

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/08/2021.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL
PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium
tuberculosis* EM LINFONODOS DE BOVINOS**

ANA PAULA FLAMINIO

BOTUCATU
AGOSTO 2019



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL
PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium
tuberculosis* EM LINFONODOS DE BOVINOS**

ANA PAULA FLAMINIO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de Botucatu - SP, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

Co-orientadora: Dr^a. Érica Chimara

BOTUCATU
AGOSTO 2019

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Flaminio, Ana Paula.

Padronização e validação da técnica de PCR em tempo real para detecção de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* em linfonodos de bovinos / Ana Paula Flaminio.
- Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Antonio Carlos Paes

Coorientador: Érica Chimara

Capes: 50502034

1. Bovino - Doenças - Diagnóstico. 2. Tuberculose.
3. *Mycobacterium bovis*. 4. Diagnóstico. 5. Zoonose. 6. Reação em cadeia da polimerase.

Palavras-chave: Diagnóstico; *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium tuberculosis*; PCR em tempo real; Tuberculose bovina.

Nome do Autor: Ana Paula Flaminio

Título: PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* EM LINFONODOS DE BOVINOS

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Antonio Carlos Paes - Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina e Zootecnia (FMVZ) – UNESP, Campus de Botucatu

Prof^o Dr. João Pessoa Araújo Júnior – Membro titular

Departamento de Biotecnologia Molecular e Virologia

Instituto de Biotecnologia – IBTEC - Faculdade de Medicina e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu

Prof^o Dr. Hélio Langoni – Membro titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina e Zootecnia (FMVZ) – UNESP, Campus de Botucatu

Prof^o Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza - Membro titular

Departamento Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) - UNESP, Campus de Botucatu

Prof^o Dr. Rogério Giuffrida - Membro titular

Departamento de Ciência Animal

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente - Campus II

Prof^o Dr. Ricardo de Souza Cavalcante - Membro suplente

Departamento Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem

Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) - UNESP, Campus de Botucatu

Prof^o Dr. Rodrigo Costa da Silva - Membro suplente

Departamento de Ciências Agrárias

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente - Campus II

Prof^o Dra. MARIANA VAZ RODRIGUES – Membro suplente
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências – IB - UNESP, Campus de Botucatu

Data da Defesa: 26 de agosto de 2019.

“Seja aquele que fortalece e constrói. Seja aquele que tem um coração compreensivo e perdoador. Seja aquele que vê o melhor nas pessoas. Ao partir, deixe as pessoas melhores do que as encontrou”

Marvin Jeremy Ashton

DEDICATÓRIA

A Deus, nosso eterno e grandioso Pai, por me permitir viver tantas alegrias e milagres.

À minha mãe Marisa por seu amor incondicional, alegria, companhia, amizade, direção e exemplo de bondade e gratidão. Você me ensinou o verdadeiro sentido da palavra generosidade e gratidão, obrigada. Sem você esse sonho não seria possível. Todos os aplausos em minha vida são para você. Te amo.

Ao meu pai Edson por seu amor, retidão e conselhos que formaram meu caráter. Te amo.

Ao meu irmão Walter e sua família linda, que mesmo longe sempre me apoiaram e se fizeram presente em minha vida. Amo vocês.

Ao meu filho Thales por todo amor, carinho e compreensão. Você é a melhor parte de mim. Te amo muito!

Aos meus avós, Walter e Anna Maria (*in memoriam*), meus exemplos de amor, honestidade, respeito, união e persistência. Eles me ensinaram o verdadeiro sentido da palavra família. Saudades.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento e estudo deste projeto de pesquisa trouxe-me as mais valiosas interações e oportunidades pessoais e profissionais. Sem a colaboração e disponibilidade de inúmeras pessoas e instituições esse trabalho não seria possível.

Um agradecimento especial ao Professor Antonio Carlos Paes, meu orientador e amigo, pelo acolhimento, conselhos, orientações e amizade. Por sempre me receber de braços abertos e pelas grandes idéias e pensamentos que compartilhamos, ao seu lado pude ter um crescimento profissional, emocional e cultural.

Expresso minha gratidão ao Professor João Pessoa Araújo Jr. por acreditar e apoiar esse grandioso projeto quando era apenas uma ideia no papel e ninguém mais apostava, agradeço pelo tempo disponibilizado, dedicação com que transmitiu seus conhecimentos, espaço para o projeto e apoio financeiro, e a toda equipe do IBTEC que me recebeu muito bem, minha sincera gratidão.

Agradeço também à minha co-orientadora Doutora Érica Chimara pelo acolhimento que me deu ao longo da elaboração da minha tese e foi quem me proporcionou essa grande idéia de fazer um teste rápido para detectar a tuberculose bovina, obrigada por ceder novas técnicas, conhecimento e principalmente, agradeço pelos incentivos e conselhos que mudaram a trajetória desse projeto.

Agradeço ao apoio da empresa BD® em acreditar e apoiar o projeto, assim foi possível realizar o primeiro teste na Medicina Veterinária de uma máquina inovadora no mundo. Agradeço muito pela confiança e parceria que criamos ao longo do projeto, em especial a Carolina Amoedo, que com sua competência e expertise nos ajudou muito.

Meus agradecimentos ao apoio da empresa Thermo Fisher® por participar, apoiar e confiar no meu trabalho.

Agradeço também a empresa Qiagen® que recentemente nos disponibilizou seus conhecimentos e equipamentos em biologia molecular.

Ao professor Guilherme Sicca Lopes pelas sugestões, conselhos e carinho dispensados, e que deram origem a muitos questionamentos, que

colaborou com o meu crescimento no meio científico e ampliou minha capacidade de aprender e realizar, expresse minha gratidão.

À diretora do USDA Dra. Suelee Robbe-Austerman e toda a sua equipe que me atendeu prontamente e muito me ensinou, agradeço toda a colaboração dispensada a esse projeto.

À Dra. Silvia Cardoso Leão pela receptividade e acolhimento, pelas conversas e orientação.

Aos técnicos de laboratório Fernando, Adriana e Raquel pela ajuda e amizade desde o início de tudo, e por me receberem com todo carinho e me auxiliarem no que foi preciso.

À Juliana Gadum de Lalla, minha grande amiga, sempre presente em minha vida! Obrigada pela análise estatística dos dados e por toda a colaboração e conselhos que ajudaram a engrandecer esse maravilhoso projeto.

À Luana Sahade, uma pessoa especial que cruzou meu caminho durante meu doutorado, onde nasceu uma valorosa e maravilhosa amizade. Agradeço a Deus por sua amizade e cumplicidade.

Às grandes amigas de todas as horas, Mariana, Jaque, Camila, Leila, Marília, Marina e Evelyn por fazerem parte de minha vida, por ouvir meus desabafos e chatices, por me ajudarem em muitos momentos, pelas conversas e questionamentos. Agradeço pelo companheirismo, convivência e pelo apoio nas horas alegres e tristes.

Ao Fiscal Federal e grande amigo Marcelo Dutra, amigo de longa data, que dispensou seu tempo e conselhos, além das coletas das amostras, eterna gratidão. Que bom que nossos caminhos se encontraram novamente, um privilégio ser sua amiga. Você é muito especial para mim.

Ao Fiscal Federal Silvio Duarte por toda sua disposição e apoio ao projeto.

Ao Médico Veterinário Dante Zuchi pela ajuda e tempo dispensado.

A minha família que direta ou indiretamente participaram dessa grande conquista.

O presente projeto foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), código de

Financiamento 001, agradeço a concessão da bolsa que me ajudou a realizar esse sonho.

Agradeço imensamente à FAPESP pelo financiamento desse importante projeto (Processo nº2018/14335-8).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Espécies acometidas pelo <i>M. bovis</i> já relatadas e seus pesquisadores.....	22
Quadro 2 -	Espécies acometidas pelo <i>M. tuberculosis</i> já relatadas e seus pesquisadores.....	25
Quadro 3	Condições que favorecem a inibição da formação do fagolisossomo.....	28
Quadro 4	Cálculo do <i>Lead time</i> e visão sistêmica do tempo total gasto em todo o fluxo de recebimento da amostra até o resultado do laudo, visão geral de todo o diagnóstico molecular para TBb.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Oligonucleotídeos utilizados neste estudo, segundo a literatura citada.....	60
Tabela 2 -	Resultado da média do ciclo de <i>threshold</i> (<i>Ct</i>) e Temperatura de <i>Melting</i> (<i>Tm</i>) para a curva de diluição em 1/10 da amostra controle <i>M. tuberculosis</i> var. <i>bovis</i> AN5 da qPCR.....	69
Tabela 3	Resultado da média do ciclo de <i>threshold</i> (<i>Ct</i>) e Temperatura de <i>Melting</i> (<i>Tm</i>) das cepas de referência <i>M. bovis</i> AN5 e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	74
Tabela 4	Resultado dos <i>Tms</i> para a curva de diluição em 1/10 da amostra controle <i>M. bovis</i> AN5 da qPCR e RT-qPCR.....	75
Tabela 5	Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões suspeitas de TBb.....	78
Tabela 6	Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões de pequenos nódulos classificados como adenite...	80
Tabela 7	Proporções de linfonodos identificados visualmente com TBb e lesões classificadas como adenites com o teste qPCR.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Evolução do rebanho bovino brasileiro por região em milhões de cabeça entre 1974 a 2017.....	08
Figura 2 -	Perfil da pecuária brasileira.....	09
Figura 3 -	*PIB total, PIB do agronegócio e PID da pecuária (valores correntes e reais com base em 1997 e 2017.....	10
Figura 4 -	Evolução do movimento da cadeia produtiva de pecuária de corte entre 2007 e 2017.....	10
Figura 5 -	Distribuição do rebanho bovino no Brasil.....	11
Figura 6 -	Rebanho bovino brasileiro por estado.....	12
Figura 7 -	Localização dos frigoríficos de bovinos com Serviço de Inspeção Federal (SIF).....	13
Figura 8 -	Abate por tipo de fiscalização – 2017.....	15
Figura 9 -	Informações históricas e projeções da pecuária até 2027..	15
Figura 10 -	Ocorrência de tuberculose bovina de 1995 a 2015 em bovinos abatidos sob Inspeção Federal em um frigorífico do estado de São Paulo.....	20
Figura 11 -	A drenagem linfática da cabeça e pescoço do bovino.....	33
Figura 12 -	Principais linfonodos inspecionados durante o abate.....	33
Figura 13 -	Linfonodos retrofaríngeos suspeitos de TBb apresentando lesões clássicas da doença.....	49
Figura 14 -	Linfonodos peitorais com adenite, apresentando pequenas lesões nodulares.....	50
Figura 15 -	Linfonodos utilizados como controle negativo.....	50
Figura 16 -	Coleta passo a passo da amostra de tecido de linfonodos suspeitos de TBb em Frigoríficos do Centro-Oeste do estado de São Paulo.....	52
Figura 17 -	Análise das condições da amostra coletada.....	53
Figura 18 -	Processo de maceração da amostra.....	54

Figura 19 -	Extração das amostras pela tecnologia das microesferas magnéticas.....	56
Figura 20 -	ANs extraídos pela técnica de extração por microesferas (<i>beads</i>) magnéticas.....	57
Figura 21 -	Local de anelamento dos <i>primers</i> IS1081-F3 e IS1081-R3.	59
Figura 22 -	Amplificação da curva padrão com diluição de 1:10 do DNA de <i>M. bovis</i> AN5 (amostra referência).....	68
Figura 23 -	Curva de Amplificação do DNA (vermelho) e RNA (amarelo) da cepa <i>M. bovis</i> AN5 (vermelho) e do DNA (verde) e RNA (azul) da cepa <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	70
Figura 24 -	Curva de <i>Tm</i> dos ANs das cepas de referência <i>M. bovis</i> AN5 e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	71
Figura 25 -	Curva padrão construída com as diluições seriadas, utilizando o valor da inclinação da reta (<i>slope</i>) da linha de regressão, com a média de R^2 e eficiência das amplificações utilizado como matriz os ANs da cepa de <i>M. bovis</i> AN5.....	73
Figura 26 -	Curva de amplificação das amostras de linfonodos com suspeita de TBb.....	77
Figura 27	Curva de amplificação das amostras de linfonodos com lesões do tipo adenite.....	79

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	Distribuição da amostra após a maceração e fluxo de trabalho com as alíquotas de 100 µL e 300 µL.....	55
Fluxograma 2	Protocolo proposto de acordo com os dados desse estudo para o diagnóstico de TBb em carcaças bovinas suspeitas.....	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Ocorrência de lesões sugestivas de TBb entre março e agosto de 2018 em bovinos abatidos sob inspeção federal (Dados de um Frigorífico do estado de São Paulo – SP, Brasil).....	63
Gráfico 2	Determinação do limite de detecção e comparação da sensibilidade da técnica de acordo com o AN utilizado como matriz. Uma série de diluições da cepa de <i>M. bovis</i> AN5 foi utilizada.....	72

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
1 INTRODUÇÃO	03
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
2.1 Impacto econômico da tuberculose bovina no agronegócio.....	08
2.2 <i>Mycobacterium</i> – O patógeno secular.....	16
2.3 Etiologia do <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	17
2.4 Epidemiologia do <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	19
2.5 Singularidades do <i>Mycobacterium</i>	25
2.6 Patogenia e sinais clínicos da tuberculose bovina.....	27
2.7 Linfonodos.....	32
2.8 O diagnóstico da tuberculose bovina e a Biologia molecular.....	34
2.9 Profilaxia.....	41
2.10 Saúde Pública.....	42
3 A FILOSOFIA LEAN E O LEAD TIME DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TUBERCULOSE BOVINA	45
4 OBJETIVOS	46
4.1 Objetivo Geral.....	46
4.2 Objetivo específico.....	46
5 MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1 Delineamento experimental.....	47
5.2 Obtenção das amostras.....	48
5.3 Critérios de inclusão.....	48
5.4 Colheita e acondicionamento da amostra.....	51
5.5 Análise, preparação e processamento das amostras.....	52
5.6 Análises microbiológicas.....	55
5.7 Análises moleculares.....	56
5.7.1 Padronização da extração de DNA e RNA a partir de amostras de tecido de bovino.....	56
5.7.2 Controle positivo e negativo para padronização do teste diagnóstico para tuberculose bovina.....	57

5.7.3 Desenvolvimento e escolha dos oligonucleotídeos.....	58
5.7.4 Padronização da qPCR com DNA e RNA da amostra padrão positiva <i>M. bovis</i> AN5 e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	60
5.7.5 Sensibilidade e especificidade analíticas.....	61
5.7.6 Sequenciamento Sanger.....	62
5.8. Análise estatística.....	62
6 RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	63
6.1 Prevalência da tuberculose bovina.....	63
6.2 Lesões macroscópicas.....	64
6.3 Métodos de extração de ácidos nucleicos.....	65
6.4. Escolha e desempenho dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>).....	66
6.5. Padronização da reação de qPCR com cepa <i>M. bovis</i> AN5.....	67
6.6. RNA ribossômico e o DNA genômico.....	72
6.7. Especificidade do PCR em tempo real utilizando DNA genômico ou RNA ribossômico de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> como alvo.....	75
6.8. Sensibilidade e linearidade do ensaio PCR em tempo real utilizando DNA genômico ou RNA ribossômico de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> como alvo.....	75
6.9 Desempenho da qPCR em amostras de linfonodos de bovinos suspeitos de TBb.....	76
6.10. Desempenho da qPCR em amostras de linfonodos de bovinos suspeitos de adenite.....	79
6.11 Resultados do Sequenciamento Sanger.....	81
6.12 Correlação dos resultados da padronização da técnica de PCR em tempo real para diagnosticar TBb e do diagnostico visual praticado atualmente nos frigoríficos pelo SIF.....	81
6.13 Cultura microbiológica e Isolamento bacteriano.....	84
7 DETERMINAÇÃO DO TEMPO GASTO ENTRE A COLETA E O RESULTADO FINAL (Δt) A PARTIR DO TESTE PADRONIZADO APLICADO EM AMOSTRAS SUSPEITAS DE TBb NA ROTINA....	84
8 VALIDAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL.....	86
9 PONTOS CRÍTICOS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	87

10	FLUXOGRAMA PROPOSTO PARA O DIAGNÓSTICO EM CARÇAÇAS BOVINAS SUSPEITAS DE TBb.....	88
11	DESAFIOS CIENTÍFICOS E TECNOLÓGICOS.....	90
12	CONCLUSÕES.....	92
13	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
14	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
15	ANEXO.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

ANs: Ácidos nucleicos

APHIS: Animal and Plant Health Inspection Service

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CMT: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Ct: Threshold cycle

DNA: Desoxirribonucleic Acid - Ácido desoxirribonucleico

DR: Direct Repeat

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EPIs: Equipamentos de Proteção Individual

EUA: Estados Unidos da América

IFN- γ : Interferon-gama

IL 10: Interleucina 10

IS 6110: Sequência de Inserção 6110

Kb: Kilobase

M. bovis: *Mycobacterium bovis*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS: Ministério da Saúde

NCBI: National Center for Biotechnology Information

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

OMS: Organização Mundial de Saúde

pb: pares de base

PIB: Produto Interno Bruto

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

qPCR: PCR em tempo real

RNA: Ribonucleic Acid- Ácido ribonucleico

SIF: Serviço de Inspeção Federal

SISBI: Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal

SYBR Green: é um corante de ácido nucléico

TB: Tuberculose

TBb: Tuberculose bovina

TEC: Toneladas Equivalente Carcaça

Tm: Melting Temperature – Temperatura de fusão

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

USDA: United States Department of Agriculture

VS: Veterinary Service

WGS: Whole Genome Shotgun – Sequenciamento do Genoma Completo

WHO: World Health Organization

ZN: Ziehl-Neelsen

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.** Botucatu, 2019. 110 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

RESUMO

Um protocolo de coleta, extração e amplificação de ácidos nucleicos (ANs) utilizando a técnica de PCR em tempo real para detecção de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e/ou *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) foi testado em 60 linfonodos provenientes de bovinos. Desses 60, 30 foram provenientes de bovinos suspeitos de tuberculose bovina (TBb), outros 30 apresentavam lesões nodulares classificadas como adenite pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), na linha de abate. Os resultados obtidos demonstraram que dos 30 linfonodos coletados suspeitos de TBb, 24 (80%) foram confirmados positivos para *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis* e seis (20%) foram confirmados negativos. Dos 30 linfonodos com a presença de lesões nodulares do tipo adenite, 13 (43,33%) foram positivos para TBb e 17 (56,66%) foram negativos para TBb. Não há um teste diagnóstico rápido e preciso para detecção da TBb, diante disso o presente estudo desenvolveu um método de diagnóstico para a TBb baseado em PCR em tempo real com análise da fluorescência do corante SYBR Green. Estes resultados indicaram que o PCR em tempo real foi específico e sensível para a detecção e identificação dos dois alvos selecionados para detectar a TBb, com melhores resultados para o DNA genômico, quando comparado com o RNA ribossômico. O teste padronizado de qPCR para o diagnóstico da TBb permitiu uma maior acurácia e significativa redução do tempo de diagnóstico em relação aos métodos tradicionais de identificação da TBb.

PALAVRAS-CHAVE: *Mycobacterium bovis*, Tuberculose bovina, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, zoonose, PCR em tempo real.

FLAMINIO, A.P. **Real-time PCR technique standardization and validation for *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* detection in bovine lymph nodes.** Botucatu, 2019. 110 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP.

ABSTRACT

A protocol for the collection, extraction and amplification of nucleic acids (ANs) using a PCR technique for detection of *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) and / or *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) was tested on 60 bovine-derived lymph nodes. . Of these 60, 30 were included in cattle suspected of having bovine tuberculosis (TBb), another 30 had sclerias classified as adenites by the Federal Inspection Service (SIF), at the slaughter line. The results showed that the 30 lymph nodes with suspected TBb, 24 (80%) were confirmed positive for *M. bovis* and / or *M. tuberculosis* and six (20%) were confirmed negative. Of the 30 lymph nodes with adenitis nodular lesions, 13 (43.33%) were positive for TBb and 17 (56.66%) were negative for TBb. TBB, together with the present study for a diagnostic method for TBB, is a real-time test with SYBR Green dye fluorescence analysis. Results compared with real-time PCR were specific and sensitive for the identification and identification of the two targets selected to detect a TBb, with samples obtained for genomic DNA, when observed with ribosomal RNA. The standardized qPCR test for the diagnosis of tuberculosis allowed for greater accuracy and a significant reduction in diagnosis time in relation to TBb identification parameters.

KEY WORDS: *Mycobacterium bovis*, Bovine tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, zoonosis, real-time PCR.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (TBb) é uma importante zoonose de notificação obrigatória que afeta o comércio internacional. Muitos países investem recursos significativos para controlá-la e erradicá-la, mas ainda o principal método de detecção é a inspeção nos abatedouros. A vigilância para essa zoonose em abatedouros de bovinos consiste na identificação de lesões granulomatosas pelo SIF, onde os critérios de julgamento de carcaças com suspeita de TBb são baseados subjetivamente em lesões características da doença, de acordo com o artigo 171 do Decreto nº 9.069, de 2017 (**Anexo 1**).

O diagnóstico diferencial para lesões nodulares (linfadenites, ou mais comumente como denominadas nos frigoríficos, as adenites), em carcaças de bovinos, é de grande importância, já que outros patógenos causam inflamação granulomatosa e morfológica com características similares à TBb, como: *Actinomyces bovis*, *Trueperella pyogenes*, *Rhodococcus equi* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Da mesma forma infecções por fungos, parasitas, abscessos, carcinomas e sarcomas também podem desenvolver processos granulomatosos (CONSTABLE et al., 2017).

Entretanto não há condenação tão severa para essas lesões similares, como acontece com a TBb, como recomenda o artigo 171 do Decreto nº 9.069, de 2017 (**Anexo 1**). Um grande prejuízo econômico é ocasionado pelas linfadenites em bovinos na pecuária brasileira, até o momento não há informações sobre a associação da etiologia dessas lesões.

Porém tais lesões nodulares não são aceitas no mercado externo, consideradas alterações patológicas de risco. A conduta do destino de carcaças que apresentem adenites em quaisquer linfonodos é de não poderem ser expedidas para o mercado externo, são carimbadas como Não Exportável (NE), mas liberadas para o mercado interno (Legislação da China, circulares nº 490/15 e 937/15 de 2015).

Zoonose negligenciada no Brasil, a TBb, é uma infecção que causa diminuição de 10% a 20% na produção de leite, perda de peso e redução da fertilidade, além da condenação de carcaças de animais, restrições à exportação de carne para países onde a TBb é controlada, perda da

credibilidade do produtor e desclassificação de lotes de animais devido aos exigentes contratos de exportação com os frigoríficos (DIAS et. al., 2016).

A TBb é uma doença que acomete a maioria dos mamíferos e está presente em todos os continentes. Causada pelo *M. bovis* é uma enfermidade infectocontagiosa granulomatosa crônica, que apresenta como forma de contágio a simples inalação do micro-organismo e possui um alto poder zoonótico. Os portadores, muitas vezes assintomáticos, são focos importantes de disseminação da doença, que ainda se mantém como uma das enfermidades que mais acomete e aflige a humanidade e os animais no século XXI (O'REILLY E DABORN, 1995; VERONESI; FOCACCIA, 2015).

Pesquisas em frigoríficos para saber a real situação da TBb e o tamanho da perda comercial com essa grave zoonose se fazem necessárias, pois na atualidade os valores de perda giram em torno de 80% e 20%, para o produtor e frigorífico, respectivamente. Estes valores mostram o enorme desafio em controlar e estimar a prevalência desse relevante e grave problema de saúde pública.

Estudos recentes nos Estados Unidos da América (EUA) têm sugerido a substituição da cultura bacteriológica pela técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) em abatedouros para o rastreamento e identificação de granulomas na linha de abate (DYKEMA et al., 2016; USDA, 2018).

No Brasil, as técnicas moleculares ainda não são oficialmente aceitas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o diagnóstico da TBb. Porém, pesquisas como o presente estudo podem ser aplicadas para amparar os programas de controle de TBb, melhorando a detecção do *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis*, diminuindo o tempo para o diagnóstico. Os protocolos devem ser estabelecidos para fornecer resultados com melhor técnica com elevada sensibilidade e especificidade, e em menor tempo, de maneira que possam ser base para a tomada de decisões dos médicos veterinários, principalmente em frigoríficos. Um método de diagnóstico rápido e eficiente ainda não foi desenvolvido e aprovado pelos órgãos oficiais e competentes, e é extremamente necessário que isto se faça com o objetivo de combater de forma decisiva a TBb e reduzir os prejuízos à pecuária brasileira e à saúde pública.

Neste estudo, um ensaio de PCR em tempo real combinado com SYBR Green é descrito, a análise da curva de fusão gerada, que se baseia na diferença da temperatura de fusão (T_m) do amplicon foi específica para detectar *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis*. Para a aplicação prática, este ensaio foi testado incluindo especificidade e sensibilidade usando cepas padrão positivas e amostras clínicas.

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os testes moleculares para o diagnóstico da TB baseiam-se na amplificação e detecção de sequências específicas do RNA ou DNA de micobactérias em espécimes clínicos e fornecem resultados em um período de 24-48 horas, são rápidos, seguros, decisivos e econômicos quando comparados com a cultura bacteriológica.
- Pesquisadores veterinários e técnicos reconhecem as vantagens do uso de qPCR para detectar *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis* em tecidos, mas a variação em matrizes de tecido acrescenta complexidade geralmente não observada com uma amostra de escarro. Os métodos de extração devem ser capazes de lidar com as diversas matrizes de tecidos a um custo razoável e ser redimensionáveis para o influxo diário de espécimes (USDA, 2018).
- Concluímos que melhorias no teste podem ser feitas como uso de sonda, tratamento da amostra para minimizar a instabilidade do RNA podem vir a aumentar a eficiência e sensibilidade da reação, e mais testes neste sentido devem ser realizados.
- Concluímos que houve sucesso na amplificação tanto das cepas de referência *M. bovis* e *M. tuberculosis*, bem como das amostras suspeitas de TBb, com o uso dos *primers* IS1081-3, utilizando o sistema de reagente *GoTaq® qPCR Master Mix* com o método de detecção *SYBR Green*, em um termociclador *Thermo Fisher Fast 7500*.
- Outro fator fundamental é o desenho dos *primers* o que otimizou a reação e conferiu alta sensibilidade.
- As linfadenites em bovinos representam grande prejuízo econômico e causam uma enorme dificuldade na inspeção de carcaças bovinas em frigoríficos. Não há estimativa de quais agentes estão associados a essas lesões, mais estudos se fazem necessário sobre essas lesões que tem uma alta prevalência em frigoríficos de bovinos.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira Das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da Pecuária no Brasil**: relatório anual. São Paulo: ABIEC, 2018. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 28 maio 2018.

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, p. 1-17, 2005.

ALZAMORA FILHO, F. Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, por métodos bacteriológico e molecular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1585-1591, 2014.

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 541-555. 2003.

BHEMBE, N.; JAJA, I.; NWODO, U.; OKOH, A.; GREEN, E. Prevalence of tuberculous lymphadenitis in slaughtered cattle in Eastern Cape, SouthAfrica. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 27–37, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT. Brasília: MAPA, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saudeanima/l/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/tb1-pncebt.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

BRASIL. Câmara dos Deputados. **Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017**. Altera o Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, que regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de

1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2017/decreto-9069-31-maio-2017-784996-publicacaooriginal-152921-pe.html>. Acesso em: 20 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Coordenação Geral de combate às Doenças. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA, 2006. 188 p.

BRITES, D.; LOISEAU, C.; MENARDO, F.; BORRELL, S.; BONIOTTI, M. B.; WARREN, R.; DIPPENAAR, A.; PARSONS, S. D. C.; BEISEL, C.; BEHR, M. A.; FYFE, J. A.; COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. A new phylogenetic framework for the animal-adapted mycobacterium tuberculosis complex. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2820, 2018. DOI 10.3389/fmicb.2018.02820.

BROWN, W. H.; ANDA J. H. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 4, p.557-559, 1998.

CAREL, C.; NUKDEE, K.; CANTALOUBE, S.; BONNE, M.; DIAGNE, C. T.; LAVAL, F.; DAFFÉ, M.; ZERBIB, D. *Mycobacterium tuberculosis* proteins involved in mycolic acid synthesis and transport localize dynamically to the old growing pole and septum. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97148, 2014.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Report of an Expert Consultation on the Uses of Nucleic Acid Amplification Tests for the Diagnosis of Tuberculosis**. Atlanta: CDC, 2016. Disponível em: https://www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/amplification_tests/amplification_tests.pdf. Acesso em: 14 jun. 2018.

CHOI, Y.; HONG, S. R.; JEON, B. Y.; WANG, H. Y.; LEE, G. S.; CHO, S. N.; SHIM, T. S.; LEE, H. Conventional and real-time PCR targeting 16S ribosomal RNA for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 19, n. 9, p. 1102–1108, 2015.

COLLINS, D. M.; STEPHENS, D. M. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 83, n. 1, p. 11–15, 1991.

COLLINS, J. D. Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. [Veterinary Microbiology](#), v. 112, n. 2-4, p. 369-381, 2006.

CONSTABLE, P. D.; HINCHCLIFF, K. W.; DONE, S. H.; GRÜNBERG, W. Bovine tuberculosis. In: CONSTABLE, P. D.; HINCHCLIFF, K. W.; DONE, S. H.; GRÜNBERG, W. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 11. ed. Philadelphia: Elsevier, 2017. p. 2015-2024.

CORNER, L.; MELVILLE, L.; MCCUBBIN, K.; SMALL, K. J.; MCCORMICK, B.S.; WOOD, P. R.; ROTHEL, J.S. Efficiency of inspection procedures for detection of tuberculous lesions in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, n.11, p.389-392, 1990.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 5363, 1994.

CORREA, F. R.; SCHILD, A. L.; LEMOS. R. A. A.; BORGES, J. R. J. Etiologia e patologia tuberculose. In: CORREA, F. R.; SCHILD, A. L.; LEMOS. R. A. A.; BORGES, J. R. J. [Doenças de ruminantes e eqüídeos](#). 3. ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p. 352.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUKUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMAYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 59-70, 1998.

COUSINS, D. V.; WILTON, S. D.; FRANCIS, B. R. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 27, p. 187-195, 1991.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; Q

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

DABORN, C. J.; GRANGE, J. M.; KAZWALA, R. R. The bovine tuberculosis cycle: an African perspective. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, supl., p. 27S-32S, 1996.

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

DIAS, I. C. L. Prevenção de zoonoses ocupacionais em abatedouros de bovinos. **Vivências**, v. 8, n. 15, p. 89-98, 2012.

DIAS, R.; ULLOA-STANOJLOVIC, F. M.; BELCHIOR, A. P. C.; FERREIRA, R. S.; GONÇALVES, R. C.; AGUIAR, R. S. C. B.; SOUSA, P. R.; SANTOS, A. A. A.; AMAKU, M.; [FERREIRA, F.](#); TELLES, E. O.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; [HEINEMANN, M. B.](#); [FERREIRA NETO, J. S.](#) Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of São Paulo, Brazil. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 37, p. 3673, 2016.

DROBNIEWSKI, F.; NIKOLAYEVSKYY, V.; MAXEINER, H.; BALABANOVA, Y.; CASALI, N.; KONTSEVAYA, I.; IGNATYEVA, O. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation. **BMC Medicine**, v. 11, n. 190, p. 1-11, 2013.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

DYKEMA, P. E.; STOKES, K. D.; BECKWITH, N. R.; MUNGIN, J. W.; XU, L.; VICKERS, D. J.; REISING, M. M.; BRAVO, D. M.; THOMSEN, B. V.; ROBBE-AUSTERMAN, S. Development and validation of a direct real-time PCR assay for *Mycobacterium bovis* and implementation into the United States national surveillance program. **Peer Journal PrePrints**, v. 4, p. e1703, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1703v1>. Acesso em: 20 nov. 2018.

EINSTEIN, A. R.; CICCHETTI, D. V. High agreement but low kappa: I. The problems of two paradoxes. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 43, p. 543-549, 1990. Disponível em: [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0895-4356\(90\)90158-L](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0895-4356(90)90158-L). Acesso em: 2 mar. 2016.

EISENACH, K. D.; CAVE, M. D.; BATES, J. H.; CRAWFORD, J. T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 5, p. 977–981.

EMBRAPA. **Segurança do alimento**. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne- bovina/seguranca-do-alimento>. Acesso em: 21 nov. 2018.

FERREIRA NETO, J. S.; SILVEIRA, G. B.; ROSA, B. M.; GONÇALVES, V. S. P.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; LAGE, A. P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3385-3402, 2016. Supl. 2.

FIGUEIREDO, E. E. S.; SILVA, M. G.; FONSECA, L. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Detecção do complexo *Mycobacterium tuberculosis* no leite pela reação em cadeia da polimerase seguida de análise de restrição do fragmento amplificado (PRA). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1023-1033, 2008.

FRANCO, M. M. J.; RIBEIRO, M. G.; PAVAN, F. R.; MIYATA, M.; HEINEMANN, M. B.; SOUZA FILHO, A. F.; CARDOSO, R. F.; ALMEIDA, A. L. ; SAKATE, R. I.; PAES, A. C. Genotyping and rifampicin and isoniazid resistance

in *Mycobacterium bovis* strains isolated from the lymph nodes of slaughtered cattle. **Tuberculosis**, v. 104, p. 30-37, 2017.

FURLANETTO, L. V.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE JÚNIOR, C. A.; CARVALHO, R. C. T.; SILVA, F. G. S.; SILVA, J. T.; LILENBAUM, W.; PASCHOALIN, V. M. F. 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.

FURLANETTO, L. V.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE JÚNIOR, C. A.; CARVALHO, R. C. T.; SILVA, F. G. S.; SILVA, J. T.; LILENBAUM, W.; PASCHOALIN, V. M. F. 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.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J. C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P. R.; PARKHILL, J.; BARRELL, B. G.; COLE, S. T.; GORDON, S. V.; HEWINSON, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, 2003.

GROENEWALD, W.; BAIRD, M. S.; VERSCHOOR, J. A.; MINNIKIN, D. E.; CROFT, A. K. Differential spontaneous folding of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 180, p. 15-22, 2014.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A. B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B. S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4431-4440, 2002.

HUARD, R. C.; FABRE, M.; DE HAAS, P.; LAZZARINI, L. C.; VAN SOOLINGEN, D.; COUSINS, D.; HO, J. L. Novel genetic polymorphisms that

further de-lineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4271–4287, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária: junho de 2017**. Brasília: IBGE, 2017. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_PecuariaFasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201701caderno.pdf. Acesso em: agosto 2018.

[INNES, P.; JANSEN, J.; MARTIN, J.; WRIGHT, R.](#) **Epidemiology, Veterinary Science**. Ontário: OMAFRA, 2002. Disponível em: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/vet/facts/bovinetuberculosishtm>. Acesso em: maio 2018.

JEMAL, A. M. Review on zoonotic importance of bovine tuberculosis and its control. **Open Access Library Journal**, v. 3, p. e2504, 2016. DOI 10.4236/oalib.1102504.

JOHNSON, L.; DEAN, G.; RHODES, S.; HEWINSON, G.; VORDERMIEIR, M.; WANGOO, A. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. **Tuberculosis**, v. 87, n. 1, p. 71-76, 2007.

KAO, R. R.; GRAVENOR, M. B.; CHARLESTON, B.; HOPE, J. C.; MARTIN, M.; HOWARD, C. J. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, n. 14, p. 545-551, 2007.

KOCAGOZ, T.; YILMAZ, E.; OZKARA, S.; KOCAGOZ, S.; HAYRAN, M.; SACHEDEVA, M.; CHAMBERS, H. F. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1435-1438, 1993.

KÖSER, C. U.; FEUERRIEGEL, S.; SUMMERS, D. K.; ARCHER, J. A. C.; NIEMANN, S. Importance of the genetic diversity within the *Mycobacterium tuberculosis* complex for the development of novel antibiotics and diagnostic

tests of drug resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6080-6087, 2012.

KUSKE, C. R.; BARNS, S. M.; BUSCH, J. D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3614-3621, 1997.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006.

LARA, G. H. B.; RIBEIRO, M. G. Linfadenite suína por *Rhodococcus equi*: aspectos gerais da afecção, virulência das linhagens em suínos e humanos. **Veterinaria e Zootecnia**, v. 21, n. 1, p.25-38, 2014.

LARA, G. H.; RIBEIRO, M. G.; LEITE, C. Q.; PAES, A. C.; GUAZZELLI, A.; DA SILVA, A. V.; SANTOS, A. C.; LISTONI, F. J. P. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). *Research in Veterinary Science*, v. 90, p. 185–188, 2011.

LEAN, 2018. <https://www.lean.org.br/artigos/384/leadtime.aspx>. Acesso em: maio 2019.

LESSLIE, I. W.; BIRN, K. J. *Mycobacterium avium* infections in cattle and pigs in Great Britain. **Tubercle**, v. 51, p. 446-451, 1970.

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

LIMA, S. S. S.; CLEMENTE, W. T.; PALACI, M.; ROSA, R. V.; ANTUNES, C. M. F.; SERUFO, J. C. Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico

da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 12, p. 1056-1062, 2008.

LOPES FILHO, P. R. **Perfil epidemiológico da tuberculose bovina no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, 2004 a 2008**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

LUDWIG, W.; BAUER, M.; HELD, I.; KIRCHHOF, G.; SCHULZE, R.; HUBER, I.; SPRING, S.; HARTMANN, A.; SCHLEIFER, K. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**, v.153, n.1, p. 181-90, 1997.

MORRIS, R. S.; PFEIFEER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 153-177, 1994.

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

MOURA, A.; HODON, M. A.; SOARES FILHO, P.; MARTINS, ISSA, M. A.; OLIVEIRA, A. P. F.; FONSECA JÚNIOR, A. A. Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real time PCR. **Ciência Rural**, v. 46, n. 7, p. 1223-1228, 2016.

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Revista Medica de Minas Gerais**, v. 21. n. 1, p. 42-48, 2011.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Bethesda: NCBI, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: abril de 2017.

NEVES, E. D.; MEZALIRA, T. S.; DIAS, E. H.; DOURADO, M. R.; KUSTER DE PAULA, M.; GUSMAN, C. R.; CAETANO, I. C. S.; BELTRAMI, J. M.; OTUTUMI, L. K. Lesões de tuberculose bovina em abatedouros frigoríficos no Brasil: bibliometria. **Jornal Internacional de Biociência**, v. 2, n. 2, p. 22-27, 2017.

OCEPEK, M.; PATE, M.; ZOLNIR-DOVC, M.; POLJAK, M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from Human to Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3555-3557, 2005.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, p. 1-46, 1995.

OIE. Office International des Epizooties. Organização Mundial de Saúde Animal. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. **Manual of standards for diagnostic test and vaccines**. Paris: OIE, 2013. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00050.htm Acesso em: 15 jul. 2018.

OIE. Organização International Epizooties. **Manual of standards for diagnostic test and vaccines**. Paris: OIE, 2000. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00050.htm. Acesso em: 15 jul. 2006.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2018. Paris: OIE, 2018. chap. 1.1.5. Disponível em: http://wahis2devt.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf. Acesso em: 15 jul. 2018.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. OMS pede ação urgente para acabar com a tuberculose. Brasília: OPAS; 2018. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5760:oms-pede-acao-urgente-para-acabar-com-a-tuberculose&Itemid=812. Acesso em: **agosto de 2018**.

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.

MITCHELL, V.; PALMER, M. V.; WIARDA, J.; KANIPE, C.; THACKER, T. C. Early pulmonary lesions in cattle infected via aerosolized mycobacterium bovis. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 4, p. 544-554, 2019.

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P.; CHI, K. D. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

PETROFF, S. A. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. **Journal of Experimental Medicine**, v. 21, p. 38-42, 2015.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças causadas por bactérias – IV. *In*: RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 817-824.

RIOJAS, M. A.; MCGOUGH, K. J.; RIDER-RIOJAS, C. J.; RASTOGI, N.; HAZBÓN, M. H. Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 324-332, 2017.

ROCHA, A.; ELIAS, A. R.; SOBRAL, L. F.; SOARES, D. F.; SANTOS, A. C.; MARSICO, A. G.; HACKER, M. A.; CALDAS, P. C.; PARENTE, L. C.; SILVA, M. R.; FONSECA, L.; SUFFYS, P.; BOÉCHAT, N. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. **Tuberculosis**, v. 91, n. 1, p. 14-21, 2013.

RODRIGUES-CAMPOS, S.; SMITH, N. H.; BONIOTTIC, M. B.; ARANAZ, A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms:

Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 97, p. S5–S19, 2014.

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose: síntese e atualização. **Boletim Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 1, p. 35-59, 2001.

SAHA, M. S.; PALB, S.; SARKARA, I.; ROYA, A.; MOHAPATRAK, P. K.; SEN, A. Comparative genomics of Mycobacterium reveals evolutionary trends of M. avium complex. **Genomics**, v. 111, n. 3, p. 426-435, 2019.

SAKAMOTO, K. The pathology of mycobacterium tuberculosis infection. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 3, p. 423-439, 2012.

SALES, M. L.; FONSECA, J. R. A. A.; SALES, E. B.; COTTARELLO, A. C.; ISSA, M. A.; HODON, M. A.; SOARES-FILHO, P. M.; RAMALHO, A. K.; SILVA M. R.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of Mycobacterium bovis. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 5, p. 433-438, 2014.

SAURET, J.; JOLIS, R.; AUSINA, V.; CASTRO, E.; CORNUDELLA, R. Human tuberculosis due to Mycobacterium bovis: report of 10 cases. **Tubercle and Lung Disease**, v. 73, n. 6, p. 388-391, 1992.

SILVA, M. G.; FONSECA, E. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Diagnóstico pelas técnicas histopatológicas e de Ziehl-Neelsen da tuberculose bovina de carcaça condenada em um frigorífico no Estado da Bahia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 1, p. 52-55, 2016.

SKUCE, R. A.; ALLEN, A. R.; MCDOWELL, W. J. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. **Veterinary Medicine International**, v., 2012, p. 621210, 2012. DOI 10.1155/2012/621210.

SMANIOTTO, B. D. **Prevalência de tuberculose e cisticercose bovina em frigorífico no estado de São Paulo entre os anos de 1995 a 2015**. 2015. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade Medicina Veterinária e

Zootecnia - FMVZ - Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" - Unesp - Campus de Botucatu, São Paulo, 2015.

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

THERMO FISHER. **Guia do usuário MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit**. Disponível em: https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0017829_MagMAX-CORE-NA-Kit_UG_ES.pdf&title=VXNlciBHdWlkZSAoR3UmaWFjdXRIO2EgZGUgdXN1YXJpbyk6IE1hZ01BWCBDdb3JIIE51Y2xlaWMgQWNpZCBQdXJpZmljYXRpb24gS2I0. Acesso em: 12 jul. 2018.

USDA - APHIS. United States Department of Agriculture. **Animal and plant health inspection service**. Riverdale: USDA, 2018. Disponível em: https://aglearn.usda.gov/customcontent/APHIS/APHIS-VSBovinetuberculosis-01/scopage_dir/overview/overview.html. Acesso em: 15 nov. 2018.

VERMA, A. K.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; NEHA; SAMINATHAN, M.; DHAMA, K.; VIR SINGHET, S. Insights into bovine tuberculosis (bTB), various approaches for its diagnosis, control and its public health concerns: an update. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 6, p. 323-344, 2014.

VERONESI, R.; FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015. 2 V.

WARDS, B. J.; COLLINS, D. M.; DE LISLE, G. W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 227-240, 1995.

WARNER, D. F.; MIZRAHI, V. DNA Metabolism in mycobacterial pathogenesis. In: PIETERS, J.; MCKINNEY, J. D. (ed.). **Pathogenesis of Mycobacterium**

tuberculosis and its interacion with the host organism. Berlin: Springer Verlag, 2007. p. 27-47.

WATERS, W. R.; BUDDLE, B. M.; VORDERMEIER, H. M.; GORMLEY, E.; PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; BANNANTINE, J. P.; SATBEL, J. R.; LINSKOTT, R.; MARTEL, E.; MILIAN, F.; FOSHAUG, W.; LAWRENCE, J. C. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.18, n. 11, p. 1882-1888, 2011.

YOSHIKAWA, H.; DOGRUMAN-AL, F.; TURK, S.; KUSTIMUR, S.; BALABAN, N.; SULTAN, N. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocystis subtypes from fecal samples. **Parasitology Research**, v.109, p.1045-1050, 2011.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T. P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIORAVANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. Mycobacterium bovis: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 809-813, 2001.

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