67, 29 ago. 2016.

BEZERRA, H. T.; TELES, J. A. A.; FURTADO, G.D. Condições físicas e higiênico-sanitárias do abate clandestino em um município de Alagoas, Nordeste brasileiro. **Environmental Smoke**, v. 3, n. 3, p. 18-30, 2020.

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. **BMC public health**, v. 10, p. 1-12, 2010. Disponível em: [10.1186/1471-2458-10-462](https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-462)

CAMPOS, D. I. *et al.* Condenação de carcaças bovinas por tuberculose, brucelose e cisticercose em abatedouro-frigorífico de Uberaba-MG e métodos de diagnóstico de tuberculose em carcaças. 2019. **Tese (Doutorado) -Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1263>

CALEGARI, B. F. *et al.* Prevalência de *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos na região sul do Estado do Espírito Santo, Brasil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 1589-1594, 2020. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.34188/bjaerv3n3-075>

CARNEIRO, P. A. M *et al.* Epidemiological study of *Mycobacterium bovis* infection in buffalo and cattle in Amazonas, Brazil. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 434, 2019. DOI: [10.3389/fvets.2019.00434](https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00434)

CARVALHO, R. C. T.*et al.* Uso da Nested PCR em tempo real para o diagnóstico de tuberculose em carcaças bovinas. 2013.**Dissertação de (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cuiabá, Mato Grosso do Sul, 2013**.

CASTRO, J. F. P. Padronização da PCR em Tempo Real (qPCR) para diagnóstico de tuberculose bovina a partir de amostras de lesões sugestivas colhidas em abatedouros. 2022. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.2022**.

COSTA, A. F. Estudo retrospectivo da ocorrência de brucelose, tuberculose e cisticercose em bovinos abatidos em frigoríficos na zona da mata rondoniense. 2018.**Trabalho de conclusão de curso- Universidade Federal de Rondônia, Rolim de Moura, Rondônia, 2018**.

COSTA, P.M. N. **Diagnóstico molecular da tuberculose bovina**. 2009. Tese de Doutorado. FCT-UNL.

CLARO-ALMEA, F.E. *et al.* A rare case of spinal tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. Is zoonotic tuberculosis underdiagnosed. **IDCases**, v. 22, p. e00982, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00982>

COIMBRA, V.C. S. *et al.* **Registro de ocorrência de brucelose e tuberculose bovina e raiva dos herbívoros na região nordeste do brasil (2020-2021)**. Disponível em: 8jd1hbtdy1b4pne99Indjfovd46 (congresso.me). Acesso em 7 de março de 2023.

CFSPH – The Center for Food Security & Public Health. **Tuberculose bovina**. 2007, 7p. Disponível em: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pt/bovine-tuberculosis-PT.pdf>.

DA SILVA, D. A. V. *et al.* Identificação de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 2, p. 149-160, 2014.

GARCIA, S.M. *et al.* Epidemiologia da tuberculose bovina na América do Sul. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e8610917936-e8610917936, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.17936>

OLIVEIRA, S.J.A. *et al.* Estudo retrospectivo da tuberculose bovina no estado do Maranhão: 2013 a 2018. **Pubvet**, v. 14, p. 135, 2020.

DAVIDSON, J. A. *et al.* Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans in England, Wales, and Northern Ireland, 2002–2014. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 3, p. 377, 2017. Disponível em: 10.3201/eid2303.161408

RUA-DOMENECH, L.D.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, n. 2, p. 77-109, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002>

BARBIERI, J.M *et al.* Epidemiological status of bovine tuberculosis in the State of Minas Gerais, Brazil, 2013. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5Supl2, p. 3531-3548, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3531>

DE OLIVEIRA, I. A.S. *et al.* Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 395-400, 2007

DE ALMEIDA, R. F. C.; SOARES, C. O; DE ARAÚJO, F. R. **Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004., 2004.

DIAS, R. A. *et al.* Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3673-3683,

2016. Acesso em. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3673>

DOURADO, G. G. F. *et al.* Impacto econômico da condenação de carcaças por Tuberculose no Baixo Amazonas, Pará, Brasil. **Conjecturas**, v. 21, n. 6, p. 390-398, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.53660/CONJ-355-719>

DE VAL, B. P. *et al.* Polyresistant Mycobacterium bovis Infection in Human and Sympatric Sheep, Spain, 2017–2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 4, p. 1241, 2021. DOI: 10.3201/eid2704.204467

FILHO, J. H. H. G *et al.* Análise epidemiológica das condenações de bovinos por tuberculose em abatedouros do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 175-181, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p1752011>

FILHO, F. A *et al.* Identificação de Mycobacterium bovis em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1585-1591, 2014.

FERREIRA, F. F. *et al.* Isolation and genotyping of Mycobacterium bovis in suggestive lesions of tuberculosis in cattle slaughtered in the state of Ceará, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, p. 863-870, 2021. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6519

FURLANETTO, L.V. *et al.* 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.

FLAMINIO, A.P. Padronização e validação da técnica de pcr em tempo real para detecção de Mycobacterium bovis e Mycobacterium tuberculosis em linfonodos de bovinos. 2019.

GAROZI, G. P. *et al.* frequência de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no estado do espírito santo e perdas econômicas aos produtores. **Ars Veterinaria**, v. 38, n. 3, p. 94-97, 2022

GARCIA-SAENZ, A. *et al.* Estimation of the individual slaughterhouse surveillance sensitivity for bovine tuberculosis in Catalonia (North-Eastern Spain). **Preventive veterinary medicine**, v. 121, n. 3-4, p. 332-337, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.008>

GALVIS, J. O. A. *et al.* Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3567-3578, 2016. <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3567>

GREENE, C.E; GUNN-MOORE, D.A, 2015. **Infecções micobacterianas**, p.1069-1096. In: Greene C.E. (Ed.), Doenças infecciosas de cães e gatos. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

GONÇALVES, S. *et al.* Bovine Tuberculosis-Analysis of 10-year cases and impact of visual inspection in the surveillance at the slaughterhouse in Portugal. **One Health**, v. 15, p. 100451, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100451>

GUEDES, I. B. *et al.* Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3579-3588, 2016.

HOFFMANN, E. R. *et al.* Tuberculose em bovinos no noroeste do Espírito Santo. **PUBVET**, v. 16, p. 180, 2022.

HOMEM, V. S. F. Brucelose e tuberculose bovinas no município de Pirassununga, SP: prevalências, fatores de risco e estudo econômico. 2003. **Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.**

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivos dos rebanhos de grande porte em 31.12, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação - 2019**. Disponível em: <Tabela 3939: Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho (ibge.gov.br)>. Acessado em: 23 maio. 2021

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: **Estatística do Rebanho bovino no Brasil. Pecuária: 2021**. Brasília: IBGE, 2021. Disponível em: Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas) no Espírito Santo | IBGE. Acesso em 07 de março de 2023.

IDAF. Instituto De Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo. (Vitória, ES). **Caracterização da rede de trânsito animal**. Vitória, ES, 41p., 2021. Disponível em: Idaf - Trânsito Animal. Acesso: 15 de fevereiro de 2023.

JORGE, K. S. G. Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica. 2011. **Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande**, Mato Grosso do Sul, 2011.

JUNIOR, M. A. P. S. Diagnóstico de *Mycobacterium bovis* pela técnica de PCR em tempo real em lesões de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos sob inspeção federal. **Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Goiás, Goiana**, Goiás, 2012.

LAVAGNOLI, M. R.; AMORIM, B. M. de; MACHADO, G. P.; DEMONER, L. de C.; ZANINI, M. S.; ANTUNES, J. M. A. de P. Tuberculose em bovinos no Estado do Espírito Santo. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 71–78, 2023. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/1216>. Acesso em: 15 fev. 2023.

LIMA, D. A. R *et al.* Tuberculose bovina em parque safári no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6719>

LIMA, P. R. B. *et al.* Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Pernambuco, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3601-3609, 2016. <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3601>

LOPES, T. V.; SOUZA, J. G. S. G.; MAIFREDI, S. G.; ROSAS, F. M. P.; SOUZA, T. de A.; MUNIZ, I. M. .; APRIGIO, C. J. L. .; SCHONS, S. de V. .; SOUZA, F. A. . Prevalence of bovine tuberculosis in animals slaughtered in slaughterhouses that have a Federal Inspection Service (SIF) in the state of Rondônia, Brazil. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 13, p. e312101318636, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.18636. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18636>. Acesso em 7 março de 2023.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Instrução Normativa Nº 30 de agosto de 2013**. Disponível em: [in-30-2013.pdf \(wordpress.com\)](#). Acesso em 20 de março de 2021.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Inspeção de carne bovina. Padronização de técnicas, instalações e equipamentos**. Brasília (DF), 2007. Disponível em: Acesso em 20 de março de 2021.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Diagnóstico Situacional do Programa Nacional de Erradicação e Controle da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília (DF), 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt/DSPNCEBT.pdf>. Acesso em 10 de fevereiro de 2023.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Coordenação de Informação e Epidemiologia, distribuição temporal e espacial do número de casos de tuberculose bovina no Brasil desde 1999 a 2022, na espécie bovina**. Disponível em; MAPA Indicadores (agricultura.gov.br). Acesso em 07 de março de 2023.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Classificação das Unidades da Federação - 2022**. Disponível em: [ClassificaodasUFsout2020.pdf \(www.gov.br\)](#). Acessado em: 23 fevereiro 2023.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Instrução Normativa SDA 10, de 3 de março de 2017**. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), Brasília, 2020. Disponível em: [IN 10, de 3 de março de 2017 Aprova o regulamento técnico do PNCEBT alterado pela IN 11 2020 \(1\).pdf](#). Acesso em 10 de fevereiro de 2023.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Instrução Normativa 77, de 26 de novembro de 2018**. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial, Brasília, 2018. Disponível em: [INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 - Imprensa Nacional](#). Acesso em 10 de fevereiro de 2023.

MARQUES, M. E. O.; JUNIOR, J.F.M; ZAPPA, V. Controle da tuberculose bovina. **Rev. Cient. Elet. Med. Vet., São Paulo**, v. 6, n. 10, p. 1-5, 2008.

MARQUES, M. E. O.; JUNIOR, J.F.M; ZAPPA, V. Controle da tuberculose bovina. **Rev. Cient. Elet. Med. Vet., São Paulo**, v. 6, n. 10, p. 1-5, 2008. MURAKAMI, Patricia Sayuri *et al.* Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 12, n. 1, 2009.

MENDONÇA, J. D. *et al.* Caracterização molecular de agentes causadores de linfadenite em bovinos abatidos para consumo humano. **Salão do Conhecimento**, v. 8, n. 8, 2022.

MOHAMED, A. Bovine tuberculosis at the human–livestock–wildlife interface and its control through one health approach in the Ethiopian Somali pastoralists: A review. **One Health**, v. 9, p. 100113, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100113>

MURAKAMI, P. S., *et al.* Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 12, n. 1, p. 67-74, 2009.

NASCIMENTO, G. T. Prevalência e fatores de risco da tuberculose bovina Distrito Federal, Brasil, 2015. **Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília**, Distrito Federal, 2016.

NASCIMENTO, J. G. M. S. *et al.* Frequência de carcaças condenadas com lesões sugestivas de tuberculose bovina em abatedouro frigorífico em Santo Antônio de Jesus-Ba. 2017. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**, Bahia, 2017.

NETO, G.M. *et al.* Epidemiologia da tuberculose bovina no município de ibitirama-es em 2018. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 30, 2019. Disponível em: https://dx.doi.org/10.18677/encibio_2019b26

NETO, J. S.F, Barbosa, R. G., Ferreira, F., Amaku, M., Dias, R. A., Grisi-Filho, J. H. H., Gonçalves, V. S. P., Baquero, O. S., Machado, S. de T. Z., & Telles, E. O. (2021). Situação epidemiológica da tuberculose bovina no estado de Tocantins, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, 42(3Supl1), 1673–1684. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n3Supl1p1673>

NÉSPOLI, J.M.B. *et al.* Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3589-3599, 2016.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília**, [online], v. 33, p. 10-13, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>. Acesso em 12 de fevereiro de 2022.

O'CONNOR, C. M. *et al.* Cat-to-human transmission of *Mycobacterium bovis*, United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 12, p. 2284, 2019. DOI: 10.3201/eid2512.190012

OLEA-POPELKA, F. *et al.* Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*—a call for action. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. e21-e25, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6)

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Global Tuberculosis Report 2022**. Disponível em: [Global Tuberculosis Programme \(who.int\)](https://www.who.int/tb/global-tuberculosis-report-2022). >. Acessado em: 07 de fevereiro de 2023.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Global Tuberculosis Report 2021**. Disponível em: Global tuberculosis report 2021 (who.int). Acessado em: 07 de fevereiro de 2023.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Global Tuberculosis Report 2017**. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241565516>. Acessado em: 07 de fevereiro de 2023.

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

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, n. 6, p. 863-874, 2007

PASTER, B. K. *et al.* revalência de brucelose e tuberculose em carcaças bovinas inspecionadas pelo SIF de Rondônia no período de 2011 a 2020. **Fórum Rondoniense de Pesquisa**, v. 3, n. 8º, 2022.

PALACIOS, J. J., *et al.* Molecular and epidemiological population-based integrative analysis of human and animal *Mycobacterium bovis* infections in a low-prevalence setting. **Veterinary microbiology**, v. 195, p. 30-36, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.019>

PEDROSO, S.C.S. *et al.* Caracterização histopatológica, imunohistoquímica e determinação molecular de *Mycobacterium bovis* de lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos para consumo no estado do Amapá. **Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Belém, 2016**.

PICASSO, C. *et al.* Epidemiological investigation of bovine tuberculosis outbreaks in Uruguay (2011–2013). **Preventive veterinary medicine**, v. 138, p. 156-161, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.01.010>

QUEIROZ, M.R. *et al.* Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3647-3657, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3647>

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.p.102-110.

RAMOS, D. F. *et al.* BOVINE TUBERCULOSIS IN THE NORTH OF BRAZIL. **Science And Animal Health**, v. 8, n. 3, p. 188-203, 2020.DOI: 10.15210/sah.v8i3.18942

RAMOS, J. M.*et al.* Isolamento e identificação de *Mycobacterium* spp. em bovinos positivos no teste de tuberculinização. 2016. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campina Grande**, Campina Grande, 2016.

RIBEIRO, L. A. *et al.* Epidemiological status of bovine tuberculosis in the Federal District of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3561-3566, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3561>.

RIVERA, S.; GIMÉNEZ, J. F. La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinária**, v. 11, n. 9, p. 1-27, 2010

ROCHA, W. V. *et al.* Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Goiás, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3625-3638, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3625>

ROCHA, V. C. F. *et al.* Mycobacterium bovis como agente causal da tuberculose humana. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 10, n. 2/3, p. 22-31, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.36440/recmvz.v10i2/3.252>

ROCHA, B. B. *et al.* Prevalência e fatores associados ao consumo de queijo não pasteurizado entre pacientes com tuberculose de uma área urbana do Brasil. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.030>

ROXO, E. Tuberculose humana e animal. **CEP**, v. 4014, p. 002, 2008.

RUGGIERO, A. P. *et al.* Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 55-65, 2022. DOI: 10.1590/1808-1657v74p0552007

SALAZAR, F.H.P. Ocorrência de tuberculose causada por Mycobacterium bovis em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil. 2005. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande**. Mato Grosso do Sul, 2005.

SANTOS, E. S. V. *et al.* Spoligotyping, genotyping, and spatial distribution of Mycobacterium bovis in cattle in the state of Bahia, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, 2021. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6729

SANTOS, R. L; GUEDES, R.M.C. Capítulo 1: Sistema respiratório. IN: SANTOS, Renato de Lima; ALESSI, Antônio Carlos. **Patologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p.82-85.

SANTOS, T. L; JUNIOR, F.J.H. Atuação do médico veterinário na inspeção de carne suína e características observadas por consumidores no momento de comprar essa carne—revisão de literatura. **Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária) - Centro Universitário, Guanambi**. Bahia, 2021.

SICONELLI, M. J. L. *et al.* (2018). Difficulties in diagnosis of bovine tuberculosis in suggestive lesions. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, 40(1), e002518. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm002518>

SILVA, M.C.P *et al.* Prevalence and herd-level risk factors for bovine tuberculosis in the state of Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3611-3623, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3611>

SILVA, S. C. G. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, BACTERIOLÓGICA, HISTOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES PULMONARES SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE EM BOVINOS ABATIDOS NO MATADOURO PÚBLICO DE GARANHUNS-PE. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco**. Garanhuns, 2016.

SOUZA, M. A. *et al.* Exames complementares no diagnóstico da tuberculose em bovinos reagentes à tuberculinização comparada. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. e0592014, 2016.

TIVERON, D. V. Inspeção pós-morte de bovinos: ocorrência de alterações sanitárias no abate e respectivo impacto em relação ao mercado globalizado. 2014. **Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal** . São Paulo, 2014.

TIVERON, T. G. Incidência de linfadenopatia compatível com tuberculose em bovinos abatidos em frigorífico de exportação no período de 2007 a 2011. 2012. 71 f. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu**. São Paulo, 2012.

TEIXEIRA, J. N; GONÇALVES, M.F; DETTMANN, E. Prevalência de tuberculose em bovinos abatidos em município no estado do Espírito Santo e perdas econômicas aos produtores: Prevalence of tuberculosis in cattle slaughtered in municipality in the state of Espírito Santo and economic losses to producers. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 6, n. 1, p. 418-424, 2023. <https://doi.org/10.34188/bjaerv6n1-036>

VELOSO, F. P., *et al.* Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3659-3672, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3659>

VENDRAME, F. B. *et al.* Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3639-3646, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3639>

WATERS, W. R. *et al.* Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 159, n. 3-4, p. 113-132, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.02.009>

WANG, Y.; OAKES, J. M.; WELLS, S. J. Examining perceived risk to bovine tuberculosis through factorial survey to inform policymaking for zoonotic diseases control and surveillance. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 208, p. 105763, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105763>

WÜRFEL, Simone de Fátima Rauber¹ *et al.* Prevalência de tuberculose em matadouros-frigoríficos da região de Pelotas-RS no período de 2004 a 2008. **XI EMPOS I Amostra Científica. Pelotas-RS**, 2009.

ZHU, X. *et al.* An abattoir-based study on the prevalence of bovine tuberculosis from culled adult dairy cows in Wuhan, China. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 196, p. 105477, 2021. Disponível em:

**ANEXO A – TOTAL DE CONDECAOCOEAS SUSPEITAS DE TUBERCULOSE POR
MACRO REGIÃO DO ES**

TABELA 1 - Resultados do total de condenações por tuberculose bovina na região metropolitana do Estado do Espírito Santo no período de julho de 2017 a dezembro de 2022

Municípios	Número de Condenações
Afonso Cláudio	24
Brejatuba	1
Cariacica	24
Conceição do Castelo	13
Domingos Martins	10
Fundão	16
Guarapari	24
Itaguaçu	11
Itarana	5
Laranja da Terra	1
Santa Leopoldina	8
Santa Maria de Jetibá	4
Santa Teresa	1
Serra	16
Venda Nova do Imigrante	1
Viana	4
Vila Velha	1
TOTAL	164

Fonte: IDAF (2022)

TABELA 2 - Resultados do total de condenações por tuberculose bovina na região norte do Estado do Espírito Santo no período de julho de 2017 a dezembro de 2022

Município	Número de Condenações
Barra do são Francisco	5
Conceição da Barra	2
Ecoporanga	27
Jaguare	1
Nova Venécia	6
Montanha	28
Mucurici	8
Pinheiros	7
Ponto Belo	4
São Mateus	22
Vila Pavão	8
TOTAL	118

Fonte: IDAF (2022)

TABELA 3 - Resultados do total de condenações por tuberculose bovina na região sul do Estado do Espírito Santo no período de julho de 2017 a dezembro de 2022

Município	Número de Condenações
Alfredo chaves	2
Anchieta	120
Alegre	76
Apiacá	25
Atílio Vivácqua	95
Bom Jesus do Norte	15
Cachoeiro do Itapemirim	321
Castelo	62
Divino de São Lourenço	1
Dores do Rio Preto	3
Guaçuí	54
Ibatiba	11
Ibitirama	14
Iúna	1
Jerônimo Monteiro	62
Mimoso do Sul	31
Marataízes	1
Muniz Freire	55
Itapemirim	80
Iconha	7
Piúma	11
Muqui	24
Presidente Kennedy	81
Rio Novo do Sul	21
São José do Calçado	9
Vargem Alta	44
Total	1.226

Fonte: IDAF (2022)

TABELA 4 - Resultados do total de condenações por tuberculose bovina na região central do Estado do Espírito Santo no período de julho de 2017 a dezembro de 2022

Município	Número de Condenações
Aracruz	69
Baixo Guandu	14
Boa Esperança	3
Colatina	20
Governador Lindenberg	2
João Neiva	4
Linhares	100
Marilândia	13
São Roque do Cannã	25
Pancas	2
Sooretama	1
São Gabriel da Palha	11
TOTAL	264

Fonte: IDAF (2022)

Artigo Científico

Revista: Brazilian Journal of Animal and Environmental Research

Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigorífico sob sistema de inspeção estadual no Estado do Espírito Santo, Brasil

Occurrence of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in cattle slaughtered in a slaughterhouse under the state inspection system in the state of Espírito Santo, Brazil.

Jessica Nogueira Teixeira

Medica Veterinária

Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
FMVZ - Unesp – Botucatu.

Antônio Carlos Paes

Professor Titular

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ - Unesp – Botucatu.

Ana Paula Flaminio.

Graduanda no Programa de Pós-Doutorado em Medicina Veterinária
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ - Unesp – Botucatu.

RESUMO

A tuberculose bovina é uma zoonose causada pelo *Mycobacterium bovis*, uma doença crônica debilitante considerada uma das principais causas de morte por um único agente infeccioso e está entre as enfermidades infectocontagiosas com maior acometimento do rebanho bovino do mundo. O presente estudo objetivou determinar a prevalência TBb no estado do Espírito Santo mediante dados obtidos de abate de bovinos, dados da procedência dos focos com base na Guia de Trânsito Animal e realizar diagnóstico molecular em lesões caracterizadas como sugestivas da doença, a fim de confirmar a presença do agente *Mycobacterium bovis*. Para isso, obteve-se dados referentes ao abate de bovinos, de todos os frigoríficos sob Sistema de Inspeção Estadual, de julho de 2017 a dezembro de 2022 e coletadas amostras de bovinos de um frigorífico sob inspeção estadual para confirma a presença do *M. bovis* pelo qPCR, no período de novembro de 2022 a setembro de 2023. O total de bovinos abatidos no período supracitado foi de 861.849 animais, dos quais 1.772 (0,21%) apresentaram lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose e destinados à condenação total. Em relação a procedência dos animais, 66 municípios do

Espírito Santo tiveram pelo menos um caso de tuberculose. Quanto as 74 lesões sugestivas de tuberculose coletada na linha de inspeção de abate de bovinos, 38 (51%) foram confirmadas positivas pelo qPCR e 36 (48%) negativas, representando uma prevalência de 0,07% de tuberculose no frigorífico estudado. Esses resultados reforçam a necessidade de rastrear as propriedades focos e aplicar medidas de prevenção, controle e erradicação, por meio da implantação do PNCEBT.

Palavras-chave: lesões macroscópicas, epidemiologia, rastreabilidade, tuberculose zoonótica e reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*, a debilitating chronic disease considered one of the main causes of death from a single infectious agent and is among the most common infectious diseases affecting cattle in the world. The present study aimed to determine the prevalence of TBb in the state of Espírito Santo using data obtained from cattle slaughter, data on the origin of the outbreaks based on the Animal Transit Guide and to perform molecular diagnosis on lesions characterized as suggestive of the disease, in order to confirm the presence of the agent *Mycobacterium bovis*. To this end, data relating to the slaughter of cattle was obtained from all slaughterhouses under State Inspection System, from July 2017 to December 2022 and samples of cattle were collected from a slaughterhouse under state inspection to confirm the presence of *M. bovis* by qPCR, from November 2022 to September 2023. The total number of cattle slaughtered in the aforementioned period was 861,849 animals, of which 1,772 (0.21%) presented macroscopic lesions suggestive of tuberculosis and were destined for total condemnation. Regarding the origin of the animals, 66 municipalities in Espírito Santo had at least one case of tuberculosis. As for the 74 lesions suggestive of tuberculosis collected on the cattle slaughter inspection line, 38 (51%) were confirmed positive by qPCR and 36 (48%) negative, representing a prevalence of 0.07% of tuberculosis in the slaughterhouse studied. These results reinforce the need to track focus properties and apply prevention, control and eradication measures, through the implementation of the PNCEBT.

Keywords: macroscopic lesions, epidemiology, traceability, zoonotic tuberculosis and polymerase chain reaction.

INTRODUÇÃO

A tuberculose permanece como problema de saúde pública mundial. Estima-se que em 2021, aproximadamente 10,6 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose e 1,4 milhões morreram devido à doença (OMS, 2022). No Brasil, a enfermidade se apresenta como problema de saúde prioritário, tendo em vista que o país continua entre os 30 países com maiores prevalências da doença no mundo (Brasil, 2022). O Estado do Espírito Santo está entre as treze unidades federativas (UF) com maiores coeficientes de mortalidade para tuberculose humana, com 2,3 por 100.00 habitantes, e coeficiente de incidência de 30 por 100.000 habitantes (Brasil, 2022).

A tuberculose bovina, causada pelo agente etiológico *Mycobacterium bovis*, é uma doença crônica debilitante considerada a principal causa de morte por um único agente infeccioso (Tiveron, 2012). Classificadas como gram-positivas, embora, devido ao alto

conteúdo de ácido micólico e de lipídeos na sua parede celular, a entrada de corantes empregados na técnica de coloração de Gram são impedidas (Paes; Franco, 2016).

A primeira iniciativa para controlar a doença foi realizada em 1999 pela Associação Brasileira de Buiatria. Em 2001, foi deflagrado em bovinos e búfalos o Programa de controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), com o objetivo de reduzir a incidência e prevalência das enfermidades, almejando a erradicação. Além disso, o programa visa aumentar a competitividade dos produtos de origem bovina e bubalina para o mercado externo e promover a qualidade dos produtos de origem animal (Brasil, 2006; Carneiro et al., 2019).

Em 2017, o programa foi alterado e as novas atualizações passaram a classificar os estados da federação quanto ao grau de risco para tuberculose animal e brucelose (Instrução Normativa SDA 10/2017- alterada pela Instrução Normativa 11/2020), atribuindo ao estado do Espírito Santo em uma escala de A a E, o grau “D” para tuberculose com prevalência de focos igual ou maior que 6% e “C” para brucelose, com prevalência de foco maior ou igual a 5% e menor que 10% (MAPA, 2020).

O diagnóstico da enfermidade pode ser realizado de forma direta ou indireta, por métodos clínicos, anatomopatológicos ou laboratoriais (Filho et al., 2017). O diagnóstico definitivo consiste no isolamento do agente etiológico por meio da cultura microbiológica, considerada a técnica padrão-ouro (Bacanelli et al., 2020). A inspeção sanitária em frigoríficos é realizada em estabelecimentos com serviço de inspeção oficial por médicos veterinários (MAPA, 2007). As lesões identificadas nos bovinos com tuberculose apresentam coloração amarelada, nódulos de 1 a 3 cm de diâmetro, de aspecto purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar necrose de caseificação no centro da lesão> No entanto As lesões provocadas por *M. bovis* não são patognômicas e sim sugestivas da doença, necessitando de diagnóstico para confirmação (Brasil, 2006).

Dentre as possibilidades de diagnóstico que confirme a presença do agente etiológico na lesão de tuberculose bovina, O PCR em Tempo Real, permite determinar valores durante a fase exponencial da reação, possibilitando quantificar fragmentos de DNA e RNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade (Novais e Alves, 2004). O diagnóstico molecular possui vantagens em relação aos outros métodos, como por exemplo, os resultados podem ser fornecidos em períodos de 24-48 horas, sendo considerados rápidos, seguros, decisivos e econômicos (FLAMINIO, 2019).

Existem poucos estudos com informações sobre prevalência e distribuição da TBb no Espírito Santo, utilizando dados provenientes da vigilância em frigoríficos. Desta forma, o

presente estudo teve por objetivos estimar a prevalência de TBb nas diferentes regiões do estado, utilizando dados de bovinos abatidos em frigoríficos estaduais no período de julho de 2017 a dezembro de 2022. Além disso, utilizar o diagnóstico molecular para confirmar a presença do agente em amostras sugestivas de TBb coletadas em frigorífico e rastrear os municípios de origem dos focos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, sob número 0101/2022.

A presente pesquisa foi conduzida no Estado do Espírito Santo utilizando o total de nove abatedouros- frigoríficos de bovinos com cadastro ativo no Serviço de Inspeção Estadual (SIE). Os abatedouros estão localizados nos municípios de Atílio Vivácqua, Cachoeiro do Itapemirim, Muniz Freire, Montanha, Guaçuí, Fundão, Anchieta e Colatina. Dos estabelecimentos supracitados foram obtidos os mapas nosográficos da relação de abate no período de julho de 2017 a dezembro de 2022. Esses dados foram obtidos na Subgerência de Fiscalização de Produtos de Origem Animal (SIFP) do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF).

Após a análise dos mapas nosográficos, os animais que apresentaram lesões sugestivas de TBb durante a inspeção *post mortem* nos frigoríficos, tiveram a Guia de Trânsito Animal (GTA) consultada, com a finalidade de se obter a origem desses animais, localizando assim o município de origem. As regiões foram divididas em quatro macrorregiões de planejamento, de acordo com a Secretaria de Economia e Planejamento do Governo do Estado do Espírito Santo, em região Metropolitana, Norte, Sul e Central.

A coleta de amostras de lesões sugestivas de TBb foi realizada de novembro de 2022 a setembro de 2023. Durante o período foram coletadas amostras sugestivas de TBb de todos os animais, que durante a linha de inspeção, apresentaram qualquer lesão sugestiva de TBb, classificadas de acordo com (RIISPOA), de acordo com o artigo 171, ou lesões identificadas como linfadenite. Esse regulamento caracteriza como lesão sugestiva de TBb, aquelas que apresentam em suas carcaças e/ou vísceras, lesões tuberculóides, lesões caseosas ou calcificadas, lesões com necrose de liquefação ou presença de tubérculos jovens, lesões miliares ou linfonodos hipertrofiados, edemaciado com caseificação de aspecto raiado ou estrelado.

Após as coletadas, foi realizado uma visita no estabelecimento para recolher o material congelado e encaminhá-los por meio de caixa isotérmica com gelo para a Gerência de Diagnóstico Laboratorial do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do ES (GEDLAB/IDAF), onde permaneceram até o envio para o Laboratório de Microbiologia do

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da UNESP, Campus de Botucatu (SP) para o diagnóstico molecular.

As amostras foram submetidas ao diagnóstico molecular, reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real). O protocolo de coleta, extração e amplificação do DNA alvo para o *Mycobacterium bovis* utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi realizado de acordo com o descrito na tese de doutorado de Flaminio (2019) e adaptado conforme literatura citada por Dykema et al. (2016) e USDA (2018), incluiu a sonda TB 100 PROBE desenhada (sob patente nº 102021018832). O sistema de reagentes para as amplificações utilizado foi o *VetMAX™-Plus qPCR Master Mix (Applied Biosystems™ - Thermo Fisher, EUA)*. As concentrações e a temperatura foram definidas de acordo com as instruções do fabricante e foram realizadas modificações no protocolo para melhorar a sensibilidade e especificidade analítica do teste conforme descritas em Flaminio (2019). Todas as reações de qPCR relatadas neste estudo foram realizadas em volumes totais de reação de 20 µl: 10 µl *VetMAX™-Plus qPCR Master Mix (Applied Biosystems™ - Thermo Fisher, EUA)*, 1 µl *primer F*, 1 µl *primer R* e 1 µl sonda, 2 µl de água *nuclease free* e 5 µl de amostra de DNA extraído e purificado.

A mistura reacional foi inicialmente incubada a 50 °C por 2 minutos, depois a 95 °C por 10 minutos. A amplificação ocorreu em 40 ciclos: desnaturação a 95 °C por 15 segundos, e recozimento/extensão a 60 °C por 60 segundos. A reação de qPCR foi realizada em um sistema de qPCR *Step One™* com o software *StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems)*.

RESULTADOS

O número de bovinos abatidos durante o período de julho de 2017 a dezembro de 2022 foi de 861.849 bovinos. Desse total, foram verificadas durante o exame post-mortem presença de lesões sugestivas de TBb em 1.772 carcaças, correspondendo a uma frequência percentual de 0,21% nos anos pesquisados

As Guias de Trânsito Animal (GTA) possibilitaram a localização de propriedades rurais e municípios de origem dos bovinos abatidos. Ao consultar as informações sobre os municípios de origem dos animais que apresentaram lesões sugestivas de TBb durante o abate, os 1.772 animais condenados eram provenientes de 66 municípios do estado do Espírito Santo.

Entre as regiões que apresentaram casos de condenações por TBbdurante a inspeção em abatedouros- frigoríficos de bovinos, os municípios pertencentes a região sul, apresentou maior índice de rejeição de animais, apresentando um total de 1.226 animais condenados, correspondendo a uma prevalência de 0,14%. A segunda região com maior frequência foi a

central com 264 condenações, resultando em prevalência de 0,03%. Seguido da região metropolitana com 164 descartes e prevalência de 0,02% e região norte com 118 condenações e prevalência de 0,001%.

Foram constatadas lesões de TBb em bovinos abatidos nas quatro regiões de estudo, com diferenças significativas em relação ao número de bovinos com essas lesões por região.

As amostras identificadas por meio da inspeção visual que apresentaram lesões com nódulos granulomatosos de aspecto purulento ou caseoso, com presença de capsula fibrosa ou presença de calcificação no centro da lesão, foram coletadas e submetidas ao diagnóstico molecular. Dentre as 74 amostras de bovinos com lesões sugestivas de TBb no estado do Espírito Santo, 38 amostras foram positivas para tuberculose (51%) e 36 (48%) negativas no qPCR.

A prevalência de TBb no frigorífico utilizado na pesquisa após o resultado confirmatório das lesões sugestivas pelo qPCR foi de 0,07%, considerando que no período de novembro de 2022 a setembro de 2023 foram abatidos 56.397 animais. Entre os municípios com amostras confirmadas pelo PCR, Linhares, Cachoeiro, Serra e Colatina, obtiveram maior índice.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a prevalência de tuberculose nos bovinos abatidos no Espírito Santo, baseados nos dados dos frigoríficos fiscalizados pelo SIE, foi de 0,21%. Este resultado é equivalente ao reportado por Calegari *et al.* (2020), que ao inspecionar 26 mil bovinos abatidos em frigorífico sob supervisão estadual no sul do Espírito Santo, obteve prevalência de 0,24 %. E por Paoli *et al.* (2013) com prevalência de tuberculose ao abate de 0,23%. No entanto, superior ao relatado por Assunção *et al.* (2014) que de 72.434 bovinos abatidos em Campina Verde, Minas Gerais, no ano de 2013, 74 animais foram condenados por tuberculose, correspondendo a uma prevalência de 0,10%.

A frequência de TBb descritas no Espírito Santo utilizando vigilância em frigoríficos são escassas, estudo por Hoffmann *et al.* (2022) no noroeste do Espírito Santo, que ao examinar 26.406 bovinos durante o abate. E Garozi *et al.* (2022) observaram prevalência de 0,0076% entre 2019 e 2021, em frigorífico localizado no Espírito Santo.

No Brasil, prevalências de TBb vêm sendo relatadas pelos estados brasileiros, como descrito por Carvalho *et al.* (2013) no Mato Grosso, após inspecionar 41.193 carcaças bovinas, no período de maio a outubro de 2009, obteve-se 198 (0,48%) animais com lesões suspeitas de TBb. Em São Paulo, Silva *et al.* (2014), ao avaliar 38.172 bovinos, a incidência foi de 0,16% de lesões sugestivas de TBb caseosa e 0,11% de lesões sugestivas de tuberculose calcificada.

Assim como, Rondônia e Pará com prevalências de 0,005 % e 0,006%, respectivamente (PASTER *et al.*, 2022; DOURADO *et al.*, 2018).

As GTA'S possibilitaram a localização de propriedades rurais e municípios de origem dos bovinos abatidos, os casos de TBb estavam distribuídos em 66 municípios. A movimentação de animais em uma rede de propriedades é um dos principais fatores de dispersão de doenças no rebanho, utilizadas para planejar medidas de vigilância epidemiológica e para obter informações necessárias para desenvolver planos de prevenção.

Wang *et al.* (2022) descrevem a movimentação de bovinos como um dos principais fatores de risco para TBb. O trânsito de animais entre propriedades rurais favorece a introdução e disseminação de agentes infecciosos nos rebanhos. Desta forma, as propriedades que recebem animais provenientes de diferentes origens e/ou os enviem para diferentes destinos podem desempenhar um papel central na introdução e disseminação de doenças dentro de uma rede de trânsito animal (IDAF, 2021).

Em 2020, 882.759 bovinos e bubalinos transitaram entre propriedades no Estado, sendo essas espécies responsáveis por mais da metade do trânsito interestadual no estado. Os municípios de Mucurici, Linhares, Montanha, Colatina e Cachoeiro do Itapemirim foram considerados regiões com maior vulnerabilidade, em relação a entrada de agentes contagiosos, via movimentação de animais. Principalmente, os três últimos, por possuírem abatedouros localizados em seu território (IDAF, 2021).

Os resultados das condenações por municípios, demonstraram que as regiões metropolitana e norte apresentaram menores índices de casos no Estado. Esse fato pode ser relacionado com o tipo de propriedades que predominam nessas regiões, pois a maioria possui características de gado de corte (IDAF, 2020), autores como (ABRAHÃO *et al.*, 2005) relatam que gado de corte tendem a apresentar menor prevalência quando comparados ao gado de leite, devido o tipo de criação ser em sistema extensivos e por serem abatidos precocemente. Desta forma, a região sul, por predominar propriedades com aptidão leiteira, observou-se maior índice de condenações com origem desses municípios.

A distribuição espacial dos casos de TBb descrita pela autora Paoli *et al.* (2013) indicou que dos 78 municípios do Espírito Santo, 52 (66,7%) apresentaram pelo menos um bovino com lesões sugestivas ao abate. Contudo, dados referentes aos animais amostrados, demonstraram resultados superiores, indicando que 66 (84,7%) dos municípios apresentaram pelo menos um caso de tuberculose bovina. Segundo estudo de Hoffmann *et al.* (2022) os casos de condenações por TBb no Espírito Santo, estavam distribuídas principalmente nos municípios de Colatina (33,33%) e Linhares com (23,83%). Teixeira *et al.* (2022) descreveram a prevalência de 0,80%

para TBb em frigorífico no sul do Espírito Santo. Dentre os municípios mencionados, Cachoeiro do Itapemirim apresentou maior índice de casos, assemelhando-se ao presente trabalho.

Um dos principais desafios da epidemiologia de *M. bovis* frente a erradicação da TBb é a definição da fonte de infecção e da rota de transmissão (ROCHA *et al.*, 2012). Em 2020, 20.497 bovinos entraram no Espírito Santo com origem de outras unidades federativas, como Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, com destino a 57 municípios do Espírito Santo (IDAF, 2021). Conhecer a classificação dos estados, quanto o grau de risco, e obter informações sobre a epidemiologia e o rastreamento da doença em cada estado, permite que os produtores adquiram animais de propriedade e regiões certificadas livres para TBb ou controlada

A confirmação do diagnóstico para TBb das amostras sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos em um frigorífico no Espírito Santo, analisadas por meio da técnica de qPCR, resultou em 38 amostras positivas (51%) e 36 amostras negativas (48%), das 74 amostras coletadas com alterações macroscópicas sugestivas da doença. Em estudo conduzido por Hoffmann *et al.* (2022) no mesmo estado, dentre 31 (0,12%) amostras de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, 24 (77,42%) foram positivas e 7 (22,58%) negativas por meio do PCR. Flaminio (2019) no Centro-Oeste do Estado de São Paulo, relata que de 30 lesões suspeitas de tuberculose coletadas em frigoríficos federais, 24 (80%) foram confirmados positivos para *M. bovis* e /ou *M. tuberculosis* e 6(20%) foram confirmadas negativas.

Resultados diferentes da presente pesquisa, no que se refere a quantidade de amostras positivas em relação as negativas, foram encontradas por Amorim *et al.* (2022) no Ceará que das 44 lesões sugestivas de tuberculose, 7(15,9%) foram positivas e 37 (84,09%) negativas. Carvalho *et al.* (2013) em estudo no Mato Grosso, obteve das 198 amostras, uma prevalência de 28(14,14%) casos positivos e 170 (85,86%) negativos. Castro *et al.* (2022) das 167 lesões de frigoríficos de Santa Catarina e Mato grosso, 73(43,71%) foram positivas e 94 (56,28%) negativas. Costa *et al.* (2020) que de 43 amostras, 7 (16,28%) positivas e 36 (83,7%) negativas. Almeida (2021), em 12 (3,9%) amostras isoladas no meio seletivo de Stonebrink-Leslie, 8(2,65%) obtiveram confirmação de *M. bovis* por meio do PCR. Os resultados óbitos nesses trabalhos, demonstram que a porcentagem de lesões sugestivas positivas no PCR são, na sua maioria, menores do que os casos negativos.

A prevalência de TBb no frigorífico utilizado no estudo foi de 0,07%. Ressalta-se que a diferença na detecção de lesões sugestivas entre os frigoríficos de abate de bovinos, depende

do tempo disponível para examinar a carcaça e o tempo de experiência do fiscal responsável. Desta forma, as quantidades de condenação variam entre frigoríficos em diferentes regiões.

Destaca-se com esses resultados descritos na literatura que os animais condenados com suspeita de TBb pela inspeção visual não são diagnósticos precisos. Souza *et al.* (2016) em estudo demonstrou que a inspeção macroscópica não detectou lesões sugestivas em 45% das carcaças. Diversos fatores podem influenciar nesse resultado, como estágio da doença, contato dos animais com outras micobactérias, pequena quantidade de bacilo no tubérculo, entre outros. Desta forma, a utilização de técnicas como o qPCR apresenta vantagens em relação a outros meios de diagnóstico. Uma das vantagens do qPCR é o tempo de processamento, em até 24-48 horas, quando comparado a cultura bacteriológica, ainda considerada padrão ouro no diagnóstico, que apresenta resultados entre 60 a 90 dias. Além disso, o qPCR apresenta maior rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade quando comparada ao PCR convencional (FLAMINIO, 2019; CASTRO, 2022).

Filho *et.al* (2014), ressalta a importância da associação do exame *post mortem* com o PCR na identificação da TBb, em seu estudo a utilização da técnica permitiu identificar o agente da doença no estado da Bahia de forma rápida e em regiões onde o *status* sanitário era de baixa prevalência.

A imprecisão da inspeção visual das lesões característica de TBb ocorre, pois, lesões granulomatosas em bovinos durante a linha de abate causadas por agentes como, *Trueperella pyogenes*, *Rhodococcus equi*, *Nocardia spp* e actinomicetos aeróbicos não são distinguíveis das micobactérias pela avaliação das lesões macroscópicas, tornando-se necessário a realização do diagnóstico diferencial em bovinos suspeitos de TBb (ALMEIDA, 2021). Como demonstrado no estudo, 36 (48%) amostras caracterizadas como lesões sugestivas de TBb foram negativas pela técnica qPCR, nesses casos os envolvimento desses outros agentes bacterianos podem ter causado lesões semelhantes ao *M. bovis* resultando em equívocos na inspeção visual. Entretanto, mesmo diante dos erros na condenação dos bovinos, a lei regulamenta que em casos de dúvida e/ou presença de lesões com necrose de caseificação ou nódulos granulomatosos, os mesmos sejam descartados como forma de prevenção e controle da doença.

O percentual de resultados positivos de 51% ressalta a necessidade de implementar medidas de vigilância nos municípios de origem dos focos a fim de investigar a saúde animal do rebanho dos animais positivo, assim como a saúde dos trabalhadores, visto que a TBb é uma doença zoonótica que coloca em risco a saúde de pessoas que mantêm contato com animais infectados.

O estudo destaca a necessidade de implementação de protocolos de diagnósticos capazes de detectar e confirmar a presença de *M. bovis*, como o qPCR, na rotina dos frigoríficos por se tratar de uma doença de caráter zoonótica e que atualmente é diagnóstica por método de inspeção visual através de lesões presuntivas de TBb. Esse método pode ser eficaz para impedir bovinos que apresentam lesões características de TBb, mesmo que erroneamente classificados com TBb como demonstrado pelo estudo, mas o risco ainda existe naqueles bovinos infectados que não apresentam alterações visíveis ou que apresentam lesões classificadas como adenite, como demonstrado no estudo por Flaminio (2019), que por vezes são alterações negligenciados pela fiscalização. A utilização da técnica além de permitir o diagnóstico preciso, evita prejuízos econômicos aos produtores e desclassificação do lote para exportação como o caso de importadores chineses.

CONCLUSÃO

Os dados demonstraram que a tuberculose está presente nos animais abatidos nos frigoríficos estaduais localizados no Espírito Santo. A prevalência de TBb no estado analisando os dados de frigoríficos estaduais foi de 0,21%, com destaque para os municípios da região sul com maiores frequências de casos. A prevalência de casos confirmados através do qPCR das 74 amostras analisadas foi 51% de amostras positivas e 48% negativas para TBb, focos esses distribuídos por vários municípios do estado. Esses resultados reforçam a necessidade de rastrear as propriedades focos e aplicar medidas de prevenção, controle e erradicação, por meio da implantação do PNCEBT. Além disso, a utilização de métodos mais eficazes nos diagnósticos, como o PCR, permite o diagnóstico preciso quanto ao patógeno envolvido, evitando perdas econômicas aos produtores e erros na identificação da doença.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, 2005. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5380/avs.v10i2.4409>
- ALMEIDA, A. C. *et al.* Determinação de perigos microbiológicos em carnes bovinas resfriadas provenientes de abates clandestinos e comércio ilegal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 4, p. 278-285, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.21708/avb.2010.4.4.1580>
- AMORIM, J. Q. *et al.* Isolamento e identificação molecular de *Mycobacterium bovis* em lesões teciduais de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos localizados no estado do Ceará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 74, p. 338-344, 2022.
- ASSUNÇÃO, E. F.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F. Prevalência de cisticercose e tuberculose bovina em frigorífico exportador de Campina Verde, MG. **PUBVET**, v. 8, p. 2292-2450, 2014, disponível em: <https://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v8n19.1783>
- BACANELLI, G. M. *et al.* Diagnóstico de tuberculose bovina. Avanços na identificação de *Mycobacterium bovis* por espectrometria de massas MALDI-TO 2020. Embrapa. Brasília (DF).2020. Disponível em: [COT-146-Final-em-Alta.pdf \(embrapa.br\)](https://www.embrapa.br/cot-146-final-em-alta.pdf)
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Pecuária. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), Brasília, 2001.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Brasília, 2006.
- BRASIL, Decreto nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2020. Disponível em: [D9013 \(planalto.gov.br\)](https://www.planalto.gov.br/d9013). Acessado em: 23 fevereiro 2023.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico Tuberculose 2022. Secretaria de Vigilância e Saúde**. Brasília (DF).2022. Disponível em: Boletim Epidemiológico de Tuberculose - Número Especial - março 2022. Ministério da Saúde (www.gov.br). Acessado em: 23 dezembro. 2022
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil Brasília** : Ministério da Saúde, 2022.
- CALEGARI, B. F. *et al.* Prevalência de *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos na região sul do Estado do Espírito Santo, Brasil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 1589-1594, 2020. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.34188/bjaerv3n3-075>

CARNEIRO, P. A. M *et al.* Epidemiological study of Mycobacterium bovis infection in buffalo and cattle in Amazonas, Brazil. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 434, 2019. DOI: [10.3389/fvets.2019.00434](https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00434)

CARVALHO, R. C. T. *et al.* Uso da Nested PCR em tempo real para o diagnóstico de tuberculose em carcaças bovinas. 2013. **Dissertação de (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cuiabá**, Mato Grosso do Sul, 2013.

CASTRO, J. F. P. Padronização da PCR em Tempo Real (qPCR) para diagnóstico de tuberculose bovina a partir de amostras de lesões sugestivas colhidas em abatedouros. 2022. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2022.**

COSTA, A. F. Estudo retrospectivo da ocorrência de brucelose, tuberculose e cisticercose em bovinos abatidos em frigoríficos na zona da mata rondoniense. 2018. **Trabalho de conclusão de curso- Universidade Federal de Rondônia, Rolim de Moura**, Rondônia, 2018.

DOURADO, G. G. F. *et al.* Impacto econômico da condenação de carcaças por Tuberculose no Baixo Amazonas, Pará, Brasil. **Conjecturas**, v. 21, n. 6, p. 390-398, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.53660/CONJ-355-719>

FILHO, F. A *et al.* Identificação de Mycobacterium bovis em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1585-1591, 2014.

FLAMINIO, A.P. Padronização e validação da técnica de pcr em tempo real para detecção de Mycobacterium bovis e Mycobacterium tuberculosis em linfonodos de bovinos. 2019.

GAROZI, G. P. *et al.* frequência de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no estado do espírito santo e perdas econômicas aos produtores. **Ars Veterinaria**, v. 38, n. 3, p. 94-97, 2022

GALVIS, J. O. A. *et al.* Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3567-3578, 2016. <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3567>

HOFFMANN, E. R. *et al.* Tuberculose em bovinos no noroeste do Espírito Santo. **PUBVET**, v. 16, p. 180, 2022.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivos dos rebanhos de grande porte em 31.12, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação - 2019**. Disponível em: <[Tabela 3939: Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho \(ibge.gov.br\)](https://tabela3939.ibge.gov.br)>. Acessado em: 23 maio. 2021

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: **Estatística do Rebanho bovino no Brasil. Pecuária: 2021**. Brasília: IBGE, 2021. Disponível em: [Rebanho de Bovinos \(Bois e Vacas\) no Espírito Santo | IBGE](#). Acesso em 07 de março de 2023.

IDAF. Instituto De Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo. (Vitória, ES). **Caracterização da rede de trânsito animal**. Vitoria, ES, 41p., 2021. Disponível em: [Idaf - Trânsito Animal](#). Acesso: 15 de fevereiro de 2023.

LAVAGNOLI, M. R.; AMORIM, B. M. de; MACHADO, G. P.; DEMONER, L. de C.; ZANINI, M. S.; ANTUNES, J. M. A. de P. Tuberculose em bovinos no Estado do Espírito Santo. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 71–78, 2023. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/1216>. Acesso em: 15 fev. 2023.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Inspeção de carne bovina. Padronização de técnicas, instalações e equipamentos**. Brasília (DF), 2007. Disponível em: Acesso em 20 de março de 2021.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Diagnóstico Situacional do Programa Nacional de Erradicação e Controle da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília (DF), 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt/DSPNCEBT.pdf>. Acesso em 10 de fevereiro de 2023.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Coordenação de Informação e Epidemiologia, distribuição temporal e espacial do número de casos de tuberculose bovina no Brasil desde 1999 a 2022, na espécie bovina**. Disponível em; [MAPA Indicadores \(agricultura.gov.br\)](http://agricultura.gov.br). Acesso em 07 de março de 2023.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. **Classificação das Unidades da Federação - 2022**. Disponível em: [ClassificaodasUFsout2020.pdf \(www.gov.br\)](http://www.gov.br). Acessado em: 23 fevereiro 2023.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Instrução Normativa SDA 10, de 3 de março de 2017**. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), Brasília, 2020. Disponível em: [IN 10, de 3 de março de 2017 Aprova o regulamento técnico do PNCEBT alterado pela IN 11 2020 \(1\).pdf](http://www.gov.br). Acesso em 10 de fevereiro de 2023.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Instrução Normativa 77, de 26 de novembro de 2018**. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial, Brasília, 2018. Disponível em: [INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 - Imprensa Nacional](http://www.gov.br). Acesso em 10 de fevereiro de 2023.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília**, [online], v. 33, p. 10-13, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>. Acesso em 12 de fevereiro de 2022.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Global Tuberculosis Report 2022**. Disponível em: [Global Tuberculosis Programme \(who.int\)](http://www.who.int).)>. Acessado em: 07 de fevereiro de 2023.

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

PASTER, B. K. *et al.* revalência de brucelose e tuberculose em carcaças bovinas inspecionadas pelo sif de Rondônia no período de 2011 a 2020. **Fórum Rondoniense de Pesquisa**, v. 3, n. 8º, 2022.

ROCHA, V. C. F. *et al.* Mycobacterium bovis como agente causal da tuberculose humana. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 10, n. 2/3, p. 22-31, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.36440/recmvz.v10i2/3.252>

SILVA, M.C.P *et al.* Prevalence and herd-level risk factors for bovine tuberculosis in the state of Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3611-3623, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5Supl2p3611>

SOUZA, M. A. *et al.* Exames complementares no diagnóstico da tuberculose em bovinos reagentes à tuberculinização comparada. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. e0592014, 2016.

TIVERON, T. G. Incidência de linfadenopatia compatível com tuberculose em bovinos abatidos em frigorífico de exportação no período de 2007 a 2011. 2012. 71 f. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu**. São Paulo, 2012.

TEIXEIRA, J. N; GONÇALVES, M.F; DETTMANN, E. Prevalência de tuberculose em bovinos abatidos em município no estado do Espírito Santo e perdas econômicas aos produtores: Prevalence of tuberculosis in cattle slaughtered in municipality in the state of Espírito Santo and economic losses to producers. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 6, n. 1, p. 418-424, 2023. <https://doi.org/10.34188/bjaerv6n1-036>

WANG, Y.; OAKES, J. M.; WELLS, S. J. Examining perceived risk to bovine tuberculosis through factorial survey to inform policymaking for zoonotic diseases control and surveillance. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 208, p. 105763, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105763>