



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 μ L e 300 μ L.....	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.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A detecção de animais infectados com micro-organismos do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) é um desafio, uma vez que os animais podem não apresentar sinais clínicos e levar anos para desenvolver os sintomas de tuberculose após infecção (INNES, 2002).

O *M. bovis* é um importante patógeno em bovinos e humanos, com implicações para medicina veterinária e saúde pública. Este agente infecta animais, mas pode infectar humanos via contato direto com animais com TBb durante manejo, abate e/ou pelo consumo de produtos contaminados, como carne, leite e seus derivados (BHEMBE et al., 2017).

Os bovinos infectados podem disseminar o patógeno por meio da saliva, urina, fezes e secreções. Até agora, o consumo de carne não foi reconhecido como um dos meios de transmissão para humanos. Entretanto, agricultores, trabalhadores rurais, veterinários e trabalhadores na linha de abate correm grande risco de contrair TBb de animais infectados ao manipularem essas lesões sem o devido uso de equipamentos de proteção e segurança adequados, os EPIs (BHEMBE et al., 2017).

Sabe-se que para a comercialização da carne bovina, no mercado interno e externo, há várias normas que devem ser seguidas para certificar a ausência de quaisquer micro-organismos e/ou substâncias que possam causar danos à saúde. Algumas dessas exigências são quanto aos padrões microbiológicos, podendo ser impostas, tanto pelo mercado interno como pelos países importadores. Alguns contratos internacionais de exportação de carne exigem que o lote esteja livre de infecção, ou seja, nenhum animal suspeito de TBb ou de lesões nodulares. Caso venha a ter um único animal suspeito ou com qualquer lesão nodular, o lote inteiro deverá ser desabilitado para aquele país importador, como é o caso da China (Legislação da China, circulares nº 490/15 e 937/15 de 2015).

A adenite é um termo geral usado para a inflamação de uma glândula ou um linfonodo. São lesões causadas por uma infecção bacteriana nos linfonodos. Estudos mostram que dentre as principais doenças infecciosas que acometem a suinocultura no Brasil e em todo o mundo, merece destaque a linfadenite granulomatosa, geralmente diagnosticada na linha de abate,

causando elevados prejuízos econômicos com a condenação de carcaças, bem como reflexos em saúde pública, devido ao potencial zoonótico dos agentes causais da doença, principalmente para pessoas imunossuprimidas. Em abatedouros é creditada ao potencial zoonótico de vários micro-organismos envolvidos na gênese desta doença, em especial *Rhodococcus equi* (*R. equi*) e bactérias do gênero *Mycobacterium* (LARA et al., 2014).

No Brasil, Lara e col. (2011) identificaram 31 (24,1%) isolados de *Mycobacterium* spp. e 17 (13,2%) de *R. equi*, em 129 amostras de linfonodos de suínos destinados ao abate, que apresentavam lesões granulomatosas.

Em bovinos não há estudos de quais bactérias possam estar envolvidas nessas adenites, seria necessária uma pesquisa mais aprofundada para saber quais micro-organismos fazem parte do microbioma de tais lesões.

A falta de informações sobre os diferentes estágios da fisiopatologia dessas lesões, aliada às dificuldades impostas pela inspeção visual, coloca em risco a credibilidade do diagnóstico da TBb, e o único diagnóstico *post-mortem* aceito oficialmente é a cultura bacteriológica, considerada padrão ouro. No entanto, este é um método complexo, laborioso e dispendioso, com resultados demorando de 60 a 90 dias após o abate, o que dificulta os esforços de rastreamento e descarte assertivo da carcaça bovina (LIMA et al., 2008).

Desafios como fazer o controle correto da TBb nos animais vivos pela tuberculinização, comunicar aos órgãos competentes os animais positivos, abate e descarte dos animais positivos em local apropriado, conhecimento sobre a doença e seu impacto na saúde pública, ter consciência que o prejuízo é melhor que a prática ilegal da omissão na hora de não seguir os critérios corretos para eliminar os animais positivos e denunciar os que praticam o contrário da legislação atual (artigo 36 do Decreto nº 40.400, de 1995), são importantes para controlar e erradicar a TBb eficientemente.

O Brasil, apesar dos desafios que enfrenta, tem uma grande importância no mercado global e coloca-se como principal produtor e fornecedor de carne bovina no mundo, sendo que melhorias nos aspectos sanitários são de extrema importância para conseguir a abertura de mercados de exportação ainda fechados para o país, além de melhorar a sanidade do rebanho nacional.

2.1. Impacto econômico da tuberculose bovina e da exportação de carne no agronegócio do Brasil

O Brasil passou a integrar o mercado internacional de carnes como exportador em 1914, a partir da primeira Guerra Mundial (EMBRAPA, 2018).

O setor pecuário, hoje, é uma indústria altamente tecnológica e confiável. Por considerar a importância do setor, o governo federal aumentou a fiscalização, realizou investigações em possíveis focos de problemas e instalou controles ainda mais rígidos do que os usuais em todo o território nacional. O melhoramento na tecnologia e pesquisa mostra o crescimento do setor agropecuário, entre 1974 a 2017, tornando o rebanho brasileiro o maior do mundo e com maior crescimento, principalmente na região Centro-Oeste do país, como mostra a **Figura 1** (EMBRAPA, 2018; ABIEC, 2018).

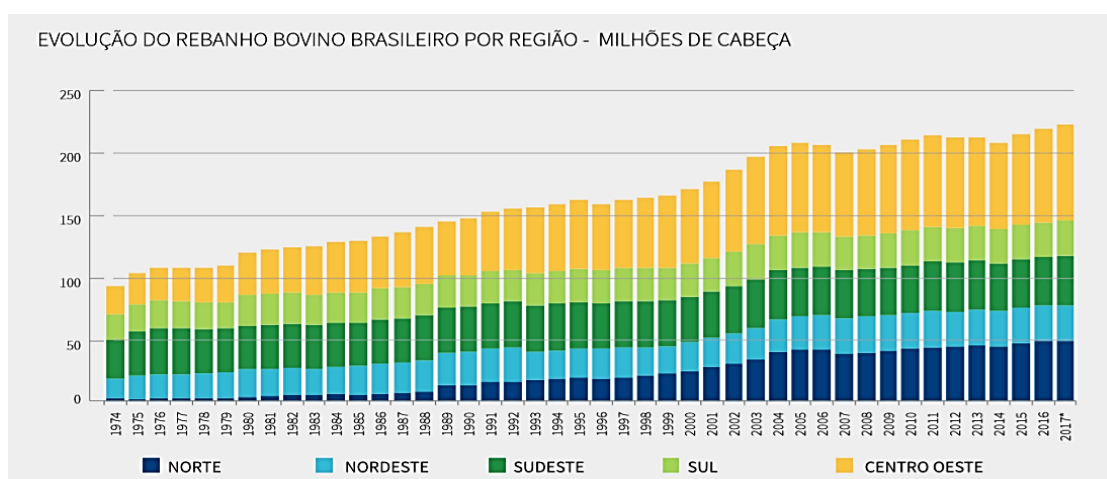


Figura 1. Evolução do rebanho bovino brasileiro por região em milhões de cabeças entre 1974 a 2017. Fonte: IBGE, Athenagro - Elaboração ABIEC, 2018.

Por trás da qualidade do produto bovino brasileiro e de toda a indústria de bovinocultura existem 100 anos de pesquisa em tecnologia agropecuária e, atualmente, o Brasil possui o maior rebanho mundial comercial, composto por mais de 214,69 milhões de bovinos em 2018. O número de abates foi de 44,23 milhões de cabeças. O volume de carne produzida chegou a 10,96 milhões de toneladas equivalente carcaça (TEC). Do total de carne produzida, 20,12% foi exportada e 79,64% abasteceu o mercado interno, garantindo um consumo de

cerca de 42,12 quilos de carne bovina por habitante/ano, como mostra a **Figura 2** (ABIEC, 2019).

Os principais destinos da carne bovina brasileira em 2018 foram: Hong Kong, União Europeia, China, Egito, Rússia, Irã, Chile, Estados Unidos e Arábia Saudita (ABIEC, 2019; IBGE, 2018; USDA, 2018).

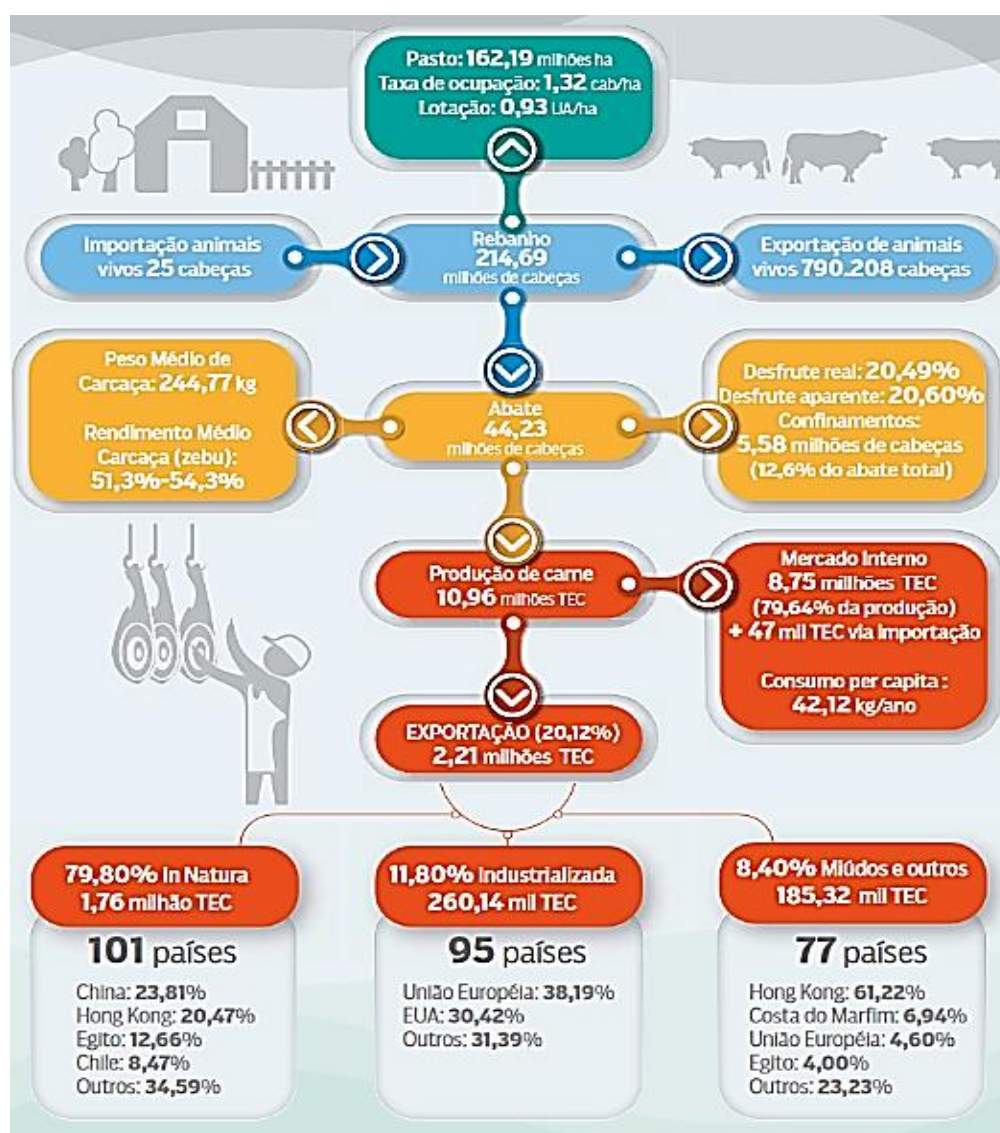


Figura 2. O perfil da pecuária brasileira. Fonte: Athenagro, dados Secex/MDIC, IBGE - Elaboração ABIEC, 2019.

A pecuária de corte movimentou R\$ 597,22 bilhões em 2018. O número representa um crescimento de 8,3% em relação aos R\$ 551,41 bilhões somados em 2017. O setor apresenta um crescente aumento contribuindo para o PIB do país como mostra a **Figura 3** (ABIEC, 2019).

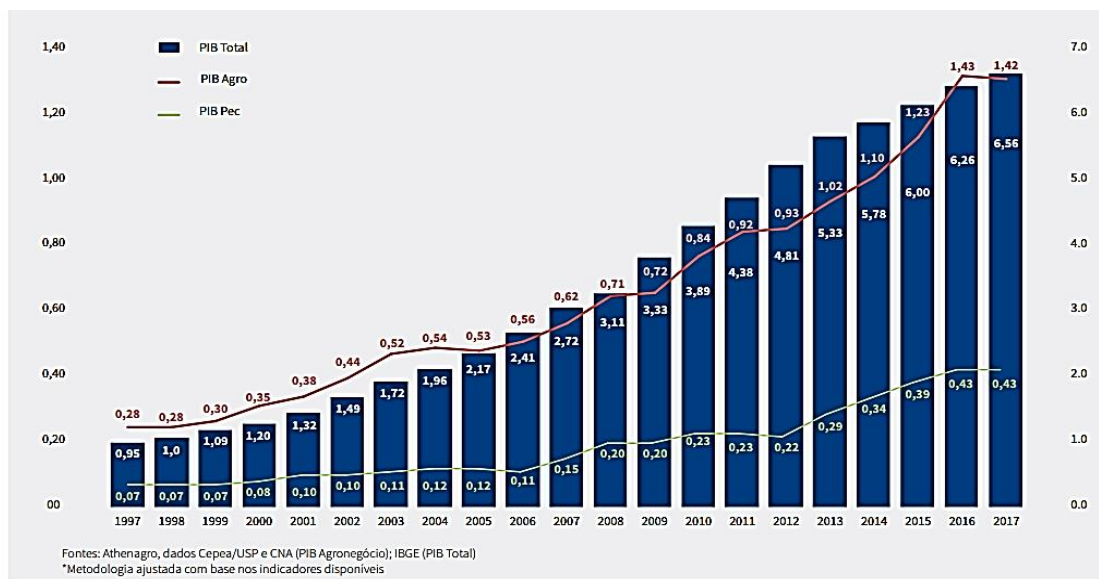


Figura 3. *Produto Interno Bruto (PIB) total, PIB do agronegócio e PIB da pecuária (valores correntes e reais com base em 1997 e 2017- em trilhões de R\$).

Em quase uma década, o montante gerado pela cadeia produtiva da pecuária de corte aumentou mais de 64% (**Figura 4**), incluindo desde os insumos utilizados na produção do gado, passando pelo faturamento da venda dos animais, até o total comercializado pelas indústrias e varejo, considerado um dos setores mais fortes da economia brasileira (ABIEC, 2018).

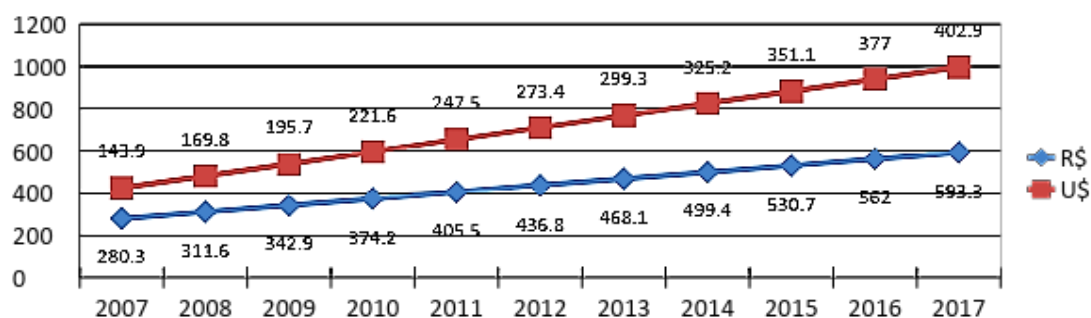


Figura 4. Evolução do movimento da cadeia produtiva de pecuária de corte entre 2007 e 2017 - metodologia ajustada. Fonte: Athenagro / ABIEC / SECEX / IBGE / CEPEA / BNDES - Elaboração ABIEC, 2018.

A distribuição do rebanho bovino no Brasil é mais concentrada nas regiões norte e oeste como: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia e Pará (**Figura 5**) (ABIEC, 2018).

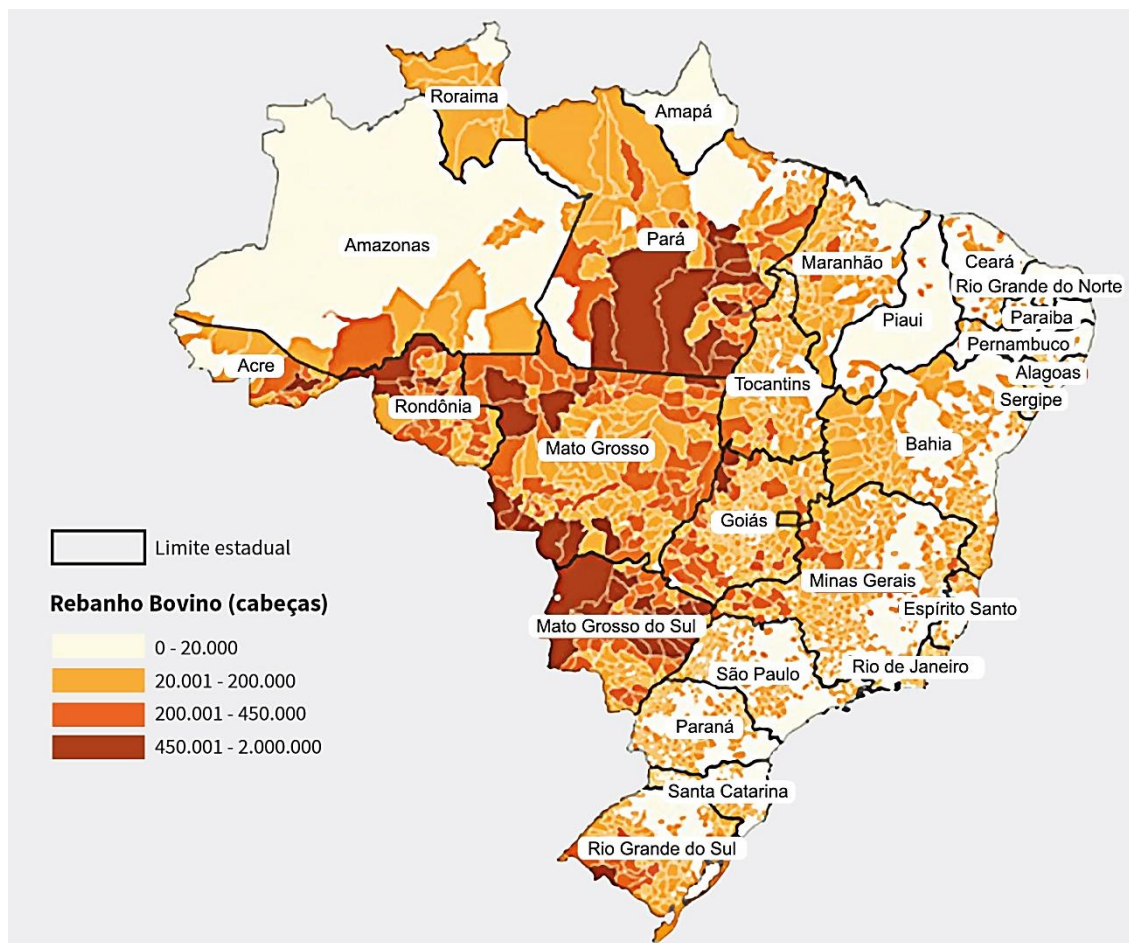


Figura 5. Distribuição do rebanho bovino no Brasil (ABIEC, 2018).

Quanto à concentração do rebanho bovino estimado por estado os 10 primeiros em ordem decrescente são: Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Pará, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo, Bahia e Paraná. Os estados brasileiros que apresentaram maior crescimento nos últimos 11 anos foram Roraima e Santa Catarina, com crescimento de 51,65% e 29,63%, respectivamente. O estado de São Paulo apresenta 128.238 propriedades com bovinos, participando com 73,34% de animais destinados exclusivamente para corte (**Figura 6**).

ESTADOS	REBANHO ESTIMADO EM 2017 (CABEÇAS) *	PARTECIPAÇÃO DO REBANHO DO ESTADO NO TOTAL DO BRASIL (%)	CRESCIMENTO DO REBANHO NOS ÚLTIMOS 11 ANOS (%)	PARTICIPAÇÃO DE ANIMAIS EXCLUSIVAMENTE DESTINADO A CORTE POR ESTADO (%)	NÚMERO DE PROPRIEDADES COM BOVINOS (UNIDADES)**
Mato Grosso	31.181.730	14,06%	19,63%	94,60%	82.558
Minas Gerais	23.856.968	10,76%	7,45%	41,36%	354.062
Goiás	23.213.738	10,47%	12,43%	68,51%	111.693
Mato Grosso do Sul	22.487.652	10,14%	-5,22%	94,65%	48.601
Pará	20.475.541	9,23%	16,99%	89,56%	83.688
Rio Grande do Sul	13.781.896	6,21%	-1,38%	77,16%	329.901
Rondônia	13.762.339	6,20%	19,84%	82,20%	63.273
São Paulo	11.481.365	5,18%	-10,23%	73,34%	128.238
Bahia	10.503.011	4,74%	-2,43%	56,97%	314.243
Paraná	9.680.494	4,36%	-0,86%	65,42%	211.936
Tocantins	8.739.554	3,94%	12,61%	86,56%	43.348
Maranhão	7.569.629	3,41%	14,46%	77,94%	93.263
Santa Catarina	4.486.325	2,02%	29,63%	34,64%	147.338
Acre	3.013.614	1,36%	22,86%	93,00%	18.626
Ceará	2.450.057	1,10%	4,14%	41,63%	124.456
Rio de Janeiro	2.403.790	1,08%	14,70%	51,15%	30.464
Espírito Santo	2.051.238	0,92%	-3,21%	53,80%	30.935
Pernambuco	2.039.198	0,92%	-2,67%	50,91%	140.226
Piauí	1.684.555	0,76%	-8,37%	80,72%	75.469
Amazonas	1.362.800	0,61%	9,61%	78,27%	13.782
Alagoas	1.273.845	0,57%	23,75%	64,74%	45.135
Paraíba	1.242.730	0,56%	13,72%	59,31%	92.024
Sergipe	1.211.760	0,55%	13,51%	49,51%	40.663
Rio Grande do Norte	910.307	0,41%	-11,39%	49,55%	47.480
Roraima	771.271	0,35%	51,65%	86,63%	4.732
Distrito Federal	98.514	0,04%	-0,23%	68,36%	1.597
Amapá	71.596	0,03%	-34,36%	72,23%	661
BRASIL	221.805.517	100,00%	206,63%	74,43%	2.678.392

Figura 6. Rebanho bovino brasileiro por estado. Fonte: Athenagro, IBGE * dados preliminares estoque no final do ano ** dados segundo último Censo – 2006 (ABIEC, 2018).

Avaliando a participação dos frigoríficos por região, o Brasil apresenta uma concentração maior de número de frigoríficos no estado de São Paulo e em suas proximidades, conforme mostra a **Figura 7** (ABIEC, 2018).

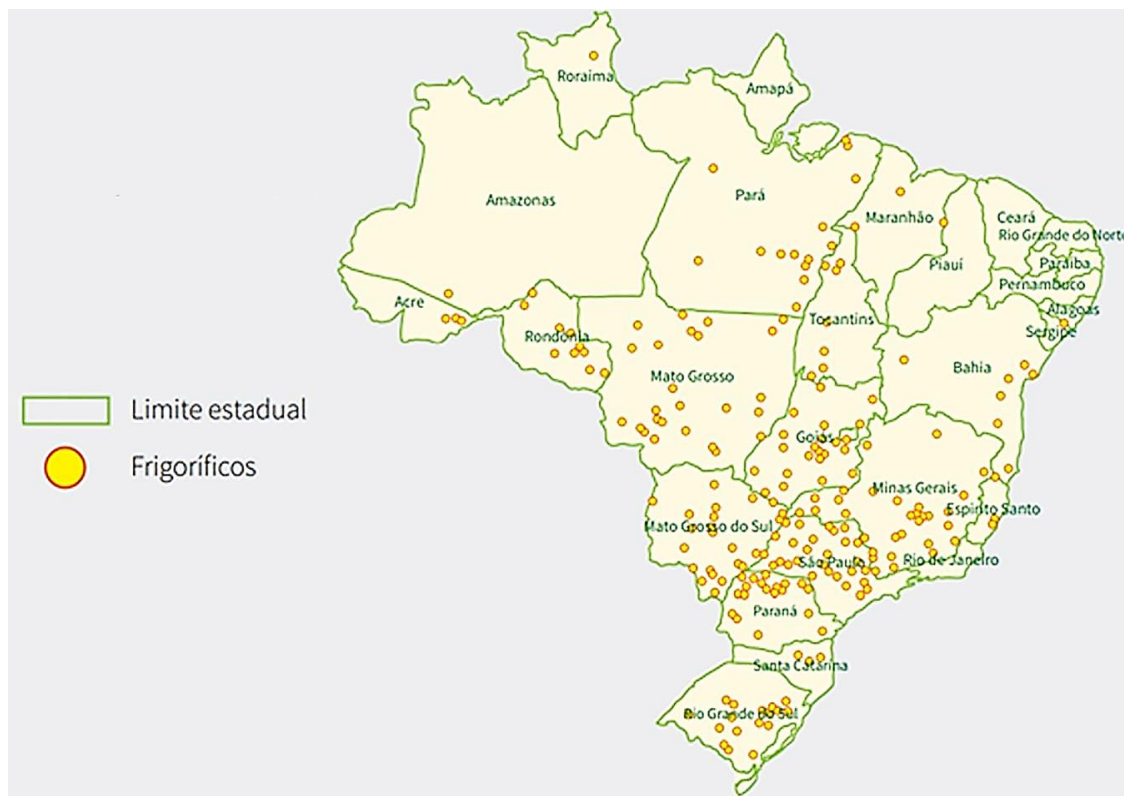


Figura 7. Localização dos frigoríficos de bovinos com serviço de inspeção federal (SIF) ativos em 2017 (ABIEC, 2018).

No estado de São Paulo, a prevalência de propriedades positivas para TBb, é de 9%. As prevalências nas diferentes regiões do estado variaram entre 3,5% e 13,9%. A prevalência de tuberculose no rebanho no estado de São Paulo foi estatisticamente igual à prevalência no estado do Espírito Santo e superior à prevalência observada nos estados como: Minas Gerais, Paraná, Bahia, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Goiás, Pernambuco, Santa Catarina e Distrito Federal (DIAS et. al., 2016).

Os autores Dias e col. (2016) concluíram que o estado de São Paulo tem a maior prevalência de TBb entre os estados brasileiros estudados. A doença ocorre em todo o estado, especialmente em fazendas leiteiras, que utilizam salas de ordenha ou máquinas de ordenha móvel, mas é mais concentrada na região norte do estado, uma área tradicional de produção de laticínios no país.

O MAPA indica que a média da prevalência nacional de TBb é de 1,3%, dados dos anos de 1989 a 1998. Caso esta média seja mantida, há a probabilidade de existir mais de 2 milhões de cabeças infectadas com TBb. Uma vez que aproximadamente 40% dos testes tuberculínicos positivos não

são notificados, a provável incidência pode estar além dos dados informados pelo MAPA (PARDO, et al.,2001; COLLINS, 2006; BRASIL, 2006; MAPA, 2018).

Um dos grandes problemas gerados por esta enfermidade é o prejuízo aos produtores, pois ocorrem descontos ou, até mesmo, descarte total da carcaça. Desse modo, uma vez sendo confirmado o resultado positivo, o mesmo deve ser abatido, sem ressarcimento, conforme prescrito no Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Com isso, abre-se porta para o mercado clandestino de animais e o comércio de carne contaminada com o *M. bovis* (MAPA, 2018), o que contribui para a manutenção da TBb nos rebanhos.

Da mesma maneira como no Brasil, a vigilância de abate é a espinha dorsal do sistema nacional de vigilância da TBb dos EUA. No entanto, o método de detecção visual da vigilância e inspeção de abate nos EUA foi estimada em apenas 28,5% nos animais, indicando que até dois terços dos animais infectados não seriam detectados no abate (USDA-APHIS, 2009).

Nos EUA, estudos revelam que surtos de TBb, entre 2005 a 2009, ocorridos em Minnesota (região norte dos EUA, com população de 5.576.606 habitantes e área total de 225.163 km²), envolvendo 12 rebanhos infectados, gerou um prejuízo estimado em 60 milhões de dólares, gastos gerados para investigação epidemiológica, despopulação e descontaminação de rebanhos infectados. Essa estimativa não inclui o custo dos esforços contínuos de fiscalização na região, nem o impacto econômico do surto na maior indústria de gado de Minnesota (BUHR et al., 2009 APUD KAO et al., 2018).

Lamentavelmente, o impacto econômico da TBb na bovinocultura brasileira não é calculável. Dados da ABIEC (2018) ressaltam que 20,74% (8,1 milhões) de cabeças de bovinos não são fiscalizadas, o que agrava mais a situação quanto à sanidade dos animais vendidos e/ou abatidos no Brasil **(Figura 8)**.



Figura 8. Abate por tipo de fiscalização – 2017. Fonte: *Valores estimados. Fonte: IBGE, Athenagro (ABIEC, 2018).

A projeção entre 2017 a 2027 revela um crescente aumento na ordem de 25% na produção de TEC, 50% nas exportações, 20% no consumo doméstico e 18% no abate, números expressivos nos próximos 10 anos (**Figura 9**). Este cenário terá como prioridade melhorias na fiscalização e diagnósticos mais precisos e assertivos de enfermidades infecciosas dos bovinos.

Variável	Unidade	1997	2002	2007	2012	2017	2022	2027
Rebanho Total	Mil cabeças	161	185	200	211	222	221	221
Produção	Mil TEC	5.922	7.537	10.644	9.704	9.756	11.850	12.169
Exportações	Mil TEC	309	986	2.324	1.692	2.032	2.708	3.061
Importações	Mil TEC	-	74	32	60	57	62	60
Consumo Doméstico	Mil TEC	5.612	6.626	8.352	8.072	7.733	9.205	9.168
Disponibilidade per capita	kg de carcaça/hab/ano	34	37	44	41	38	43	41
Consumo estimado de carne bovina	kg de carne/hab/ano	28	30	36	33	30	34	33
Abate	Mil cabeças	26.432	31.955	46.378	41.077	39.201	46.618	46.605
Área Pastagem	Mil hectares	186.521	185.590	184.253	174.999	164.957	158.677	156.397
Taxa de ocupação	cabeças/ha	0,87	1,00	1,08	1,21	1,34	1,39	1,41
Taxa de lotação	unidades animal/ha	0,61	0,70	0,76	0,85	0,94	0,98	0,99
Peso médio da carcaça	kg/cabeça abatida	224,02	235,88	229,51	236,23	248,87	254,19	261,10
Desfrute	Porcentagem	16%	17%	23%	19%	18%	21%	21%

Figura 9. Informações históricas e projeções da pecuária até 2027. Fonte: Athenagro, Secex/MDIC, IBGE. (ABIEC, 2018).

2.2. *Mycobacterium* - O patógeno secular

Os primeiros registros de tuberculose são muito antigos, tanto que a doença é considerada a mais velha companheira da humanidade. Estudos mostram que a prevalência de tuberculose na humanidade pode ser datada a mais de 500.000 anos atrás. O primeiro registro de DNA de *M. bovis* em humanos remonta à Idade do Ferro, em um cemitério de Aymyrylg, na região da Tuva, no sul da Sibéria, com antiga tradição de atividade de pastoreio há mais de dois mil anos atrás (PAES; FRANCO, 2016).

Ao longo do século 20 a doença foi diagnosticada e descrita por todo o Brasil. Textos científicos de grandes professores como Walter Mauricio Corrêa (FMVZ/UNESP, Botucatu, SP) e Osmane Hipólito (UFMG, Belo Horizonte, MG), estes ainda nos anos de 1940, alertavam sobre o perigo da tuberculose animal, seus prejuízos e riscos para a espécie humana. Com o advento da biologia molecular e seu emprego em estudos de paleontologia, foram descobertos importantes detalhes evolucionários e históricos da tuberculose (PAES; FRANCO, 2016).

Estudos revelam que uma bactéria ancestral comum teria dado origem à espécie *M. tuberculosis*, sendo o *M. bovis* a última espécie a surgir na escala evolucionária. Estima-se que o *M. tuberculosis* exista há mais de dois milhões de anos, enquanto que o *M. bovis* pode ter surgido há cerca de 67.000 anos. Constatando assim que o *M. tuberculosis* originou o *M. bovis* por mutações e deleções, conseqüentemente a doença evolui da espécie humana para os bóvidos (PAES; FRANCO, 2016).

O *M. bovis* é a causa mais comum de tuberculose em bovinos e em outros bóvidos. Em 1898, o patologista Theobald Smith mostrou que bacilos da tuberculose isolados de humanos e aqueles isolados de gado diferem em sua capacidade de infectar diferentes espécies animais. Apesar da aceitação de que o *M. bovis* diverge do *M. tuberculosis*, somente em 1970 que *M. bovis* foi oficialmente reconhecido como espécie (KARLSON; LESSEL, 1970).

2.3. Etiologia do *M. bovis* e *M. tuberculosis*

Quarenta anos se passaram desde que Karlson e Lessel (1970) apresentaram uma abordagem onde demonstraram que *M. bovis* é diferente do *M. tuberculosis*, como ponto de partida para tentar entender sua relevância clínica e aceitação geral. Da taxonomia numérica (testes bioquímicos) ao sequenciamento do gene 16S rRNA para o sequenciamento do genoma completo (WGS), a compreensão do CMT evoluiu. As novas espécies são descritas em um ritmo rápido, enquanto as relações taxonômicas são redefinidas em grande parte devido à acessibilidade do WGS.

Atualmente, o agente etiológico da TBb pertence à família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*, espécie *M. bovis* pertencente ao CMT juntamente com as espécies: *M. tuberculosis* (causa a TB humana), *M. africanum* (subtipos I e II, detectados em casos de TB humana no continente Africano), *M. canetti* (variante de *M. tuberculosis* encontrada na região de Djibouti e Somália), *M. microti* (causa TB em roedores), *M. caprae* (causador da doença em caprinos, bovinos e humanos), *M. pinnipedii* (causador da TB em leões marinhos e em humanos), *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin, derivado de *M. bovis* que, por cultivos sucessivos perdeu sua virulência, conservando a propriedade de proteção imunológica contra *M. tuberculosis* e *M. bovis*, sendo utilizado na vacinação de crianças) e mais recentemente, *M. mungi*, isolada numa população de mangustos (*Mungos mungo*) em Botswana (sul da África) e o *Dassie bacillus* (causador da TB em *Procavia capensis*) (COUSINS et al., 2003; BRITES et al., 2018).

As espécies de micobactérias do CMT são geneticamente similares. Apresentam 99,9% de homologia da sequência do gene 16S rDNA, embora apresentem diferenças fenotípicas, epidemiológicas e de patogenicidade.

Já foi relatada que a adaptação ao hospedeiro é uma importante fonte para diversidade de sequências entre genomas. Esta miscelânea pode ser facilmente revelada pela análise do padrão de uso de códons de organismos, que variam entre diferentes espécies de um único gênero, bem como dentro de espécies específicas. Conseqüentemente, a seleção natural e genômica da evolução de um organismo também pode ser determinada explorando variação de uso de códons, composição nucleotídica, expressão gênica, seleção mutacional, seleção translacional, riqueza de tRNA, interações de codon-

anticodon, aminoácidos e estrutura secundária de proteínas (SAHA et al., 2018).

O estudo de Saha e col. (2018) ainda contempla que o *Mycobacterium*, continua sua evolução para sobreviver em diversos hospedeiros. Os genes patogênicos micobacterianos são exclusivamente conservados e a análise desses genes pode revelar aspectos evolutivos do *Mycobacterium*.

Como comprovado, as diferenças de diversidade do micro-organismo podem ser avaliadas por uma região conservada do genoma bacteriano denominada 16S rDNA (gene 16S rRNA), eliminando as laboriosas técnicas de cultivo e melhorando o entendimento sobre a diversidade dos micro-organismos (CHOI et al., 2015)

O gene 16S rRNA codifica a subunidade ribossômica menor que é parte do sítio de ocorrência da síntese proteica e, portanto, está presente em todas as bactérias. Esse gene apresenta características conservativas ao longo da evolução e pode servir como indicador de como os micro-organismos estão intimamente relacionados durante a evolução em milhões de anos.

Segundo Riojas e col. (2017) uma análise filogenética das espécies do CMT demonstrou que *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedii* são sinônimos heterotípicos do *M. tuberculosis*, propondo formalmente uma união dessas espécies do CMT, reclassificando como sinônimos heterotípicos posteriores de *M. tuberculosis*. As espécies do CMT sofreram inúmeras alterações taxonômicas e de nomenclatura, deixando em dúvida a sua verdadeira estrutura. Os resultados desse estudo indicaram que todas as estirpes das espécies do CMT estão relacionadas entre si, portanto, de acordo com a similaridade encontrada foi recomendado o uso do termo infra-subespecífico "variante" ("var.") e designações infra-subespecíficas que geralmente retêm a nomenclatura histórica associada aos grupos ou, de outro modo, transmitem tais características, exemplo: *M. bovis*.

Segundo o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) esta nomenclatura já está em vigor, o *Mycobacterium bovis* já é intitulado de *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* (NCBI, 2019). Entretanto a comunidade científica ainda não aceitou essa reclassificação. Essa nova taxonomia proposta está sendo analisada e em discussão por especialistas do mundo todo.

2.4. Epidemiologia do *M. bovis* e *M. tuberculosis*

A TBb mesmo sendo endêmica em todo território brasileiro, ainda não possui calculada sua dimensão em termos de prevalência e distribuição nacional. Em todo o mundo, estima-se que 50 milhões de bovinos estão infectados com *M. bovis*, com perdas agrícolas de US \$ 3 a US \$ 4 bilhões por ano, demonstrando a importância de estudos que avaliem a sua prevalência (GARNIER et al., 2003; BRASIL, 2006; NEVES et. al., 2017; PALMER et al., 2019).

Em um estudo retrospectivo realizado por Smaniotto (2015), onde foram obtidos dados das atividades de rotina do SIF de um frigorífico localizado no Centro-Oeste do Estado de São Paulo, entre machos e fêmeas, durante os anos de 1995 a 2015, foram abatidos 5.240.138 bovinos, dos quais 4.381.587 eram machos e 858.551 fêmeas. Desse total verificou-se que durante o exame *post-mortem*, 0,15% (7.741) das carcaças tinham algum tipo de lesão sugestiva de tuberculose. Os resultados deste estudo demonstraram uma redução de 11 vezes na frequência relativa das lesões tuberculosas suspeitas encontradas durante o período avaliado, sendo que os maiores valores de tuberculose total foram obtidos em 1996 (0,41%) e os menores em 2015 (0,02%) conforme **Figura 10**.

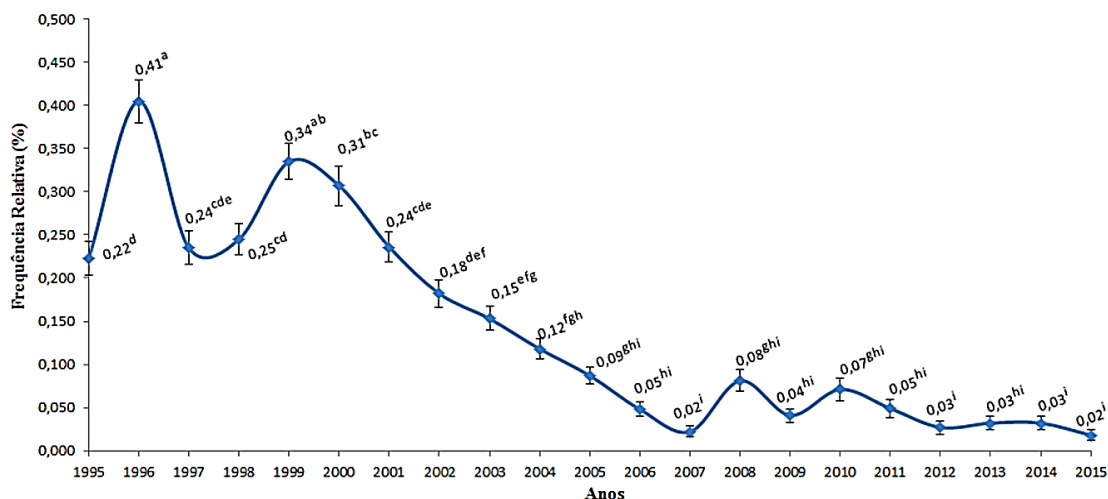


Figura 10. Ocorrência de tuberculose bovina de 1995 a 2015 em bovinos abatidos em um frigorífico do estado de São Paulo – SP, Brasil (SMANIOTO, 2015).

Este estudo evidencia que houve redução da ocorrência de TBb com o passar dos anos, o que provavelmente representa uma maior adequação às normas impostas pelos mercados importadores de carne bovina brasileira, a eficácia dos programas de controle e erradicação, maior conscientização dos produtores e melhores condições sanitárias dos rebanhos.

Esses fatores são positivos e decisivos para que o país continue com a condição de maior exportador de carne bovina e possa continuar atendendo os mercados mais exigentes. Entretanto sabe-se que a TBb está atrelada a economia do país. Com a dificuldade financeira do Brasil, há um crescimento na venda informal, ou seja, os "produtos artesanais", feitos em casa sem controle ou fiscalização, invadem o mercado como uma segunda renda familiar, assim disseminando muitos problemas, entre eles a TBb, pois abre-se porta para o mercado clandestino de produtos como derivados do leite (queijos, leite *in natura*) e carne contaminados com o *M. bovis* (SMANIOTO, 2015).

Os picos de aumento nos anos de 1996, 1999, 2008 e 2015 retratam a realidade do mercado informal de leite e carne que há no país, bem como a dificuldade da fiscalização territorial, esses picos provavelmente são de abates sanitários (SMANIOTO, 2015).

A proposta do PNCEBT foi elaborada por um grupo de trabalho instituído pelo MAPA em primeiro de junho de 2000, com participação de especialistas e

pesquisadores em epidemiologia, em medicina veterinária preventiva e em serviços de inspeção e defesa sanitária animal, sendo seu regulamento técnico revisto pela Instrução Normativa - IN nº 10, de 3/3/2017 (MAPA, 2018).

O PNCEBT visa o controle e erradicação da brucelose e tuberculose bovina e bubalina no Brasil, causadas por bactérias das espécies *Brucella abortus* e *M. bovis*, respectivamente. O objetivo é reduzir a prevalência e a incidência de brucelose e de TBb e bubalina, visando a erradicação (MAPA, 2018).

Desde o início do PNCEBT em 2000, a incidência de TBb foi significativamente reduzida, mas não erradicada, o que não desmerece o trabalho realizado no Brasil, já que nos EUA teve o início do programa de erradicação cooperativa estadual-federal da TBb em 1917, e mesmo com todo o aporte, infraestrutura, tecnologia, conhecimento e dedicação, não conseguiram erradicá-la também.

Embora o PNCEBT e as medidas de controle e vigilância da TBb estejam em vigor, as populações de animais infectados e os movimentos internacionais e interestaduais de animais, continuam a desafiar os esforços de erradicação em todo o mundo.

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde Animal, *World Organization for Animal Health* (OIE), 128 de 155 países-membros relataram a ocorrência de infecção por *M. bovis* e/ou doença clínica na população de bovinos durante o período de 2005 a 2008. Em outros países como, por exemplo, EUA, foram diagnosticados como fontes de infecção os animais recentemente adquiridos, animais silvestres e exposição a humanos infectados (PAES; FRANCO, 2016). No Brasil, há poucos dados científicos sobre animais silvestres como fonte de infecção.

O *M. bovis* possui preferência pela espécie bovina, porém outras espécies de mamíferos, tanto silvestres quanto domésticos, podem ser ocasionalmente acometidas (**Quadro 1**), incluindo a espécie humana. No entanto, os bovinos, caprinos e suínos são os mais suscetíveis (CONSTABLE et al., 2017; ABRAHÃO, 2005).

Quadro 1. Espécies acometidas pelo *M. bovis* já relatadas e seus pesquisadores (adaptado de RODRIGUEZ-CAMPOS et al. 2014).

ESPÉCIES ACOMETIDAS PELO <i>Mycobacterium bovis</i> JÁ RELATAS	PESQUISADORES
Bisões, búfalos e antílopes	Clancey, 1977; Bengis et al., 1996; Radunz, 2006; Wobeser, 2009; de Garine-Wichatitsky et al., 2010; Himsworth et al. 2010.
Topis (<i>Damaliscus korrigum</i>), kudus (<i>Tragelaphus sp.</i>)	Cleaveland et al., 2005.
Cabras	Cousins, 2001; Crawshaw et al., 2008; Cadmus et al., 2009; Daniel et al., 2009; Hiko e Agga, 2011; Broughan et al., 2013.
Ovelhas	Malone et al., 2003; Munôz Mendoza et al., 2012.
Camurça (<i>Rupicapra rupicapra</i>)	Bouvier et al., 1951.
Suínos domésticos e javali	Parra et al., 2003; Aranaz et al., 2004; Gostázar et al., 2005; Schmidbauer et al., 2007; Jenkins et al., 2011; Barandiaran et al., 2011; Di Marco et al., 2012; Bailey et al., 2013.
Cavalos (<i>Equus ferus caballus</i>)	Monreal et al., 2001; Keck et al., 2010.
Cães	Ellis et al., 2006; Shrikrishna et al., 2009.
Gatos	Aranaz et al., 1996b; Monies et al., 2000; Gunn-Moore et al., 2011.
Camelídeos (Camelidae)	(Veen et al., 1991; Barlow et al., 1999; Twomey et al., 2007, 2009; Ryan et al. 2008; Mamo et al., 2011)
<i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> : diferenças na suscetibilidade entre diferentes subespécies de bovinos	(Ameni et al., 2007; Smith et al., 2011).
Veados, gamos (<i>Dama dama</i>), alces (<i>Cervus canadensis</i>), javalis, raposas (<i>Vulpes vulpes</i>), texugos, lincos ibéricos (<i>Lynx pardinus</i>), coiotes (<i>Canis latrans</i>), guaxinins (<i>Procyon lotor</i>), lebres (<i>Lepus sp.</i>), coelhos (<i>Leporidae</i>), ouriços (<i>Erinaceidae</i>), gambá (<i>Trichosurus vulpecula</i>), coatis (<i>Nasua nasua</i>), capivaras (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>), leões (<i>Panthera leo</i>) e primatas	(Gallagher e Clifton-Hadley, 2000; Bruning-Fann et al., 2001; Coleman e Cooke, 2001; Pavlik et al., 2002a; Aranaz et al., 2004; Canto, 2006; Une e Mori, 2007; O'Brien et al. 2008; Balseiro et al., 2011; Murakami et al., 2012.
Antílope (<i>Taurotragos orix</i>), javali-africano (<i>Phacochoerus aethiopicus</i>), porco-vermelho-africano (<i>Potamochoerus porcus</i>), <i>Genetta tigrina</i> , leopardo (<i>Panthera pardus</i>), hiena-malhada (<i>Crocuta crocuta</i>), guepardo (<i>Acinonyx jubatus</i>), babuíno (<i>Papio ursinus</i>), impala (<i>Aepyceros melampus</i>), texugo-do-mel (<i>Mellivora capensis</i>).	Michel et al., 2006
Pinípede (selo cinza, <i>Halichoerus grypus</i>)	Barnett et al., 2013.

A tuberculose bovina é encontrada em bovinos em todo o mundo, provavelmente introduzido e distribuído pelo movimento de gado domesticado (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014).

O *M. bovis* é o responsável por causar TBb, enfermidade infectocontagiosa, granulomatosa crônica, de caráter progressivo em animais de produção e é de notificação obrigatória. É comumente uma doença crônica debilitante, mas ocasionalmente pode assumir um curso agudo, rapidamente progressivo (PAES; FRANCO, 2016).

Em bovinos, a via mais frequente de infecção é a respiratória, principalmente, em animais que permanecem estabulados. Em bezerros alimentados com leite proveniente de vacas com tuberculose ou em bovinos que bebem águas paradas contaminadas podem ocorrer infecções pela via digestiva (CORREA et al., 2007).

A prevalência é mais alta em animais mais velhos e de produção leiteira, em virtude da característica do sistema produtivo que permite a aglomeração e prolongada permanência destes animais na propriedade quando comparado aos de corte, os quais normalmente são abatidos mais jovens. Contudo, a aglomeração e a permanência de matrizes de cria e recria do gado de leite é a mesma observada no sistema de confinamento de gado de corte, o que faz com que também sejam submetidos às condições semelhantes, ou seja, de fácil transmissão da TBb (MORRIS et al., 1994; ABRAHÃO et al., 2005; SKUCE et al., 2012).

O tempo médio de detecção de TBb foi estimado nos EUA por meio da vigilância de abate em 5,8 anos de idade entre os rebanhos leiteiros, oriundos da Holanda, que é um país oficialmente livre de TBb (FISHER et al., 2005 APUD KAO et al., 2018).

No Brasil, a TBb concentra-se em criações intensivas, em bovinos leiteiros, na faixa etária entre 2,5 a 7 anos, por este deter a maior população bovina comercial (LOPES FILHO, 2010).

Estudos demonstram que a prevalência de animais infectados ocorre com maior frequência em propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção. O maior risco desta enzootia de TBb à saúde pública do Brasil concentrava-se no comércio de leite e derivados não pasteurizados, pois na década de 90, o mercado informal de

leite cresceu 52% no país, quase o dobro da produção formal no período (29%), que está atrelada aos problemas econômicos do país. Além da alta taxa de comércio informal do leite e dos derivados lácteos, o abate de bovinos clandestinamente para consumo humano permanece disseminado no país, o qual implica em risco ocupacional de infecção por *M. bovis*, principalmente para trabalhadores que lidam no abate dos animais e processamento da carne (ROCHA, 2013; MAPA, 2018).

A tuberculose em humanos é causada principalmente pelo *M. tuberculosis*; entretanto, doença indistinguível pode ser causada pelo agente zoonótico *M. bovis* (PALMER et al., 2019)

A importância do diagnóstico molecular na rotina e a aplicação de tal ferramenta molecular em laboratórios de saúde animal pode permitir o reconhecimento do *M. tuberculosis* de origem humana como fonte de infecção em bovinos. Além disso, uma identificação correta do agente causador no caso da tuberculose humana é essencial para o conhecimento epidemiológico e rastreamento da fonte de infecção do agente, bem como para a gestão e tratamento mais apropriado do paciente devido à resistência intrínseca do *M. bovis* à pirazinamida, um fármaco empregado no tratamento clássico de primeira linha de humanos. Quando o *M. bovis* é identificado como causa da infecção em humanos, é prescrito um tratamento com isoniazida, rifampicina e etambutol, em vez de pirazinamida. Vários desses casos mostram potencial de transmissão zoonótica e é importante destacar os benefícios da cooperação entre médicos e médicos veterinários (OCEPEK et al., 2005; ROMERO et al., 2011; KÖSER et al., 2012; RODRIGUEZ-CAMPOS et al. 2014).

Considerado o patógeno bacteriano mais importante dos seres humanos, o *M. tuberculosis*, apresentou 10 milhões de casos no mundo em 2017. O número de novos casos está caindo 2% ao ano, embora tenham ocorrido reduções mais rápidas na Europa (5% ao ano) e na África (4% ao ano) entre 2013 e 2017 (OPAS, 2019).

O *M. tuberculosis*, no entanto, também pode afetar animais, como mostrado em muitos estudos como pode ser observado no **Quadro 2**.

Quadro 2. Espécies acometidas pelo *M. tuberculosis* já relatadas e seus pesquisadores (adaptado de RODRIGUEZ-CAMPOS et al. 2014).

ESPÉCIES ACOMETIDAS PELO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> JÁ RELATAS	PESQUISADORES
Bos taurus	Lesslie, 1960; Ocepek et al., 2005; Prasad et al., 2005; Srivastava et al., 2008; Ameni et al., 2011; Fetene et al., 2011; Romero et al., 2011
Caprinos (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Cadmus et al., 2009; Hiko e Agga, 2011
Porcos domésticos (<i>Sus scrofa domestica</i>)	Mohamed et al., 2009; Jenkins et al., 2011
Gatos (<i>Felis silvestris catus</i>) e cães (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Clercx et al., 1992; Aranazet al., 1996b; Erwin et al., 2004; Parsons et al., 2008b; Martinho et al., 2013.
Aves	Hoop et al., 1996; Schmidt et al., 2008.
Animais de zoológico	Montali et al., 2001; Alexander et al., 2002; Une e Mori, 2007; van Helden et al., 2009; Angkawanish et al., 2010.

2.5. Singularidades do *Mycobacterium*

O termo micobactéria significa fungo-bactéria, em razão da estrutura de sua parede celular única, pois possui um conteúdo lipídico correspondente a 60% do peso seco da célula micobacteriana. Não se coram pelo método de Gram, mas são considerados Gram positivos. Coram-se por vários corantes básicos, mas não se descoram com a solução de álcool-ácido. Isto ocorre pela presença de ácido micólico, que faz parte dos lipídios que compõem a parede celular, impedindo a remoção do corante pelo álcool-ácido que os caracteriza como bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR), permitindo sua identificação por microscopia direta (COUSINS et al. 2003; BRASIL 2006; PAES; FRANCO, 2016).

A parede celular das micobactérias, consiste de um complexo (mAGP) arabinogalactano-peptidoglicano. A parede é responsável pela resistência inata aos antimicrobianos e desempenha um papel importante, para a sua virulência e viabilidade. Possui em sua constituição química diversos lipídeos, entre eles os ácidos micólicos que são responsáveis pela morfologia do bacilo e utilizados em testes de identificação das espécies e subespécies de micobactérias (BRASIL 2006; CAREL et al. 2014; GROENEWALD et al. 2014).

Os componentes da parede celular de *M. bovis* propiciam à bactéria extrema resistência ao meio ambiente e a muitos desinfetantes comuns constituindo-se em seus fatores de patogenicidade (PAES; FRANCO, 2016).

Embora intolerante à exposição prolongada ao calor, luz solar direta (por até 12 horas), ou condições secas, o *M. bovis* possui características resilientes sob condições adequadas: permanece viável até onze meses a temperaturas entre 12 e 24 °C, em ambientes escuros e úmidos. Permanece infeccioso por 6 a 8 semanas em fezes contaminadas. Mantém-se viável em água estagnada por 18 dias. Em condições favoráveis de temperatura, umidade e sombra, a viabilidade de *M. bovis* no meio ambiente pode ocorrer por mais de dois anos, porém, para que ocorra a multiplicação do agente, há necessidade de um organismo hospedeiro (PAES; FRANCO, 2016).

O *M. bovis* pode ser cultivado em meios de cultura específicos a base de ovo, como Stonebrink, onde o organismo se multiplica aproximadamente uma vez a cada 20 horas. Pode ser transmitido de animais para humanos e vice-versa. As principais vias de transmissão são pelo trato respiratório e gastrointestinal, a localização e extensão das lesões tuberculosas variam com a via de exposição (PAES; FRANCO, 2016).

Qualquer tecido corporal pode ser afetado, mas as lesões são mais frequentemente observadas nos linfonodos (particularmente da cabeça e tórax), pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio. Quando a infecção ocorre por via digestiva, as lesões irão se localizar principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. No entanto, podem atingir outros órgãos se ocorrer generalização do processo (OIE, 2018).

É uma bactéria de formato bacilar, sendo bacilos retos ou levemente curvados ou em forma de clava, que medem aproximadamente 4 µm de comprimento por 0,5 µm de largura, sem a presença de flagelos ou de cápsula, além de não ter formação dos esporos. Apesar das micobactérias não possuírem membrana externa e, se assemelharem às gram-positivas, seu alto teor lipídico confere diferenças estruturais importantes na parede. São micro-organismo intracelulares, que infectam e proliferam-se no interior de macrófagos (ABRAHÃO, 1999; PAES; FRANCO, 2016).

São destruídos pela pasteurização, calor, luz solar direta e pelos desinfetantes à base de fenol, formol e hipoclorito de sódio (ABRAHÃO, 1999;

ABRAHÃO et al., 2005; VERMA et al., 2014; ALZAMORA FILHO, 2014; JEMAL, 2016; FRANÇA et al., 2016).

Apesar de a literatura citar todos esses compostos, a bactéria é resistente a desinfetantes comuns, o que é mais eficiente na prática para eliminar o *Mycobacterium* é o fenol orgânico em solução de 3%, compostos como ortobenzil-paraclorofenol e p-terciário-butilfenol, a qual deve ser aplicada com bomba de aspersão nas paredes e no piso das instalações, após a total remoção de dejetos (PAES; FRANCO, 2016).

2.6. Patogenia e sinais clínicos da tuberculose bovina

A patogênese da TBb é similar a tuberculose humana em muitos aspectos, e os bovinos têm sido um modelo útil no estudo da tuberculose humana. Embora ambas as doenças sejam conhecidas há séculos, suas patogêneses não são completamente compreendidas, mas sabe-se que envolvem pulmões e linfonodos regionais em uma troca coordenada de células sob a influência de citocinas, quimiocinas e outros mediadores (PALMER et al., 2019).

O *Mycobacterium* spp. é um "adversário bem equipado" que se adaptou primorosamente como um patógeno intracelular. Estudos ressaltam a amplitude e agilidade das táticas empregadas por esse patógeno para garantir sua sobrevivência no ambiente intracelular (WARNER E MIZRAHI, 2007).

A persistência do *Mycobacterium* no organismo depende da sua capacidade de sobrevivência intramacrofágica no hospedeiro. Assim, a bactéria deve resistir aos mecanismos antimicrobianos ou subverter as vias de sinalização dos macrófagos para evitar a sua morte. Macrófagos são fagócitos da linha de frente de defesa imune do hospedeiro contra bactérias patogênicas. Ao contrário das bactérias que necessitam evitar a fagocitose para sobreviver, o *Mycobacterium* preferencialmente tem como alvo o vacúolo dos macrófagos. Esta aparente incongruência exige que o *Mycobacterium* tolere os efetores antimicrobianos dos macrófagos como baixa de pH e radicais reativos de oxigênio e nitrogênio ou ativamente subverter mecanismos celulares normais para evitar ser destruído (WARNER E MIZRAHI, 2007).

A internalização de patógenos invasores em vacúolos fagossômicos geralmente acaba na fusão do fagossoma com endossomas tardios e

lisossomos, o que culmina na destruição do invasor. O *Mycobacterium*, no entanto, impede essa fusão fagossomo-lisossomo, assegurando um ambiente intrafagossomal favorável para a bactéria. A parada da maturação do fagossoma é um processo complexo que não é totalmente compreendido, mas é provável que o processo seja multifatorial (WARNER E MIZRAHI, 2007).

Muitas são as condições que favorecem a inibição da formação do fagolisossomo, o qual se trata de um processo ativo, entre elas: íons cálcio não são liberados, o patógeno produz grandes quantidades de amônia, acesso do patógeno ao ferro intracelular, ação de lípidios sulfatados ou sulfolípidios da membrana celular, fator corda, glicolípidios fenólicos, fosfatidil-inositol e proteína ESAT-6, como pode ser observado no **Quadro 3** (PAES; FRANCO, 2016).

Quadro 3. Condições que favorecem a inibição da formação do fagolisossomo (Adaptado de PAES; FRANCO, 2016).

FATORES DE EVASÃO DO PATÓGENO	AÇÃO
Íons cálcio	Os íons cálcio não são liberados, havendo bloqueio da mobilização e da associação de proteínas mediadoras da fusão de fagossomo e lisossomo.
Amônia	O <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> produzem grandes quantidades de amônia que alcalinizam o meio no lisossomo, diminuindo assim a potência das enzimas lisossomais.
Ferro intracelular	Existe afinidade entre os sideróforos de <i>M. bovis</i> e os íons ferro (Fe^{3+}). O patógeno transfere o ferro para a micobactina (quelação dos íons), diminuindo a capacidade bactericida do macrófago.
Lípidios sulfatados ou sulfolípidios*	Liberação de derivados sulfatados a partir da glicoproteína da parede celular (trealose-2-sulfato), proteína retida no fagossomo primário pelo patógeno e impede fusão com os lisossomos maduros; Inibem a fosforilação oxidativa de mitocôndrias dos macrófagos.
Fator corda (Trealose 6,6-dimecolato)	Componente da parede celular de <i>M. bovis</i> ; Favorece a sobrevivência intramacrofágica; Hipervirulência da micobactéria; Inibe a formação do fagolisossomo induzida pelos íons cálcio (Ca^{2+}); Retarda a acidificação do lisossomo, inibe a respiração e a fosforilação oxidativa dos macrófagos; Diminui a produção de citocinas e óxido nítrico pelos macrófagos.
Glicolípidios fenólicos e fosfatidil-inositol *	Inibem os mecanismos bactericidas dos macrófagos; bem como a proliferação dessas células e dos linfócitos
Proteína ESAT-6	Contribui para a virulência das micobactérias; Mediadores da lise celular que inibem a produção de interleucina 12 (IL-12) por macrófagos; Afetam a sinalização dos receptores de células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ , além de impedirem a secreção de interferon-gama (IFN- γ), o que aumenta sobremaneira as lesões tuberculosas.

*componentes da membrana celular do bacilo.

O estado infeccioso da TBb pode levar de meses a anos para se desenvolver e produzir sinais clínicos, devido à sua lenta progressão. Muitas vezes, a doença está em estágios avançados antes que os sinais se tornem visíveis. Os animais infectados podem parecer estar em excelentes condições e não apresentam evidências de sinais, apesar da presença de lesões internas, que só são encontradas durante a inspeção de abate.

A principal lesão da tuberculose é o granuloma. É dentro do granuloma em desenvolvimento, onde o hospedeiro e o patógeno interagem; portanto, é fundamental entender as interações patógeno-hospedeiro em nível do granuloma. As citocinas e quimiocinas conduzem o recrutamento, atividade e função celular e determinam o sucesso ou fracasso do hospedeiro em controlar a infecção (PALMER et al., 2019).

A lesão marcante da tuberculose, independentemente do hospedeiro ou tecido, é o granuloma, resultante da infecção por um membro do CMT, este também pode ser referido como granuloma tuberculóide ou tuberculoso. O granuloma tuberculoso é uma lesão morfológicamente distinta na qual o tipo celular predominante é um macrófago modificado (epitelióide). Outros tipos celulares proeminentes encontrados nos granulomas são linfócitos e células gigantes multinucleadas, que se pensa serem formadas por meio da fusão de múltiplos macrófagos, embora achados recentes sugiram que células gigantes multinucleadas possam se formar por meio de uma distinta via de diferenciação de macrófagos induzida por inflamação persistente. O granuloma tuberculoso tem uma região central de necrose caseosa, circundada por macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas, com uma zona mais externa contendo um número crescente de linfócitos e plasmócitos ocasionais. Toda a massa de tecido necrótico e infiltrado de células inflamatórias é frequentemente encapsulada dentro de uma cápsula fibrosa de espessura variável (PALMER et al., 2019).

Em bovinos, como em humanos, acredita-se que a imunidade mediada por células, em contraste com a imunidade humoral, é central na resposta ao bacilo da tuberculose. De fato, uma resposta mediada por células mensuráveis a antígenos micobacterianos é o princípio subjacente tanto ao teste cutâneo da tuberculina quanto ao interferon-gama (IFN- γ) utilizados no diagnóstico de tuberculose humana e bovina. Importante na resposta antimicobacteriana

mediada por células de bovinos são as células T, especificamente, células T, CD4 e CD8. Esses tipos de células podem ser produtores de IFN- γ , cuja produção é uma característica chave da resposta periférica à infecção por *M. bovis* em bovinos. Juntos com o IFN- γ , o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é crucial para o controle de infecções por micobactérias e fundamental para a formação de granulomas organizados. Em contraste, a interleucina 10 (IL -10) regula a produção de IFN- γ (PALMER et al., 2019)

Em bovinos, os eventos envolvendo estas respostas celulares e bioquímicas críticas no local da infecção durante os primeiros 30 dias após a infecção por aerossol com *M. bovis* permanecem em grande parte desconhecidos. A compreensão dessas interações patógeno-hospedeiro precoce pode ser fundamental no desenvolvimento de ensaios diagnósticos aprimorados ou possíveis vacinas (PALMER et al., 2019).

A diferenciação entre infecção primária e doença constitui um dos grandes desafios encontrados na evolução da tuberculose (MOUTINHO, 2011).

Os principais reservatórios e fontes de infecção de *M. bovis* são os bovinos, bubalinos e caprinos, espécies que apresentam mais frequentemente a doença clínica. Ainda, merecem serem considerados os animais infectados que ainda não manifestaram a doença, ou seja, os portadores inaparentes, que são os grandes responsáveis pela contaminação ambiental e pela manutenção da doença na natureza. Portanto, é importante a identificação e eliminação desses animais (PAES; FRANCO, 2016).

O aparelho respiratório é a principal via de eliminação do bacilo da tuberculose entre os animais, pois 70% dos casos de TBb bovina são pulmonares. As gotículas em aerossol, contendo o bacilo, transmitem a enfermidade de forma aerógena, ampliando a disseminação do patógeno. As rotas de infecção nos bovinos são influenciadas por fatores como o ambiente, idade e manejo. A transmissão da tuberculose pela via respiratória é facilitada pelo comportamento natural do gado, especialmente em propriedades com alta densidade animal e significativo trânsito de animais (MORRISON et al., 2000; BRASIL, 2006; PAES; FRANCO, 2016).

Estudos indicam que baixas doses infectantes de *M. bovis* podem causar a doença clínica, comprovando que apenas uma Unidade Formadora de

Colônia (UFC) pode causar tuberculose pulmonar em bovinos (JOHNSON et al., 2007).

As secreções do aparelho respiratório também contaminam a água e os alimentos, possibilitando que o *M. bovis* ingresse no organismo de outros bovinos, via oral, causando tuberculose no sistema digestório. Animais com tuberculose nos linfonodos do mesentério eliminam o agente pelas fezes, que contaminam o meio ambiente, a água e os alimentos, possibilitando a disseminação do bacilo nas propriedades rurais (PAES; FRANCO, 2016).

A lesão inicial localiza-se no denominado complexo primário, que nos animais infectados pela via respiratória encontra-se nos linfonodos bronquiais e mediastínicos e parênquima pulmonar. Quando os animais são infectados pela via digestiva o complexo primário localiza-se, preferencialmente, nos linfonodos mesentéricos. A lesão primária pode permanecer localizada, estender-se dentro do pulmão ou disseminar-se pelos vasos linfáticos ou sanguíneos, afetando outros órgãos ou as membranas serosas. Quando se dissemina pela via sanguínea causa a denominada tuberculose de pequenos nódulos ou generalização precoce. Se a resposta imune inicial for ineficaz (resultante da baixa produção de TNF- α e/ou INF- γ , imunossupressão, condições estressantes, por doenças intercorrentes ou dose infectante muito elevada), o *M. bovis* pode escapar do foco primário em virtude da erosão de pequenos vasos sanguíneos e linfáticos (pelo crescimento de pequenos tubérculos nesses locais) (CORREA et al., 2007; CONSTABLE et al., 2017).

Pode ocorrer a difusão por via linfática e hematogênica maciça do bacilo por todo o organismo do hospedeiro, processo conhecido como generalização precoce, a qual acomete as membranas serosas de todos os órgãos e, por via hematogênica, que invade, principalmente, os parênquimas pulmonar e hepático. O parênquima mamário também pode ser acometido, estabelecendo-se lesões tuberculosas por toda a estrutura desse órgão. Nesse caso, os animais evoluem para estado de caquexia com graves problemas respiratórios. Essas lesões constituem a mais perigosa manifestação da doença, pois o leite pode infectar bezerros lactentes e humanos (ao consumirem, leite cru e seus derivados). Neste período, os animais representam grande fonte de infecção para os demais do rebanho e para os proprietários ou indivíduos com os quais mantem contato estreito (PAES; FRANCO, 2016).

Os sinais clínicos apresentados principalmente em bovinos podem apresentar-se da seguinte forma: na manifestação digestória o único sinal evidente é o emagrecimento progressivo, mas o animal alimenta-se normalmente; na manifestação respiratória, observam-se emagrecimento, intolerância ao exercício e/ou trabalho e cansaço após esforços mínimos, além de linfonodos retrofaríngeos e supra-escapulares aumentados. À auscultação pulmonar, identificam-se extensas áreas de silêncio, estertores, roce pleural, tosse crônica e descarga nasal mucopurulenta. O aumento dos linfonodos retrofaríngeos pode causar, em alguns casos, obstrução da faringe, meteorismo crônico e queda na produção de leite (CORREA et al., 2007; PAES; FRANCO, 2016).

2.7. Linfonodos

O órgão escolhido para ser pesquisado é o linfonodo, devido as células do sistema linfóide apresentarem características principais de defesa que protegem o organismo contra macromoléculas estranhas, vírus, bactérias e outros patógenos, e eliminam células alteradas e células do sangue envelhecidas ou danificadas. O tecido linfóide está presente em locais sujeitos à invasão de substâncias patogênicas e de micro-organismos (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

Os principais locais inspecionados na linha de abate estão contidos nas **Figuras 11 e 12**, indicados em vermelho.

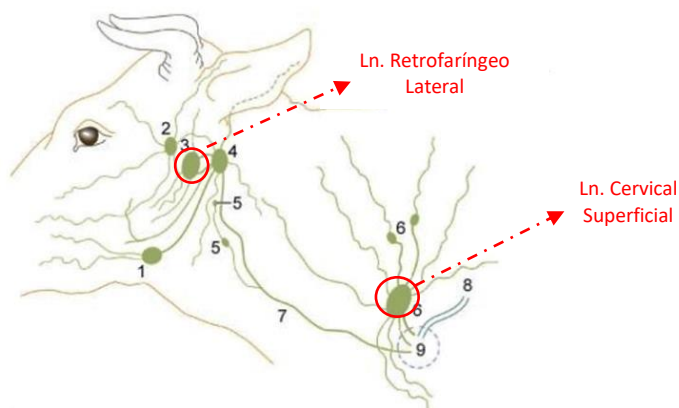


Figura 11. A drenagem linfática da cabeça e pescoço do bovino. 1. Linfonodo mandibular. 2. Linfonodo parotídeo. 3. Linfonodo retrofaringeo medial. 4. Linfonodo retrofaringeo lateral. 5. Linfonodo cervical profundo. 6. Linfonodo cervical superficial. 7. Ducto traqueal. 8. Ducto torácico. 9. Área em que vasos linfáticos entram em veias. Fonte: Dyce; Sack; Wensing, 2010.

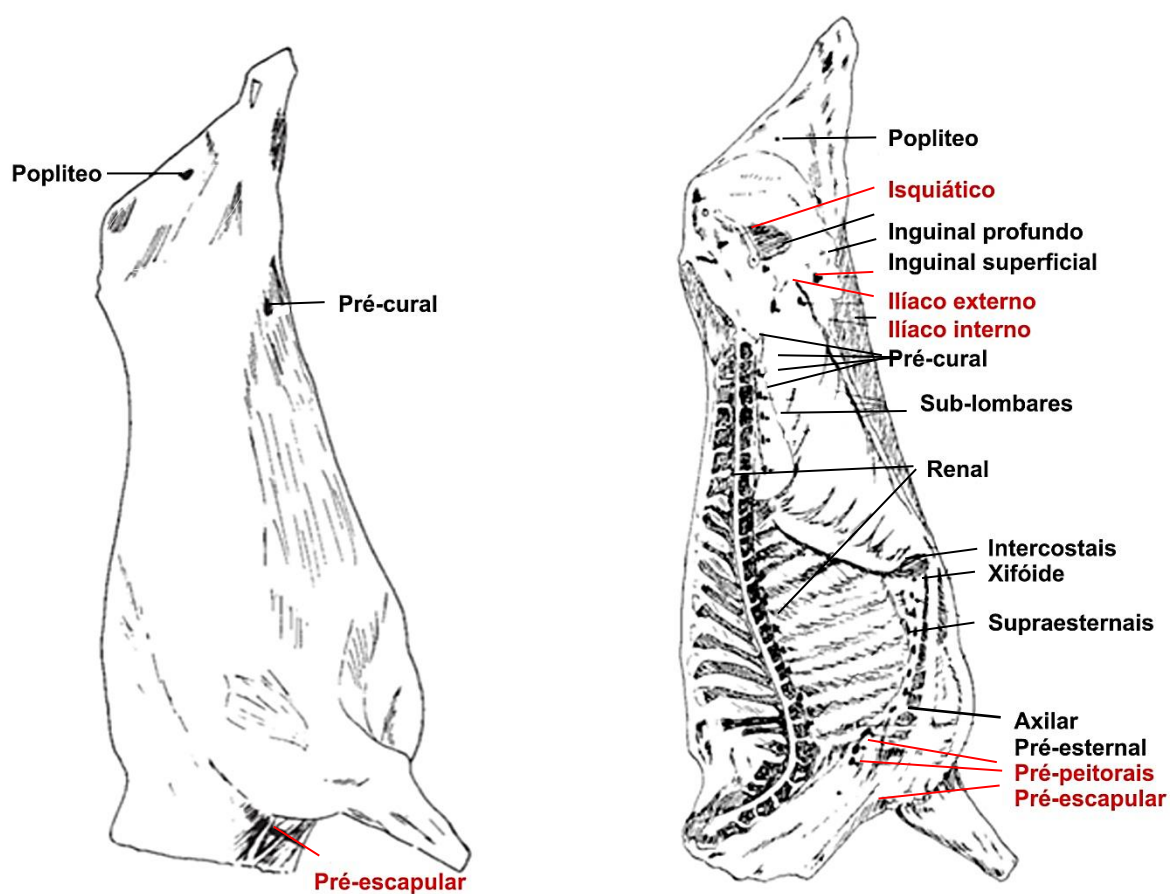


Figura 12. Principais linfonodos inspecionados durante o abate. Fonte: Adaptado de Wilson, 2005.

Estudos reportam que, durante a inspeção sanitária em abatedouros, nos animais em que foi observada apenas uma lesão causada por *M. bovis*, o linfonodo retrofaríngeo foi o local mais afetado, correspondendo a 43,9% dos casos avaliados (CORNER et al., 1990).

De acordo com Corner (1994), a inspeção de rotina só identifica cerca de 47% das lesões tuberculosas macroscopicamente detectáveis. Por isso, a inspeção mais detalhada poderia contribuir para a identificação das lesões tuberculosas durante o abate.

Segundo Brown e Anda (1998), os linfonodos mais afetados e que são os mais estudados são os mandibulares, os parotídeos, os retrofaríngeos, os mediastinais, os traqueobrônquicos e os mesentéricos.

Trabalhos anteriores apontam o envolvimento dos linfonodos retrofaríngeos (22,9 a 49,2%) nas lesões de TBb (CORNER et al., 1990).

Em dados relatados pelo PNCEBT, entre 70 e 90% dos casos, as lesões de TBb encontram-se em linfonodos da cabeça e tórax e em 66% dos animais necropsiados apenas uma única lesão visível. Além disso, em 95% dos casos, as lesões estão localizadas em linfonodos (mediastínicos, retrofaríngeos, bronquiais, parotídeos, cervicais, inguiniais superficiais e mesentéricos), pulmão e fígado, sendo ainda encontrados em menor frequência, no intestino e tecido mamário, ou em qualquer outro órgão ou tecido do animal (BRASIL, 2006).

Segundo estudo de Neves e col. (2017), os linfonodos mais afetados pelo *M. bovis* foram os bronquiais com 50,93%, seguido pelos mediastinais e parotídeos, ambos com 11,19%, retrofaríngeos, 8,11%, pré-escapulares 8,60% e a soma dos hepáticos, inguiniais e isquiáticos totalizaram 7,53 % dos casos.

2.8. O diagnóstico da tuberculose bovina e a Biologia molecular

O atraso no diagnóstico da TBb, tanto no âmbito da saúde animal como na saúde humana, é elencado como um dos principais fatores para a alta prevalência da doença. A persistência da TBb como preocupação sanitária mundial assenta-se no fato de que muitos casos permanecem sem diagnóstico, dificultando a detecção e controle da TBb.

Só com o surgimento da biologia molecular tornou-se possível o avanço das pesquisas e o aprofundamento dos conhecimentos sobre a complexidade do processo imunológico na tuberculose. Com esse avanço, as condições que

facultam ao *Mycobacterium* conviver com o hospedeiro por décadas sem conseguir multiplicar-se ou provocar lesões, além de não serem destruídos, foram melhor compreendidas (ROSEMBERG, 2001).

O diagnóstico precoce da TBb constitui-se em importante ferramenta para dar base ao planejamento e atividades de controle da doença.

Para o diagnóstico da TBb no animal vivo, são aplicados os testes de tuberculinização intradérmicos, os quais apresentam sensibilidade e especificidade muito variáveis entre eles, mas também podem ser utilizados os testes sorológicos (Elisa –*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* e IFN- γ), bem como testes moleculares. Já o diagnóstico *post-mortem* é baseado na avaliação das lesões macroscópicas e microscópicas muito características, método mais comum para comprovar a doença individualmente. As amostras processadas para exames histopatológicos podem ser submetidas aos métodos de colorações de rotina pela hematoxilina e eosina (HE) e especiais, como Ziehl Neelsen (ZN). A técnica de PCR e suas variações são mais comumente utilizadas em fragmentos de órgãos com lesões características ou em fezes de animais suspeitos (SOUZA et al., 2016).

É recomendável o diagnóstico bacteriológico por cultivo do agente, a partir de amostras teciduais, que é considerado padrão ouro, associado ao exame histopatológico, que permite a confirmação do diagnóstico (PAES; FRANCO, 2016; OIE, 2019).

Métodos tradicionais para o crescimento de micro-organismos em condições laboratoriais ainda são ineficientes. Desta forma, muitos destes na natureza ainda não foram estudados. Estima-se que aproximadamente de 1 a 10% dos micro-organismos podem ser isolados por método de cultura, em meio líquido ou sólido e taxas relativamente baixas de novos micro-organismos têm sido caracterizados e cultivados atualmente (SILVEIRA, 2004).

Estudando-se apenas os micro-organismos cultivados de uma lesão podem-se perder conhecimentos sobre as enfermidades infecciosas, já que o agente deve estar vivo para ser cultivado e ter crescimento em meio seletivo. Não é surpreendente que poucos diagnósticos precisos e assertivos relacionados com doenças infecciosas fossem dados. Antes das técnicas moleculares terem sido desenvolvidas, as informações a respeito de muitas doenças eram subjetivas e baseadas em sintomas e análise visual.

Para a identificação do *M. bovis* são necessários cuidados específicos com as amostras. No transporte dos espécimes clínicos para o laboratório devem-se tomar algumas precauções, tais como uso de recipientes plásticos selados, para preservar o material, prevenir e evitar contaminação. Os espécimes clínicos devem ser refrigerados ou congelados para inibir o crescimento da microbiota contaminante (OIE, 2004).

Uma diferenciação importante quanto ao crescimento em meio de cultura bacteriológica, do *M. bovis* e do *M. tuberculosis*, é quanto à restrição do glicerol, cujo componente é necessário para o *M. tuberculosis*, mas pode retardar o crescimento do *M. bovis*. Portanto no preparo do meio para esta micobactéria deve-se substituir o glicerol por piruvato de sódio (MOTA et al., 2001).

O período médio para o crescimento do *M. bovis* é de três a seis semanas. As características do crescimento e a morfologia colonial podem demonstrar um diagnóstico presuntivo. Entretanto, a confirmação é obtida por meio de avaliação bioquímica (PAES; FRANCO, 2016).

O sequenciamento do genoma completo de *M. bovis* revelou informações genéticas antes não disponíveis. Isolada na Grã-Bretanha em 1997, a cepa *M. bovis* AF2122/97, demonstrou ser altamente virulenta, possui 4.345.492 pares de base (pb) em seu genoma, organizado em um único cromossoma circular com conteúdo de guanina e citosina de 65%, em média. Contém 3.952 genes, incluindo um prófago e 42 elementos de inserção (Insertion Sequence - IS) (ZUMARRAGA et al., 2005; GARNIER et al., 2003).

A análise sequencial mostrou que o *M. bovis* quando comparado ao *M. tuberculosis*, possui 11 deleções variando em tamanho a partir de 1 a 12,7 kb, não possui um fragmento de 12,7 kb presente no genoma do *M. tuberculosis*, mostrando representar uma deleção em *M. bovis* em vez de uma inserção em *M. tuberculosis*. Portanto, o fragmento de 12,7 kb pode ser um marcador útil para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*. Surpreendentemente a sequência também contém apenas um locus em *M. bovis*, denominada TbD1, que está ausente na maioria das cepas de *M. tuberculosis* (GARNIER et al., 2003; ZUMARRAGA et al., 2005).

Portanto, de modo geral, a exclusão tem sido o mecanismo dominante na formação de seu genoma. Outras características distintivas do bacilo

bovino, por exemplo, uma mutação pontual, é o gene *pncA* que confere resistência ao fármaco pirazinamida. As análises sugerem que a variação dos componentes da parede celular e dos genes de expressão foram fundamentais para a evolução de *M. bovis* (ZUMARRAGA et al., 2005).

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas (LUDWIG, et al., 1997; KUSKE et al., 1997; HENTSCHEL, et al., 2002).

Vários métodos complementares estão disponíveis e consistem em avanços para o diagnóstico e o controle da TBb. Entre eles, encontram-se os métodos moleculares como a técnica de PCR e suas variações, como o PCR em tempo real (qPCR) e a *Transcriptase Reversa* PCR em tempo real (RT-qPCR) (WATERS et al., 2011; FURLANETTO et al., 2012; OIE, 2013).

Métodos moleculares, como os testes de amplificação de ANs e sondas de DNA, representam um método rápido, sensível e específico para a detecção de *M. tuberculosis* do que em culturas bacteriológicas. A maioria dos ensaios baseados na amplificação de ácidos nucleicos usa a sequência de inserção IS6110 ou MPT64 de *M. tuberculosis* como alvo específico para tuberculose (CHOI et al., 2015).

Choi et al (2015) cita que o 16S rDNA e 16S rRNA foram utilizados como alvos para desenvolver e melhorar o diagnóstico da técnica de qPCR para o CMT e conclui que a RT-PCR em tempo real de rRNA mostrou a mais alta sensibilidade e especificidade para o MTC em seu estudo.

No Brasil e no mundo, a pesquisa bacteriológica é o método de importância fundamental, tanto para o diagnóstico como para o controle e tratamento da tuberculose. No entanto, é um método laborioso, dispendioso e demorado (60 a 90 dias), sendo considerado o principal e oficial método para diagnosticar a doença com sensibilidade de 80 - 89% (SOUZA et al., 2016).

Já a qPCR apresenta sensibilidade aproximadamente de 99 - 100%. É uma técnica considerada rápida e eficiente permitindo o diagnóstico em poucas horas. Utilizada para detectar, caracterizar e quantificar ANs em “tempo real”, apresenta uma marcação fluorescente que permite a coleta de dados à medida que a PCR progride. Durante cada ciclo a fluorescência é medida e o sinal de fluorescência aumenta proporcionalmente à quantidade de DNA replicado e,

portanto, o DNA é quantificado em “tempo real” em poucas horas (48 a 72 horas) (SOUZA et al., 2016).

O 16S rDNA e 16S rRNA do CMT foram utilizados como alvos para desenvolver reações em qPCR mais sensíveis e específicas para melhorar o diagnóstico de CMT.

O RNA ribossômico 16S (rRNA) é um componente da pequena unidade 30S de ribossomos procarióticos, que tem aproximadamente 1500 nucleotídeos de comprimento e é codificado por 16S rDNA. O gene 16S rRNA é usado para estudos filogenéticos devido a sua sequência altamente conservada entre as bactérias, e tem sido amplamente utilizado para identificação genética bacteriana, pois contém regiões hipervariáveis que fornecem sequências específicas de espécies. O rRNA constitui 80% do RNA total e é estruturalmente mais estável que o RNA mensageiro (mRNA) (BAKER et al., 2003).

Além disso, rRNA está presente em 1.000 a 10.000 vezes mais cópias do que DNA genômico, o que implica que o rRNA, e particularmente o 16S rRNA, é um bom alvo para o desenvolvimento de ensaios com sensibilidade aumentada.

Uma sequência de inserção, IS1081, no genoma de *M. bovis* foi identificada e sequenciada. Essa sequência possui 1324 pb de comprimento com 15 repetições de repetição invertidas. Existem seis cópias de IS1081 no genoma de *M. bovis* e o elemento também está presente no *M. tuberculosis*. O IS1081 pode ser útil para manipulações genéticas e para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico para TBb baseado na reação em cadeia da polimerase (COLLINS; STEPHENS, 1991).

A PCR foi desenvolvida em 1983 por Kary Mullis e, três anos após sua criação, houve uma incrível expansão de seu uso graças ao descobrimento da Taq polimerase, uma polimerase que resiste a altas temperaturas. Em 1991, a primeira sonda de hidrólise foi usada em combinação com a técnica. Em 1992, a técnica foi novamente melhorada pelo uso do brometo de etídio, graças à fluorescência que resulta da ligação ao DNA duplex. A cinética do acúmulo de fluorescência durante a termociclagem foi diretamente relacionada ao número inicial de cópias de DNA. Este foi o ponto de partida da PCR em tempo real (KUBISTA et al., 2006).

Hoje, 25 anos após a descoberta de Mullis, tanto a PCR quanto a qPCR são tecnologias amplamente utilizadas. O princípio e o objetivo da tecnologia de PCR é aumentar especificamente um alvo a partir de uma quantidade indetectável de material de partida. Na PCR clássica, no final da amplificação, o produto pode ser executado em um gel para detecção deste produto específico. Na PCR em tempo real, esta etapa pode ser evitada, pois a tecnologia combina a amplificação do DNA ou RNA com a detecção imediata dos produtos em um único tubo (KUBISTA et al., 2006).

A PCR em tempo real, é também conhecida como PCR quantitativa, representada pela sigla qPCR, é um método molecular que surge como uma melhor alternativa para a redução do tempo necessário para a identificação do *M. bovis*, substituindo e superando, desta forma, os trabalhosos e demorados métodos microbiológicos e bioquímicos utilizados na identificação dessa bactéria (DROBNIEWSKI et al., 2013).

Na PCR em tempo real, a quantidade de DNA é medida após cada ciclo por meio de corantes fluorescentes que produzem sinal fluorescente crescente em proporção direta ao número de moléculas de cópias de fragmento de DNA alvo (*amplicons*) geradas. Os dados recolhidos na fase exponencial da reação fornecem informação quantitativa sobre a quantidade inicial do alvo de amplificação. Os repórteres fluorescentes usados em PCR em tempo real incluem corantes de ligação dupla de DNA (dsDNA) ou moléculas de corante ligadas a primers de PCR ou sondas que hibridizam com produtos de PCR durante a amplificação. A mudança na fluorescência ao longo do curso da reação é medida por um instrumento que combina ciclos térmicos com capacidade de varredura de corante fluorescente. Ao plotar a fluorescência em relação ao número do ciclo, o instrumento de PCR em tempo real gera um gráfico de amplificação que representa produção de cópias do produto ao longo da duração de toda a reação de PCR (THERMO FISHER, 2018).

As vantagens da PCR em tempo real incluem: capacidade de monitorar o progresso da reação de PCR como ocorre em tempo real, capacidade de medir com precisão a quantidade de *amplicon* em cada ciclo, o que permite uma quantificação precisa da quantidade de material de partida em amostras, um aumento da faixa dinâmica de detecção, amplificação e detecção ocorrem em um único tubo, eliminando manipulações pós-PCR. Nos últimos anos, a

PCR em tempo real tornou-se a principal ferramenta para a detecção e quantificação de DNA ou RNA (THERMO FISHER, 2018).

A qPCR, quando aplicada na identificação de micobactérias, é uma técnica rápida, sensível e específica, porém a escolha correta dos oligonucleotídeos (*primers*) é um dos pontos críticos para o sucesso da PCR no diagnóstico da tuberculose, além da viabilidade do ácido nucleico (livre de contaminantes que interferem na amplificação) e métodos de extração adequados para amostras paucibacilares (LIEBANA et al., 1995; WARDS et al., 1995; SAKAMOTO et al., 1999; ZANINI et al., 2001).

O número de bactérias presentes no tubo contendo a amostra a ser analisada é um fator relevante para que uma cultura de um espécime clínico seja positiva. São necessárias entre 10 a 100 células de *M. tuberculosis* no tubo. A PCR é capaz de detectar uma cópia de DNA de *M. tuberculosis*, como já foi demonstrado por Eisenach e col. (1990).

Embora alguns estudos tenham mostrado uma variação significativa na sensibilidade da qPCR de acordo com o método de extração utilizado, não há uma visão definitiva sobre o melhor método de extração e análise de DNA de *M. bovis* em amostras de tecido bovino (YOSHIKAWA et al., 2011; MOURA et al., 2016).

Para a otimização do diagnóstico da tuberculose, em humanos, pela PCR e para que sejam minimizadas as possibilidades de resultados falso negativos ou falso positivos, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), em 2016, padronizou e publicou um quadro de regras a serem seguidas. Se a pesquisa de BAAR de um paciente apresentar resultado negativo, devem ser realizadas duas PCRs. Sendo os dois resultados positivos, o diagnóstico de tuberculose é determinado; sendo um positivo e outro negativo, é necessário que se repita o procedimento e sendo os dois negativos, o diagnóstico de TB é negativo.

Entretanto, se a pesquisa de BAAR apresentar resultado positivo, e a reação de PCR for positiva, confirma-se o diagnóstico específico de *M. tuberculosis* e sendo negativa, a PCR é repetida. Esta segunda PCR, ao apresentar novamente resultado negativo, aponta para duas possibilidades: a presença de inibidores na reação ou a presença de micobactérias não pertencentes ao CMT no paciente (CDC, 2016). Em animais, ainda não existe

um protocolo de diagnóstico para qPCR aceito oficialmente pelos órgãos competentes, deixando uma grande lacuna no diagnóstico molecular da TBb, principalmente para animais de produção.

Estudos recentes nos Estados Unidos têm sugerido a substituição da cultura bacteriológica pela qPCR em abatedouros para o rastreamento e identificação de granulomas na linha de abate. Tal estudo ainda demonstrou a competência da técnica em detectar casos inicialmente classificados erroneamente como negativos para *M. bovis* (DYKEMA et al., 2016).

As características de alta sensibilidade e especificidade, aliadas à rapidez da resposta diagnóstica, estimulam sua utilização como ferramenta diagnóstica tanto para a identificação de patógenos em indivíduos isolados quanto para vigilância populacional. A qPCR é, portanto, considerada uma técnica promissora para o diagnóstico rápido da tuberculose bovina, que apresenta as vantagens de ser sensível e específica e de reduzir o tempo de diagnóstico quando comparada aos métodos tradicionais, sendo capaz de detectar poucos bacilos na amostra, inclusive os inviáveis (SALES et al., 2014).

2.9. Profilaxia

A administração pública exige algumas medidas de controle por meio de programas sanitários, entre as quais, animais detectados positivos ficam restritos à circulação, não podendo ser realizada a sua exploração, e esses devem ser abatidos no prazo máximo de 30 dias sob serviço de inspeção oficial indicado pelo serviço de defesa federal ou estadual. As medidas também se referem às atividades de controle como, a pasteurização de leite, testes tuberculínicos de animais suspeitos e de propriedades que solicitam a certificação como isentas da doença, bem como a eficiência da inspeção sanitária nos estabelecimentos de abate (BRASIL, 2006).

Por outro lado, as atividades devem ser realizadas de forma mais estruturada, em todas as etapas, como a fiscalização de rodovias por onde os animais trafegam, exigindo guia de trânsito animal com comprovação de exame negativo para tuberculose, a identificação dos positivos nas propriedades, a restrição de locomoção dos mesmos, exceto quando destinados ao abate em estabelecimentos cadastrados no Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI), a realização do abate sanitário, além da

colaboração dos produtores detentores de propriedades para aderirem ao programa de certificação de propriedades livre de tuberculose, com o objetivo de baixar a prevalência e incidência até conseguir a erradicação do território brasileiro (NEVES et al., 2017).

A tecnologia de qPCR é uma evolução do método de diagnóstico para a TBb nos frigoríficos, trazendo maior precisão e descartes assertivos para as linfadenites ou lesões menos clássicas da zoonose em questão, além de diminuir os prejuízos para o produtor e frigorífico.

2.10. Saúde Pública

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2014, apontou a tuberculose (TB) como a doença infecciosa mais mortal do planeta, superando a Aids. A OMS estima que menos da metade dos casos de TB são notificados, apontando o *M. tuberculosis* como responsável por 90% dos casos em humanos. O *M. bovis* infecta em média, entre o número de casos de tuberculose no mundo, 5% (0,5 a 7,2%) nos países desenvolvidos e 10 a 15% nos países em desenvolvimento (COSIVI et al., 1998; DE LARUA-DOMENECH, 2006; ROCHA et al., 2011).

Estima-se que a TBb tenha sido a causa de 10 a 18% de todos os relatos de casos de tuberculose em seres humanos existindo uma associação entre o número de casos humanos identificados e a prevalência da enfermidade na população bovina local, revelando-se um grave problema de saúde pública. A situação epidemiológica da TBb é conhecida em alguns estados do Brasil, no entanto, a evolução tem sido limitada pela dificuldade em engajar as cadeias produtivas de carne e leite como verdadeiros parceiros no processo (SAURET et al., 1992; DABORN et al., 1996; FERREIRA NETO et al., 2016).

Na América Latina, estima-se que 2% dos casos pulmonares e 8% dos extrapulmonares de tuberculose humana sejam desencadeados por *M. bovis*. Assim, de acordo com a Organização Pan-americana da Saúde surgem aproximadamente 7.000 novos casos de tuberculose zoonótica por ano, uma taxa de cerca de 2/100.000 habitantes (ROCHA, 2013).

Enfatizam-se algumas zoonoses, no contexto ocupacional de estabelecimentos de abate, ressaltando-se o papel dos gestores, assim como

dos médicos veterinários, na criação de uma cultura de segurança dentro da empresa, baseada na educação em saúde. Entende-se que a melhoria das condições de saúde ocupacional em abatedouros é um desafio, pois por mais elaborada que seja a gestão de saúde e segurança, o trabalhador precisa entender o porquê dessas medidas. É importante a formação de médicos veterinários com maior experiência frente às reais necessidades do setor, ao passo que promovem um elo entre a academia e os anseios da sociedade, redimensionando o seu papel social (DIAS, 2012).

Na linha de abate, as metodologias mais rápidas e baratas para averiguar a saúde do animal a ser abatido consistem de inspeção *ante-mortem* e *post-mortem*. Esta última, porém, apresenta certo agravante, que é a exposição dos trabalhadores. Estes entram em contato direto com a carne, sangue, vísceras, fezes, urina, secreções vaginais ou uterinas, restos placentários, líquidos amnióticos e fetos abortados de animais, que possivelmente podem estar infectados com micro-organismos zoonóticos (DIAS, 2012)

O *M. bovis* é transmitido aos humanos por contato com animais infectados e por ingestão de leite cru ou produtos lácteos, como por exemplo, o queijo fresco. Indiscutivelmente, a ingestão de leite cru contaminado constitui uma das principais formas de infecção humana pelo bacilo bovino. O risco para a saúde pública de se contrair o agente pela ingestão de produtos cárneos contaminados torna-se menor, devido à baixa incidência do agente em tecidos musculares e do hábito de não se comer carne crua no Brasil. Porém, tal risco não deve ser ignorado quando se leva em consideração o grande número de abates clandestinos, ou mesmo o abate de animais descartados de rebanhos positivos em matadouros municipais que não atendem às normas de inspeção exigidas pelo rigor da lei (DIAS, 2012).

Trabalhos realizados na Nigéria apontam a ingestão de carne contaminada como responsável por cerca de 45% dos casos de tuberculose em humanos causada pelo *M. bovis* (SOUZA et al., 1999).

Outro grave problema é a multirresistência ao tratamento. Existem poucos estudos que investigam a diversidade genotípica e resistência a fármacos em infecções de *M. bovis* em animais e humanos. Estudos apontam que possa haver *M. bovis* multirresistente (MDR) em pacientes hospitalizados

com HIV, demonstrando que a tuberculose zoonótica ressurgiu nos EUA fronteira com o México entre os imigrantes de regiões onde a TBb é endêmica (SALES, 2012).

Estudos no Brasil mostram que as estirpes de *M. bovis* obtidas a partir de gânglios linfáticos de bovinos investigadas por tipagem com oligonucleótido-espaçador (spoligotyping) e tipagem em repetição repetitiva de número variável de micobactérias intercaladas (MIRU-VNTR) apresentaram sessenta e sete isolados obtidos, dos quais 11 (16%) foram MDR-TB, 8 (12%) foram resistentes à isoniazida e 2 (3%) foram resistentes à rifampicina (FRANCO et al., 2017).

Devido ao contato direto e permanente com sangue, carne, vísceras e fluidos de excreções de animais potencialmente contaminados, são evidentes os perigos que envolvem a contaminação do trabalhador por agentes zoonóticos em abatedouros. Independente das afecções zoonóticas serem relatadas nos abatedouros e frigoríficos deve-se primar sempre pela educação e sensibilização de trabalhadores destas unidades, assim como dos seus gestores, pois os perigos não podem ser negligenciados ou descartados. Nesse contexto, os gestores da empresa, incluindo os médicos veterinários, ocupam papel de destaque, no que diz respeito às influências nas atitudes dos trabalhadores (DIAS, 2012).

Portanto é de extrema importância, ao aplicar o método de diagnóstico padronizado para TBb em amostras suspeitas de TBb, determinar o tempo gasto entre a chegada da amostra no laboratório e o resultado diagnóstico definitivo.

3. A FILOSOFIA *LEAN* E O *LEAD TIME* DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TUBERCULOSE BOVINA

Foi utilizado neste experimento a teoria do *Lean* ou cálculo do *Lead Time* para entender todas as etapas e conhecer cada resultado, obtendo o planejamento de todo o processo para determinar o tempo estimado entre o tempo gasto da coleta ao resultado final.

Em qualquer atividade onde os humanos estão envolvidos há diversas maneiras de se executar as tarefas. E executando as tarefas de diversas maneiras, eliminando as restrições quanto à segurança e à qualidade, o tempo é um dos ingredientes de maior relevância, pois é um dos fatores determinantes na elaboração do custo (LEAN, 2018).

Termos muito utilizados nas grandes corporações, o significado da palavra *Lean* acima de tudo é buscar o máximo com o mínimo em todos os aspectos. Máximo de lucratividade e qualidade por meio de máximo de redução de custos e tempo pela eliminação sumária dos desperdícios ou etapas dispendiosas. Já se entende por *Lead time* um intervalo de tempo compreendido entre o início e o término de uma atividade. Como se pode observar, o *Lead time* é um componente do planejamento e constitui-se em uma informação primordial no processo de qualquer tarefa, uma grandeza física.

A partir do cálculo do *Lead Time*, é possível ter uma visão sistêmica do tempo total gasto em todo o fluxo de valor. Desta forma, podem ser realizadas análises como: determinação do prazo de atendimento à demanda, produtividade, verificação de gargalos e otimização dos processos.

Portanto, é de extrema importância ao aplicar o método de diagnóstico padronizado nas amostras suspeitas determinar o *Lead time* de todo o processo, desde a chegada da amostra no laboratório de análise até o resultado definitivo.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um novo protocolo de PCR em tempo real com alta sensibilidade e especificidade para a diagnóstico direto de TBb em linfonodos de bovinos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Selecionar os melhores alvos (regiões genômicas) para a qPCR no diagnóstico da TBb e padronizar todo o protocolo desde a coleta da amostra à análise dos resultados;

4.2.2. Comparar a sensibilidade e especificidade analíticas do novo teste utilizando DNA genômico ou RNA ribossômico de *M. bovis* e *M. tuberculosis* como alvo;

4.2.3. Identificar, dentre as amostras suspeitas, as que são positivas pela cultura bacteriológica, considerada o padrão ouro, e/ou pelo PCR em tempo real padronizado para TBb;

4.2.4. Aplicar o teste padronizado em amostras provenientes de frigoríficos e determinar o tempo gasto entre a coleta e o resultado final (Δt ou *Lead time*).

5. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia do projeto está baseada no desenvolvimento de um protocolo de qPCR para diagnosticar a TBb em bovinos, bem como demonstrar seus benefícios visando auxiliar os programas de sanidade animal e de saúde pública, aumentando a precisão nos diagnósticos e diminuindo os descartes equivocados de carcaças suspeitas de TBb.

O presente estudo foi apreciado e aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Botucatu, SP, Brasil, conforme o protocolo nº 067/2018.

Os parâmetros para a metodologia de validação foram realizados de acordo com o *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, seguindo os "Princípios e métodos de validação de ensaios diagnósticos para doenças infecciosas" propostos no capítulo 1.1.6 (OIE, 2019).

5.1. Delineamento experimental

Área de estudo

Foram escolhidos dois frigoríficos que possuem Serviço de Inspeção Federal - SIF localizados na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo denominados Frigorífico 1 (Frigo 1) e Frigorífico 2 (Frigo 2). A capacidade de abate e o impacto socioeconômico do matadouro foi considerado: 80 a 90 animais/hora Frigo 1, 90 a 100 animais/hora Frigo 2, ambos são grandes exportadores de carne.

Os dois frigoríficos abatem de 600 a 620 animais por dia, em 26 dias por mês (exceto aos domingos, 4 por mês), o que gera um número de animais abatidos por mês em torno de 15.600 a 16.120 animais/mês.

A escolha pelos referidos frigoríficos foi baseada na importância econômica para a região, sua localização estratégica, próximo ao laboratório de análises das amostras, FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu (SP), bem como relatos de problemas com o aumento de descartes de carcaças com suspeitas de TBb analisadas subjetivamente.

Locais de processamento das amostras

Todos os procedimentos microbiológicos e moleculares foram conduzidos em dois locais e em duas etapas. A primeira etapa: recepção, análise e processamento das amostras (preparação da amostra) foram feitas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu (SP). A segunda parte: extração e amplificação de ácidos nucléicos foi realizada no Instituto de Biotecnologia – IBTEC, UNESP, Campus de Botucatu (SP).

Estes laboratórios realizam ensaios microbiológicos e moleculares e todas as suas atividades são conduzidas obedecendo às normas de Boas Práticas Clínicas e Laboratoriais.

5.2. Obtenção das amostras

Um total de 60 linfonodos foram coletados de acordo com o protocolo de coleta desenvolvido especialmente para o controle de contaminantes, evitando autólise e possíveis vazamentos como descrito no **item 5.4.** Colheita e acondicionamento das amostras. Dos 60 linfonodos, 30 foram de carcaças de bovinos suspeitos de TBb com lesões clássicas da doença (granuloma formado ou aspecto purulento cremoso), mais 30 foram de linfonodos de carcaças de bovinos sendo classificados com lesão tipo adenite (apresentavam um ou alguns pequenos nódulos), ambas lesões desclassificavam o lote para exportação.

As amostras foram mantidas congeladas nos frigoríficos e posteriormente transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu (SP) em caixas de transporte isotérmicas acondicionadas em gelo reciclável, e permaneceram congeladas à - 20 °C até os procedimentos microbiológicos e moleculares.

5.3. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão das amostras foram baseados na classificação do SIF como lesões sugestivas de tuberculose por meio da abertura dos gânglios linfáticos, incisão do parênquima de órgãos e avaliação de seus caracteres externos, sem distinções de raça, sexo ou idade.

Foram considerados suspeitos positivos os bovinos que apresentaram lesões compatíveis com infecção por *Mycobacterium* spp. nos gânglios linfáticos submaxilares, mesentéricos e/ou mediastínicos baseado subjetivamente em lesões características da doença que são obrigatoriamente examinados pelo Médico Veterinário oficial e/ou auxiliar oficial durante o exame *post-mortem*, de acordo com o artigo 171 do Decreto nº 9.069, de 2017 (**Anexo 1**), realizado pelo Serviço de Inspeção nas linhas de abate (**Figura 13**).

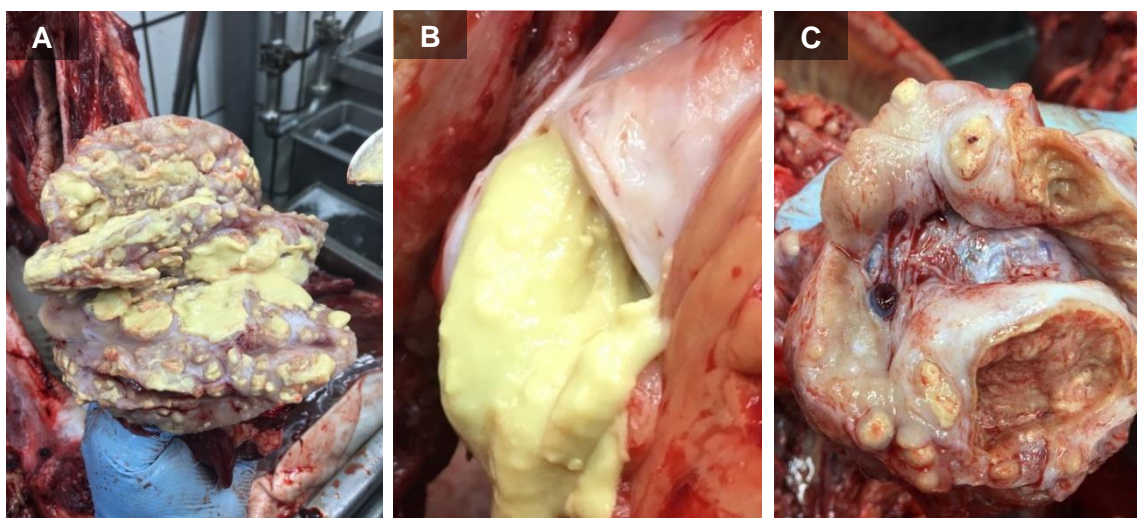


Figura 13. A, B e C. Linfonodos retrofaríngeos suspeitos de TBb apresentando lesões clássicas da doença.

Os animais eram procedentes de propriedades localizadas nos municípios do estado de São Paulo - SP. As carcaças acometidas por qualquer lesão suspeita de TBb foram direcionadas para o mercado interno e, de acordo com o grau da lesão e acometimento do órgão, receberam o tratamento adequado de acordo com a legislação vigente no momento (**Anexo 1**).

Os linfonodos com lesão classificados como adenite eram representados por lesões características apresentando um ou alguns pequenos nódulos (**Figura 14**).

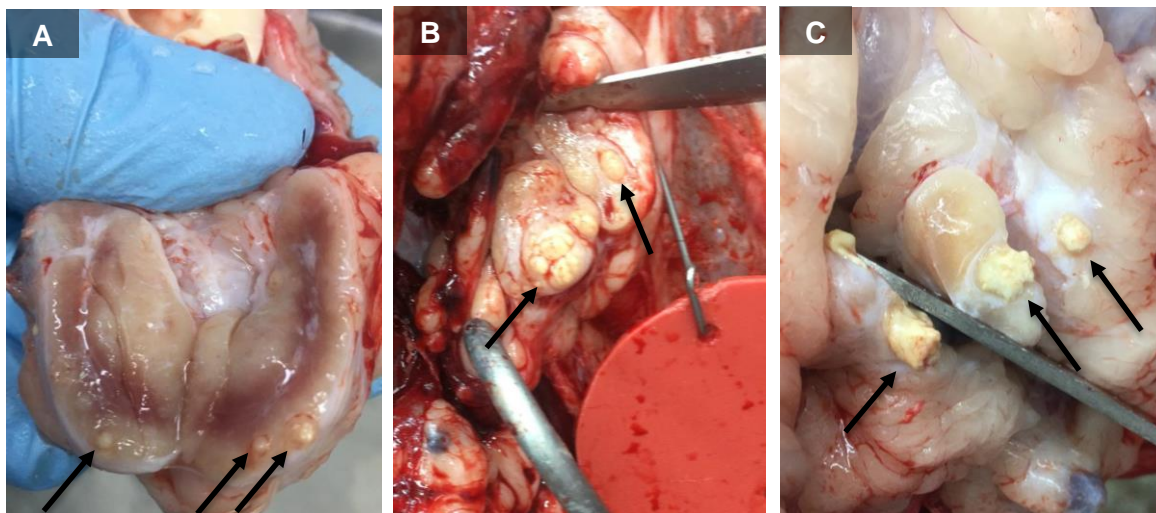


Figura 14. A, B e C. Linfonodos peitorais com adenite, apresentando pequenas lesões nodulares (setas).

Foram coletados alguns linfonodos sem lesões, provenientes de bovinos sabidamente saudáveis, sem sinais clínicos de qualquer doença infecciosa, que foram utilizados como controle negativo (**Figura 15**).

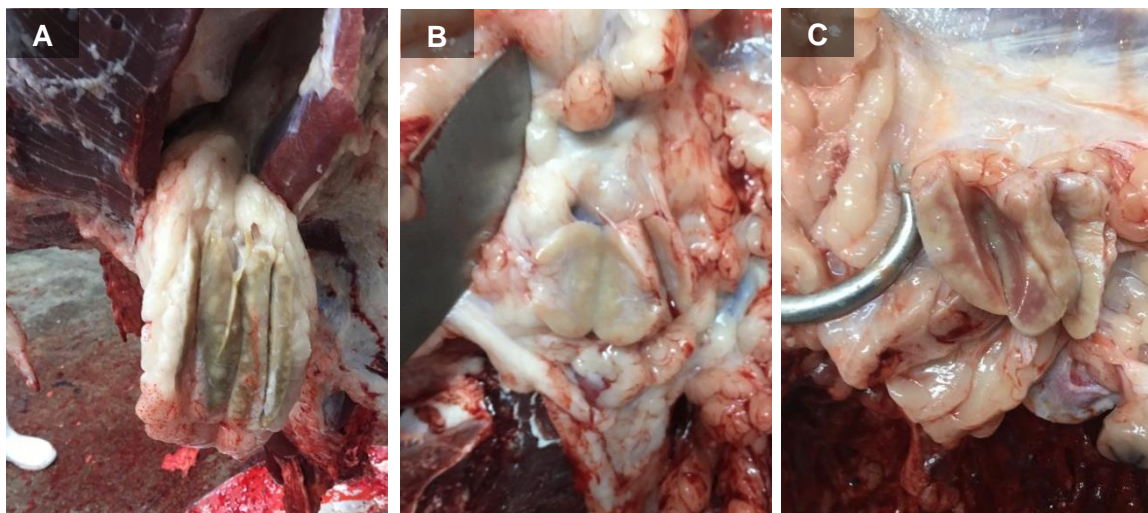


Figura 15. A, B e C. Linfonodos utilizados como controle negativo. **A.** Linfonodo pré-escapular, **B e C.** Linfonodos peitorais.

5.4. Colheita e acondicionamento das amostras

Os linfonodos foram coletados o mais assepticamente possível, colocados em um saco plástico estéril (21 x 15 cm), posteriormente armazenados em frasco de tampa rosca estéril (coletores universais estéreis), separadamente, fechados e etiquetados com: data, número do animal, número da amostra, procedência, nome do linfonodo coletado e sexo do animal). Em seguida colocados em um segundo saco plástico estéril (21 x 15 cm) para evitar possíveis vazamentos e/ou acidentes de quebra de frasco (**Figuras 16**). Após esse procedimento foram imediatamente congelados à - 20 °C.

O transporte entre o Frigorífico e o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu (SP) foi feito em caixas isotérmicas com gelo.

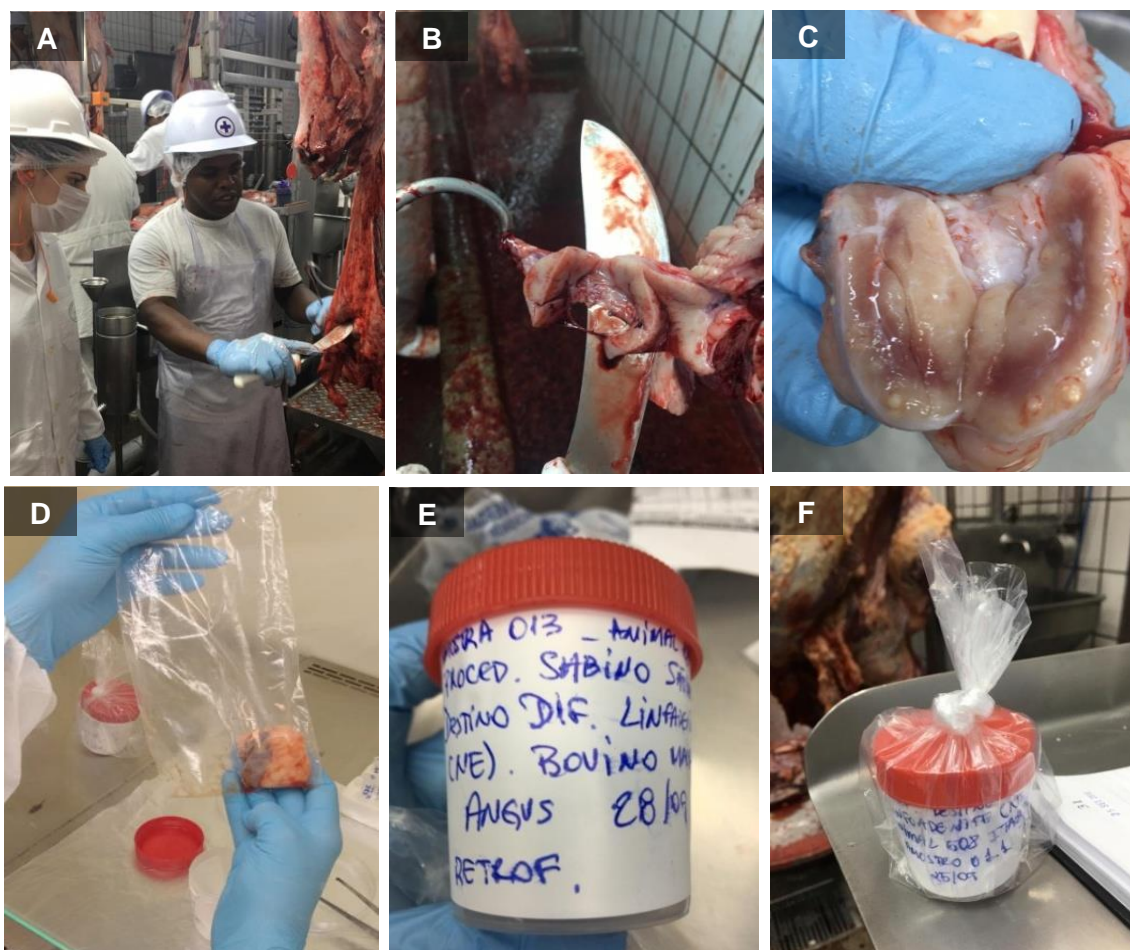


Figura 16. Coleta passo a passo da amostra de tecido de linfonodos suspeitos de TBb em frigoríficos do Centro-Oeste do estado de São Paulo. **A.** Inspeção do linfonodo na linha de abate. **B.** Cortes longitudinais no linfonodo. **C.** Lesão suspeita. **D.** Linfonodo coletado em sacos plásticos estéreis (21x15 cm). **E.** Frascos de boca larga com tampa rosca utilizados para armazenagem do linfonodo suspeito etiquetado com data, procedência, nome do linfonodo afetado. **F.** Frascos novamente embalados em saco plástico (21x15 cm).

5.5. Análise, preparação e processamento das amostras

Após análise das condições das amostras estas foram conduzidas para a realização do protocolo de preparação das amostras (**Figura 17**) e posteriormente para os procedimentos de caracterização com base em técnicas de cultura bacteriológica e identificação molecular.

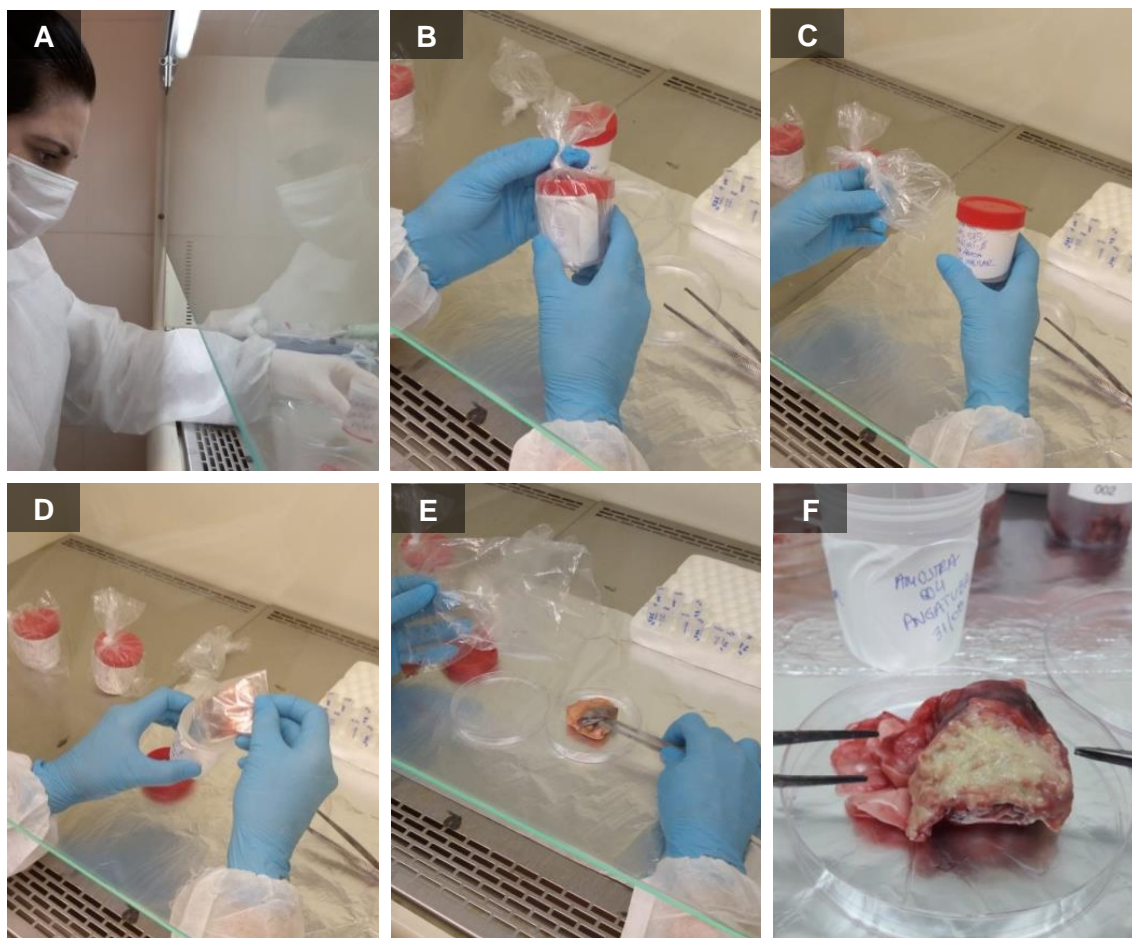


Figura 17. Análise das condições da amostra coletada. **A.** Análise da embalagem e temperatura da amostra. **B.** O frasco deve estar fechado e sem vazamento. **C.** Verificação dos dados contidos na etiqueta do frasco. **D.** Abertura da segunda embalagem da amostra. **E.** Retirada do linfonodo da embalagem e análise mais detalhada em uma placa de Petri. **F.** Linfonodo suspeito de TBb apresentando lesões clássicas da doença.

As amostras de tecidos foram retiradas de linfonodos de bovinos, de um local com maior intensidade da lesão. Como as micobactérias tendem a concentrar-se no granuloma, foram coletados do centro e das bordas da lesão do órgão acometido, cortadas em pequenos fragmentos com tesoura e pinça cirúrgica estéril, com aproximadamente 1 cm x 1 cm, equivalente ao redor de dois gramas de lesão granulomatosa e tecido linfóide. Em seguida, uma parte desse tecido foi colocada em microtubos de 1,5 mL (*safe-lock*) contendo 0,5 ml de pérolas de zircônia (1.4 mm zirconium oxide beads - Bertin Technologies,

França) até atingir 1 ml no microtubo e completado o volume do tubo com salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2. Em seguida os tubos foram lacrados com Parafilm M® (SigmaAldrich – Merck). As amostras por fim foram maceradas em um homogeneizador de tecidos, PRECELLYS® (**Figura 18**).

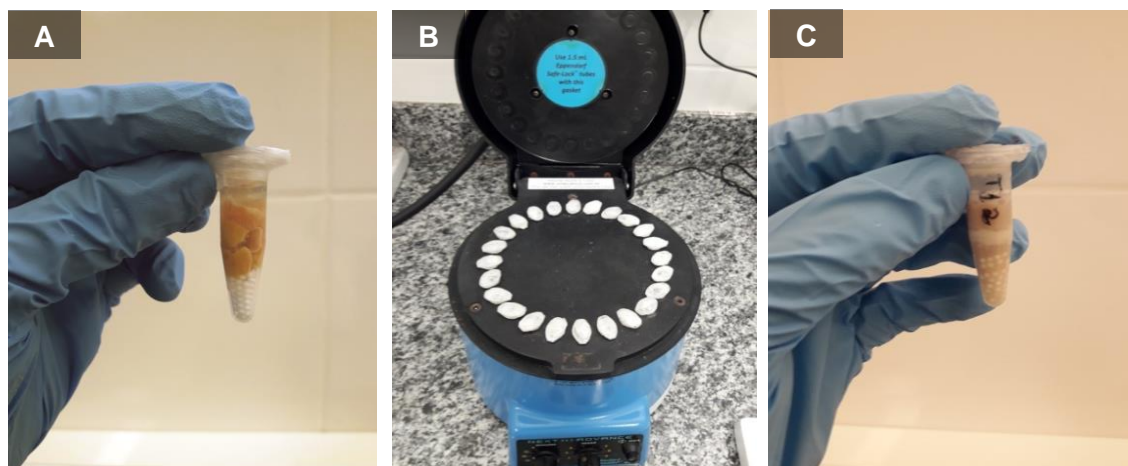
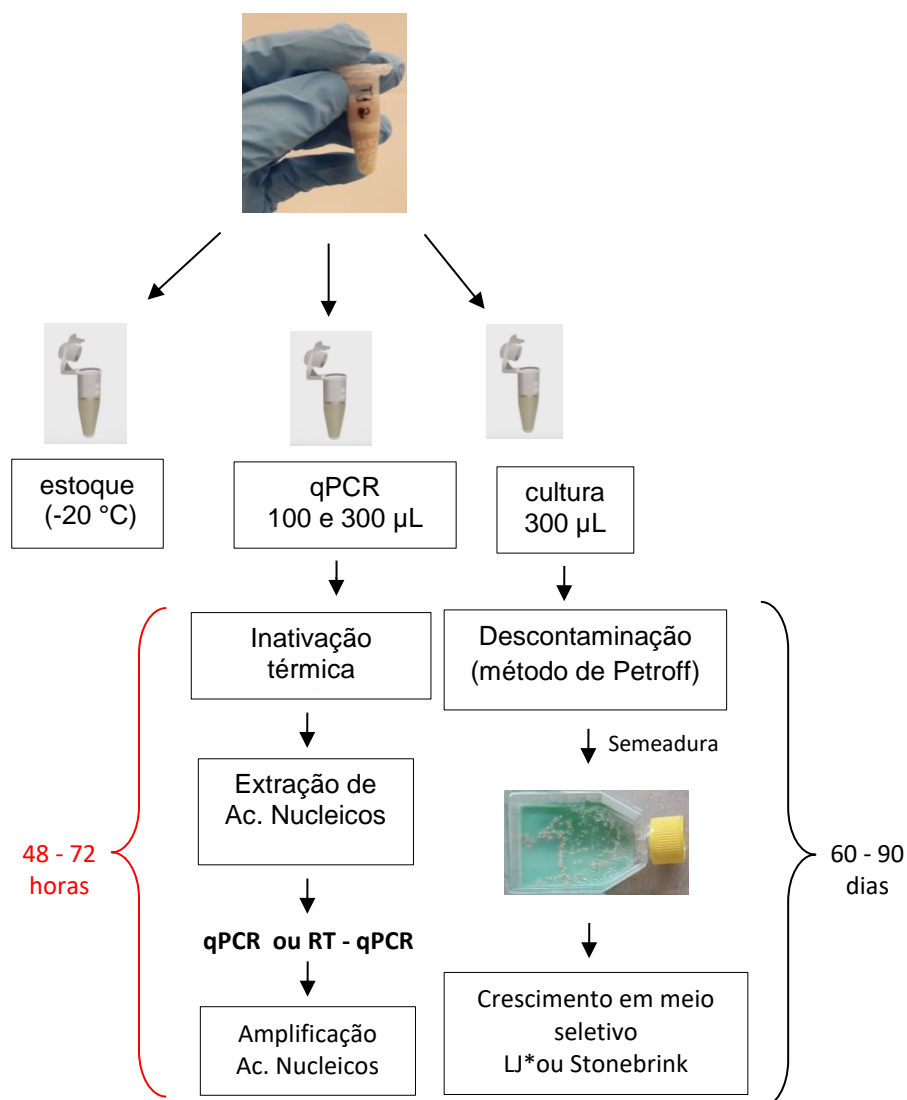


Figura 18. Processo de maceração da amostra. **A.** Amostra de tecido de linfonodo em microtubo *safe-lock* com PBS e pérolas de zircônia. **B.** Homogeneizador mecânico utilizado para macerar tecidos, PRECELLYS®. **C.** Amostras após passar 12 minutos em velocidade nº 9 no macerador mecânico PRECELLYS®.

Após a maceração mecânica, o homogeneizado foi distribuído em três partes iguais: uma para fazer o protocolo de extração de ácidos nucleicos, outra parte para realização da cultura microbiológica e uma terceira parte para estoque (**Fluxograma 1**). Todas as alíquotas foram padronizadas em 100 μ L e 300 μ L, de acordo com o recomendado no protocolo de extração utilizado (fabricante). A alíquota designada para cultura microbiológica passou pelo processo de descontaminação, Método de Petroff, segundo o método descrito por Côrrea e Corrêa, 1977.



*LJ: Lowenstein Jensen meio de cultivo para o *M. tuberculosis*.

Fluxograma 1. Distribuição da amostra após a maceração e fluxo de trabalho com as alíquotas de 100 µL e 300 µL destinada para a técnica de qPCR, 300 µL para a cultura bacteriológica e o restante para o estoque.

5.6. Análises microbiológicas

A cultura micobacteriana foi realizada logo após a maceração do tecido. O volume de 300 µL foi transferido para um novo tubo de eppendorf de 1,5 mL, adicionado ao tubo igual volume da solução de NaOH 8%, a 1 N, com uma gota de indicador (bromotimol). A solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos, incubada em estufa a 37 °C por 30 minutos. Em seguida adicionado H₂SO₄ 8%, gota a gota até a viragem de cor, equilibrando o pH, homogeneizado novamente em vórtex por 30 segundos, centrifugado por 15

minutos a 3.000 rpm, desprezado o sobrenadante e iniciado o processo de quatro lavagens com solução fisiológica, protocolo de acordo com citado por Côrrea e Côrrea (1977). Após a descontaminação, a amostra foi inoculada em meio seletivo de Stonebrink e Lowestein Jensen e acompanhado o crescimento semanalmente, por 90 dias.

5.7. Análises moleculares

5.7.1. Padronização da extração de DNA e RNA a partir de amostras de tecido de bovino

As amostras selecionadas para biologia molecular foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ após serem homogeneizadas pelo PRECELLYS®. Foi utilizado o Kit MagMax CORE® da Thermo Fisher, USA, como indicado por Dykema e col. (2016). Esse método extrai DNA e RNA ao mesmo tempo. Como regra geral, o DNA e RNA foram extraídos da amostra congelada e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As alíquotas de 100 e 300 μL foram utilizadas para a extração manual, de acordo com as instruções do fabricante. ANs foram extraídos e em seguida armazenados à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua utilização (**Figura 19**).

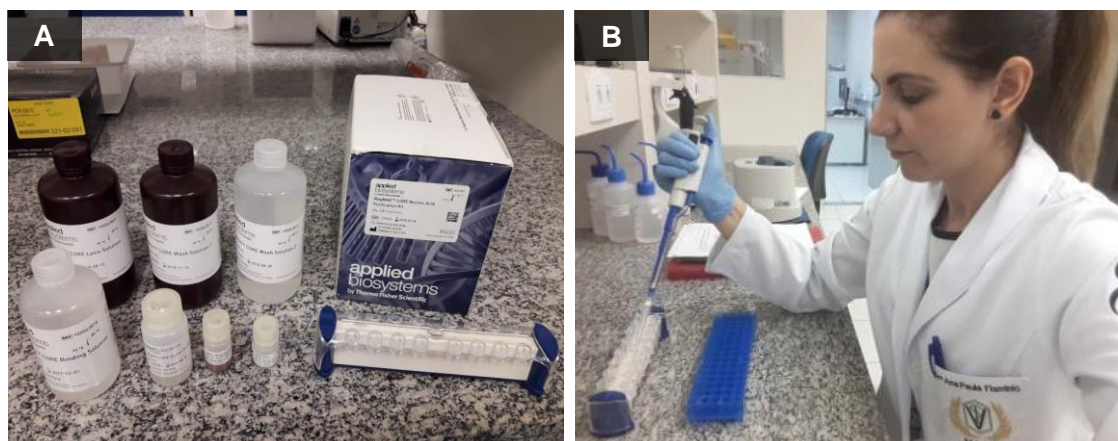


Figura 19. A. Kit de extração com estante magnéticas e reagentes - kit MagMax CORE® - Thermo Fisher, extrai DNA e RNA ao mesmo tempo. B. Extração manual dos ac. nucléicos com a tecnologia das microesferas (*beads*) magnéticas.

O Kit MagMax CORE®, da Thermo Fisher, utiliza a técnica de extração por microesferas (*beads*) magnéticas (**Figura 20**).

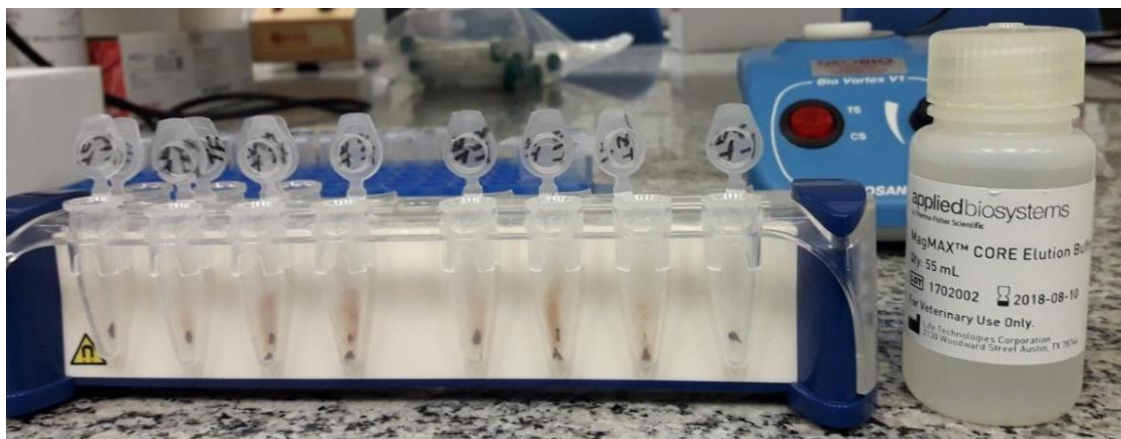


Figura 20. ANs extraídos pela técnica de extração por microesferas (*beads*) magnéticas. Processo que utiliza uma estante magnética e microesferas que são adicionadas para a captura magnética dos ANs. O kit apresentado extrai DNA e RNA ao mesmo tempo.

5.7.2. Controle positivo e negativo para padronização do teste diagnóstico para tuberculose bovina

Os controles positivos utilizados foram cedidos pela USP - SP e preparados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ - UNESP, Botucatu, SP, sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Carlos Paes. A cepa de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv foram cedidas em garrafas de cultura com crescimento de mais de 60 dias.

Preparação do inóculo de *M. bovis* AN5: uma alçada contendo bacilos de *M. bovis* AN5 em fase de crescimento em meio de Stonebrink foi ressuspensa em solução fisiológica, homogeneizadas com pérolas de zircônia no vórtex por 10 minutos para realização do teste de turbidez, feito pela escala nefelométrica de *Mc Farland* que é o padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia (MCFARLAND, 1907).

A cepa foi diluída até a obtenção da concentração equivalente a escala 1 de *Mc Farland*, correspondente a 3×10^8 bacilos/mL, posteriormente alíquotas de 100 μ L (3×10^7 bacilos) e de 300 μ L (9×10^7 bacilos) foram utilizadas para a extração.

A padronização da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv foi realizada da mesma maneira como descrito acima.

As cepas de referência foram utilizadas para a padronização dos parâmetros da reação e avaliação da sensibilidade da qPCR e/ou RT-qPCR em relação à quantidade de cópias do genoma de *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis* que seriam detectadas por essa técnica.

Já o controle negativo foi utilizado um linfonodo de um bovino sabidamente sadio, sem sinais clínicos de qualquer doença infecciosa, e pela confirmação da negatividade por cultura bacteriológica para CMT e a não amplificação na reação de qPCR e PCR.

5.7.3. Desenvolvimento e escolha dos oligonucleotídeos

Foram selecionados os oligonucleotídeos já descritos na literatura (**Tabela 1**), para identificação de *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Um dos *primers* (16S RPRC) utilizados no presente estudo foi desenhado a partir da sequência do *M. bovis* (*acession*: NC_002945) disponível no banco de dados no *GenBank* (NCBI).

Primeiramente a sequência dos *primers* foi submetida ao *Primer BLAST* para verificação de polimorfismo. O alvo IS1081, escolhido para o *M. bovis* e *M. tuberculosis*, foi alinhado com o genoma das sequências de micobactérias disponíveis no *GenBank*. Após verificação das regiões polimórficas os iniciadores foram desenhados no programa *Geneious* v. 6.0.3 (Biomatters, 90 Auckland, Nova Zelândia) e, analisados no programa *OligoAnalyser* 3.1 (IDT, EUA) para verificação das estruturas secundárias e dos dímeros formados. A especificidade analítica *in silico* dos iniciadores foi testada com o programa o *Primer BLAST* (**Figura 21**).

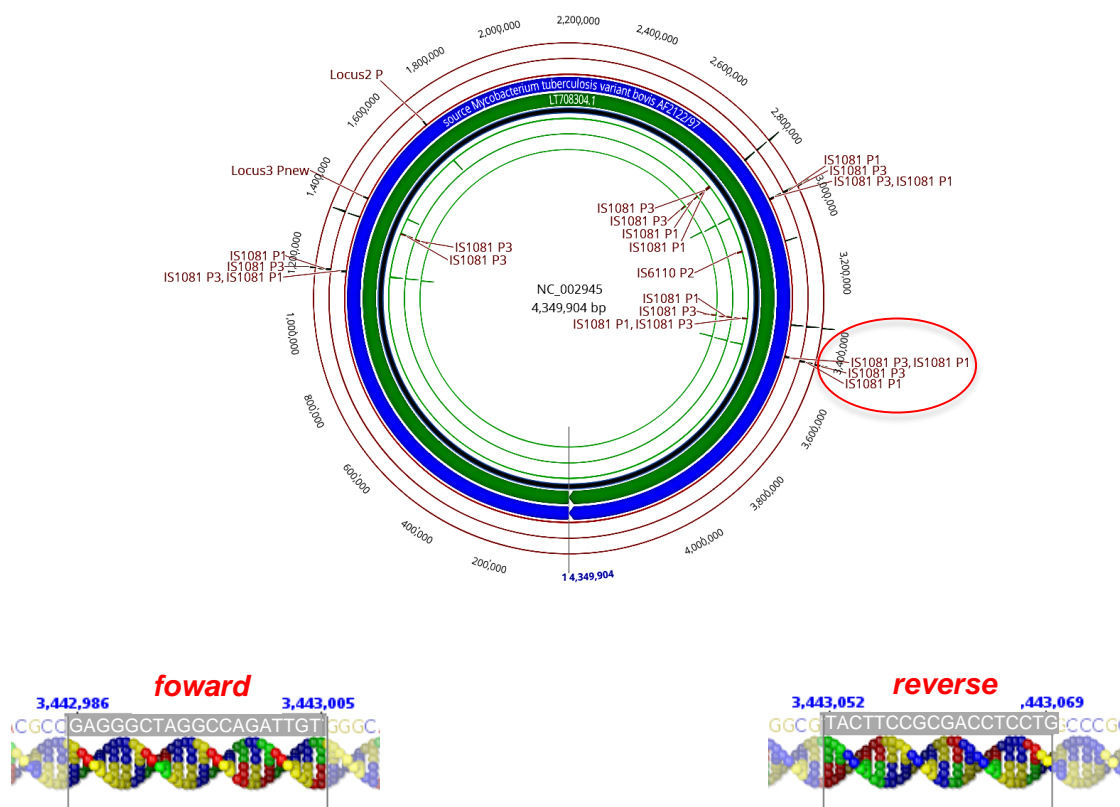


Figura 21. Local de anelamento dos *primers* IS1081-F3 (*foward*) e IS1081-R3 (*reverse*), em destaque como mostra o posicionamento do círculo vermelho, a indexação dos *primers* com a sequência completa de *M. bovis* (sequência de referência NCBI NC_002945), dados do NCBI e o programa *Geneious* v. 6.0.3.

Para analisar as combinações de *primers*, a sequência do elemento de inserção (IS) IS1081 do CMT foi utilizada como molde para preparar os *primers*, o qual é muito utilizada, uma vez que este marcador é encontrado em várias cópias no genoma de *M. bovis*.

O recurso de desenho disponível no *Geneious* foi usado para construir *primers*, ajustando a faixa de *Tm* para 60 °C para os anelamento dos *primers*. As melhores combinações foram selecionadas para cada elemento de inserção, com base na ausência de formação de dímero, sem auto-complementariedade, e para manter o tamanho do fragmento abaixo de 150 pb.

Para a determinação da melhor quantidade de *primers* a ser utilizada foram realizadas reações nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 nM e a

que apresentou melhor curva de amplificação e dissociação foi a escolhida. Os iniciadores utilizados estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo, segundo a literatura citada.

Região	Sequência (5'- 3')	Amplicon (pb)	Referência
IS1081-1 F	GGCTGCTCTCGACGTTCA	100	
IS1081-1 R	CGCTGATTGGACCGCTCA	100	
IS1081-3 F	GAGGGCTAGGCCAGATTGT	84	
IS1081-3 R	TACTTCCGCGACCTCCTG	84	Dykema e col., 2016;
LOCUS 2 F	CGCCTTCCTAACCAGAATTG	161	USDA, 2018.
LOCUS 2 R	CCCCGTAGCGTTACTGAGAA	161	
LOCUS 3 F	ATCAGCAGCGATGTGAGCAT	110	
LOCUS 3 R	GACGGCTACCGGCAAGAC	110	
16S RP F	ACGGGTGAGTAACACGTGGGTG	150	
16S RP R	AGCCCGCGGCCTATCAGCT	150	Choi e col., 2015
16S RP RC	AAGCTGATAGGCCGCGGGCT	146	<i>Primer BLAST*</i>

* *Primer* desenhado utilizando a ferramenta do *primer BLAST* do NCBI.

5.7.4. Padronização da qPCR com DNA e RNA da amostra padrão positiva *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv

Todas as reações de qPCR e RT-qPCR relatadas neste estudo foram realizadas em um equipamento *7500 Fast Real Time PCR System* com o *7500 Software v.2.3 (Applied Biosystems)*.

Foram utilizados para as amplificações o sistema: *GoTaq® qPCR Master Mix* e *GoTaq® 1-Step RT-qPCR* (Promega, USA). As concentrações e temperatura foram definidas conforme as instruções do fabricante, as modificações do protocolo foram realizadas para melhorar a sensibilidade e especificidade analítica do teste.

A reação final foi de 20 µL, sendo composta por: 10 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, USA) e 5,0 µL de amostra para o ANs extraído.

A programação utilizada para o DNA foi de 95 °C por 10 minutos (desnaturação inicial), seguido por 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 60 segundos (transcrição). Sendo ao final,

determinada a curva de dissociação (*Melting*), por meio da detecção da fluorescência do *SYBR Green* (intercalante de DNA) durante aumento gradual de temperatura entre 60 e 95 °C. Cada análise de qPCR foi composta por amostras, em duplicata, mais duas diluições com fluorescência detectável dos controles positivos, assim como, controle negativo e água *nuclease-Free* (Promega).

O mesmo foi realizado com o RNA, utilizando o kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR (Promega, USA) e os mesmos ciclos da programação descritos anteriormente, acrescidos de um ciclo de 37° por 15 minutos.

Após a padronização do teste com a cepa de *M. bovis* para determinar o *endpoint* ou *cutoff* (ponte de corte), padronizamos os ensaios com o DNA e RNA de *M. bovis* e *M. tuberculosis* em um mesmo ensaio determinando assim o *Ct* de cada um, posteriormente o método diagnóstico foi testado em amostras clínicas.

5.7.5. Sensibilidade e especificidade analíticas

O cálculo para estimar a sensibilidade e a especificidade do teste foi realizado a partir da padronização utilizando as cepas de referência de *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv (controles positivos), padronização descrita **no item 5.7.2.**

Os resultados foram analisados calculando-se a eficiência da inclinação da curva padrão e o coeficiente de correlação R^2 .

Uma curva padrão foi projetada a partir de diluições seriadas 1:10 para o limite de detecção dos métodos de diagnósticos propostos. Também foi avaliada a eficiência dos *primers*, da reação e do limite de detecção em bacilos por microlitro.

A Especificidade do ensaio de PCR em tempo real SYBR Green foi demonstrado por análise de curva de fusão (Curva de *Tm*: $-\Delta F / \Delta T$ (mudança na fluorescência / mudança de temperatura), o *Tm* (Temperatura de *Melting*) das reações foi obtido a partir da temperatura de fusão estabelecida automaticamente pelo programa para cada análise utilizado como padrão para todas as reações.

Com relação à sensibilidade, o *Cycle threshold (Ct)* das reações foi obtido a partir do *threshold level* este também estabelecido automaticamente

pelo programa para cada análise utilizado como padrão para todas as reações. Assim sendo, as amostras com *Ct* maior que o *Ct endpoint* do controle positivo foram consideradas negativas para o alvo.

5.7.6. Sequenciamento Sanger

Os produtos do qPCR das amostras de referência e das amostras teste positivas foram sequenciadas pelo método Sanger. O produto de PCR foi purificado utilizando *beads* magnéticas *Agencourt AMPure XP* (*Agencourt Bioscience Corporation*).

Para o sequenciamento utilizou-se o kit *Bigdye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing* (*Life Technologies*), em duas reações, uma com *primer* senso e outra com o antissenso. A reação consiste de 1 μ L de *Bigdye Terminator*, 1,5 μ L de Buffer 5x para *Bigdye Terminator*, 1 μ L *primer* a 5 μ M, 50 ng do produto de PCR purificado e água nuclease-free para 10 μ L, em uma ciclagem com desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, e 35 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 50 °C, e 4 minutos a 60 °C. A reação foi purificada com um protocolo de precipitação por isopropanol/etanol (80 μ L de isopropanol 75 %, seguido por centrifugação a 3000 x g por 45 min e lavagem com 200 μ L de etanol 70 % seguida por centrifugação a 3000 x g por 30 min). A eletroforese capilar e leitura foram realizadas em um sistema de sequenciamento automático ABI 3500 (*Life Technologies*).

5.8. Análise estatística

Foi realizado o teste qui quadrado de independência para comparar as proporções de linfonodos identificados visualmente com TBb e adenites com o método de diagnóstico proposto, qPCR, com nível de 5% de significância.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Prevalência dos casos suspeitos de tuberculose bovina na inspeção

Foram obtidos os dados das atividades de rotina do SIF de um dos frigoríficos estudados, localizado no Centro-Oeste do Estado de São Paulo, durante os meses de março, abril, maio, junho, julho e agosto de 2018. Desse total foram verificadas durante o exame *post-mortem*, 0,11% (18/16.120/mês) das carcaças com algum tipo de lesão sugestiva de tuberculose, podendo variar entre 0,07% (11) e 0,19% (32). Verificou-se, portanto que a média mensal de carcaças suspeitadas de TBb foi de aproximadamente 18 carcaças/mês (**Gráfico 1**).

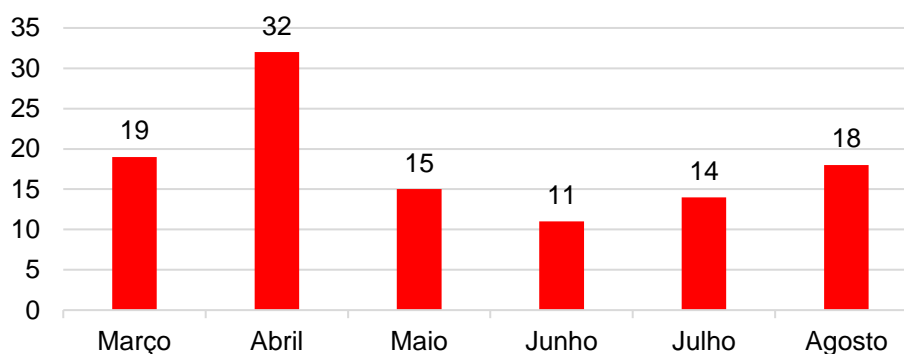


Gráfico 1. Ocorrência de lesões sugestivas de TBb entre março e agosto de 2018 em bovinos abatidos sob inspeção federal (Dados de um Frigorífico do estado de São Paulo – SP, Brasil).

Comparativamente com os dados de outro estudo, também em um Frigorífico localizado no Centro-Oeste do Estado de São Paulo, demonstra um aumento quando comparado com os dados de 2015 (0,02%). Houve um aumento significativo da TBb no estado de São Paulo, pois dados de Smanioto (2015) revelam durante o exame *post-mortem*, a média de 0,15% das carcaças com algum tipo de lesão sugestiva de tuberculose, entre os anos de 1995 a 2015, apresentando uma variação entre os maiores valores de tuberculose total de 0,41% em 1996 e os menores em 2015 de 0,02%.

6.2. Lesões macroscópicas

Por meio da inspeção sanitária, verificou-se, durante o abate, dentre as 30 carcaças que apresentaram algum tipo de lesão macroscópica sugestiva de tuberculose: 20 (66,66%) ocorreram nos linfonodos pré-peitorais, seis (20%) nos retrofaríngeos, três (10%) nos pré-escapulares e um (3,33%) nos mediastínicos. As lesões visualizadas foram nódulos granulomatosos de aspecto purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa e em alguns casos apresentaram ainda calcificação no centro da lesão, evidenciada pelo ranger da faca ao corte.

As 30 carcaças que apresentaram algum tipo de lesão macroscópica sugestiva de adenite: 11 (36,66%) ocorreram nos linfonodos pré-peitorais, 10 (33%) nos retrofaríngeos, sete (23,33%) nos pré-escapulares, um (3,33%) nos mediastínicos e um (3,33%) traqueobrônquico. As lesões visualizadas foram pequenos nódulos granulomatosos com presença de cápsula fibrosa.

Estudos reportam que, durante a inspeção sanitária em abatedouros, nos animais em que foi observada apenas uma lesão causada por *M. bovis*, o linfonodo retrofaríngeo foi o local mais afetado, correspondendo a 43,9% dos casos avaliados. Indica ainda que a inspeção de rotina só identifica cerca de 47% das lesões tuberculosas macroscopicamente detectáveis. (CORNER et al., 1990; CORNER, 1994; BROWN E ANDA, 1998; MILIAN-SUAZO et al., 2000).

O número de animais abatidos por hora, a velocidade/tempo pode influenciar negativamente na inspeção, bem como uma inspeção mais detalhada poderia contribuir para a identificação das lesões tuberculosas durante o abate.

Corroborando com os índices relatados pelo PNCEBT, entre 70 e 90% dos casos, as lesões se encontram em linfonodos da cabeça e tórax. 66% dos animais necropsiados apresentam apenas uma única lesão visível, dados que confirmam os achados neste estudo, pois muitas carcaças apresentavam uma única lesão.

Embora os autores descrevam diferentes linfonodos que podem ser acometidos pelo *Mycobacterium* spp., até o momento o estudo demonstrou que o linfonodo pré-peitoral apresenta maior frequência, demonstrando a importância da inspeção mais detalhada deste linfonodo.

6.3. Métodos de extração de ácidos nucleicos

A tecnologia das microesferas magnéticas é altamente eficaz para a purificação de RNA e DNA de uma ampla gama de tipos de amostras.

Durante a última década houve um aumento significativo no uso de esferas magnéticas para purificação de ácido nucléico. Seu uso no isolamento de ácidos nucléicos sobre os outros métodos existentes oferece várias vantagens: a possibilidade de automatizar o processo; a escalabilidade e a capacidade de mover partículas que se formam; evitar a contaminação cruzada causada pelo respingo de gotículas ao pipetar materiais líquidos; fornece tempos de processamento de instrumento mais rápidos, permitindo resultados de diagnóstico mais rapidamente (DYKEMA et al., 2016).

O kit MagMAX CORE® (Thermo Fisher) foi utilizado para a extração dos ANs, por apresentar alguns benefícios como: o grau de pureza com que se quer obter o ácido nucléico extraído, o tempo que o método consome, o seu custo e rendimento esperado, por seu fluxo de trabalho fornecer ácidos nucléicos de melhor qualidade do que outros produtos químicos no mercado, o que leva a menos interrupções no processo e maior sensibilidade ao diagnóstico, por extrair DNA e RNA ao mesmo tempo.

De acordo com Dykema e col. (2016) e USDA (2018) que ressaltaram tais vantagens, pois já utilizam e recomendam seu uso. Portanto, foi escolhido para realizar esse experimento que utilizou uma matriz complexa que é o tecido de linfonodo bovino suspeito de TBb.

A extração e a purificação de ANs a partir de diversas amostras experimentais (bactérias, fungos, tecidos vegetais e tecidos animais) é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a PCR e suas variações. A maior parte dos métodos que existem para extrair ácidos nucléicos consiste na promoção da lise, ou ruptura celular, para que o isolamento do DNA e/ou RNA do resto dos constituintes da célula seja possível (DYKEMA et al., 2016).

A escolha do método de extração de ANs depende de vários fatores que devem ser considerados: a quantidade de amostra de que se dispõe para a extração, o tipo de amostra ou fonte da qual se quer extrair, o grau de pureza com que se quer obter o ácido nucléico extraído, o tempo que cada método

consome, o seu custo e rendimento esperado, o uso que se vai dar ao ácido nucléico extraído.

No estudo foram utilizadas as alíquotas de 100 μ L e 300 μ L para a extração de ANs, a que apresentou melhor eficiência na detecção foi a alíquota de 100 μ L, pois foi verificado melhor desempenho da qPCR e menos curvas aberrantes devido ao excesso de material que poderia resultar em inibidores.

6.4. Escolha e desempenho dos oligonucleotídeos (*primers*)

As combinações dos *primers* feitas de acordo com Choi e col. (2015) não apresentaram amplificação para as cepas padrão *M. bovis* AN5 e/ou *M. tuberculosis* H37Rv. Também foram testadas em amostras de linfonodos suspeitos de TBb, sem sucesso na obtenção da amplificação esperada. Dessa forma, optou-se por criar um *primer* complementar (16S RP RC) para melhorar a reação, que também não obteve sucesso.

Já os resultados das combinações sugeridos por Dykema e col. (2016) foram aplicadas e após alguns ajustes obteve-se sucesso. A combinação IS1081-3 foi a que apresentou o menor *Ct* e melhor curva de amplificação tanto das cepas de referência como das amostras testadas. Esse resultado foi diferente do proposto pelos autores que referencia o IS1081-1 como eleito para as reações, segundo USDA (2018).

Foram realizados ensaios com as reações nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 nM para determinar a quantidade ideal da concentração dos *primers* e a que apresentou melhor curva de amplificação e dissociação foi a escolhida. Portanto após alguns ensaios determinou-se a quantidade ideal de 0,4 μ L de *primer* (200nM) para cada amostra.

Dykema e col., (2016) utilizando os mesmos pares de *primers* conseguiram detectar a presença de *M. bovis* em tecidos de linfonodos, mas para obter este nível de sensibilidade os autores empregaram métodos adicionais como exemplo a sonda (*probe*). Usando cultura arquivada e tecido histologicamente positivo, a sensibilidade foi de 0,96 (IC 95%: 0,89, 0,99) para o conjunto *primer-probe* do CMT, e 0,89 (IC 95%: 0,80, 0,95) para o conjunto de *primer-probe* específico para o *M. bovis*. A especificidade, estimada durante o teste lado a lado, foi de 0,998 (IC 95%: 0,994, 1,000). Após a implementação, 6124 amostras durante 54 semanas foram testadas e todas as 36 amostras

positivas para histopatologia foram detectadas incluindo 2 casos adicionais inicialmente classificados erroneamente por histopatologia. Esse artigo demonstra o sucesso da técnica de qPCR para detectar o *M. bovis* em tecidos.

Os pontos críticos para o sucesso da amplificação da qPCR são a escolha dos marcadores a serem detectados e amplificados, bem como da sequência dos iniciadores a serem empregados e a qualidade da técnica de extração do DNA (Sakamoto et al., 2008).

Segundo Ruggiero e col. (2007), muitos oligonucleotídeos que inicialmente se mostraram eficientes na discriminação do gênero e da espécie do bacilo da tuberculose falharam em identificar corretamente determinadas amostras quando passaram a ser empregados em diagnóstico de rotina.

No presente estudo, a qPCR com oligonucleotídeos IS1081-3 F e IS1081-3 R apresentou os melhores resultados, com o maior índice de amplificação e eficiência.

6.5. Padronização da reação de qPCR com cepa *M. bovis* AN5

A padronização do teste de diagnóstico molecular para TBb foi realizada primeiramente com o DNA genômico do *M. bovis* (cepa de referência *M. bovis* AN5).

A eficiência das amplificações foi calculada pela curva padrão construída com as diluições seriadas, utilizando o valor da inclinação da reta (*slope*) da linha de regressão com a seguinte fórmula: $e = 100 \times (10^{-1/slope} - 1)$. Um *slope* de -3,32 já indica uma curva padrão com 100% de eficiência (NONAKA, 2012).

O qPCR foi capaz de detectar até a diluição de 10^{-6} em uma curva padrão, apresentando R^2 de 0,998, eficiência de 90,23%, evidenciando uma boa reação. Para se obter uma boa reação deve ter uma eficiência entre 90% e 110%, o que corresponde a uma inclinação entre -3,58 e -3,10. Essa diluição corresponde a aproximadamente a detecção de um bacilo ou célula (**Figura 22**).

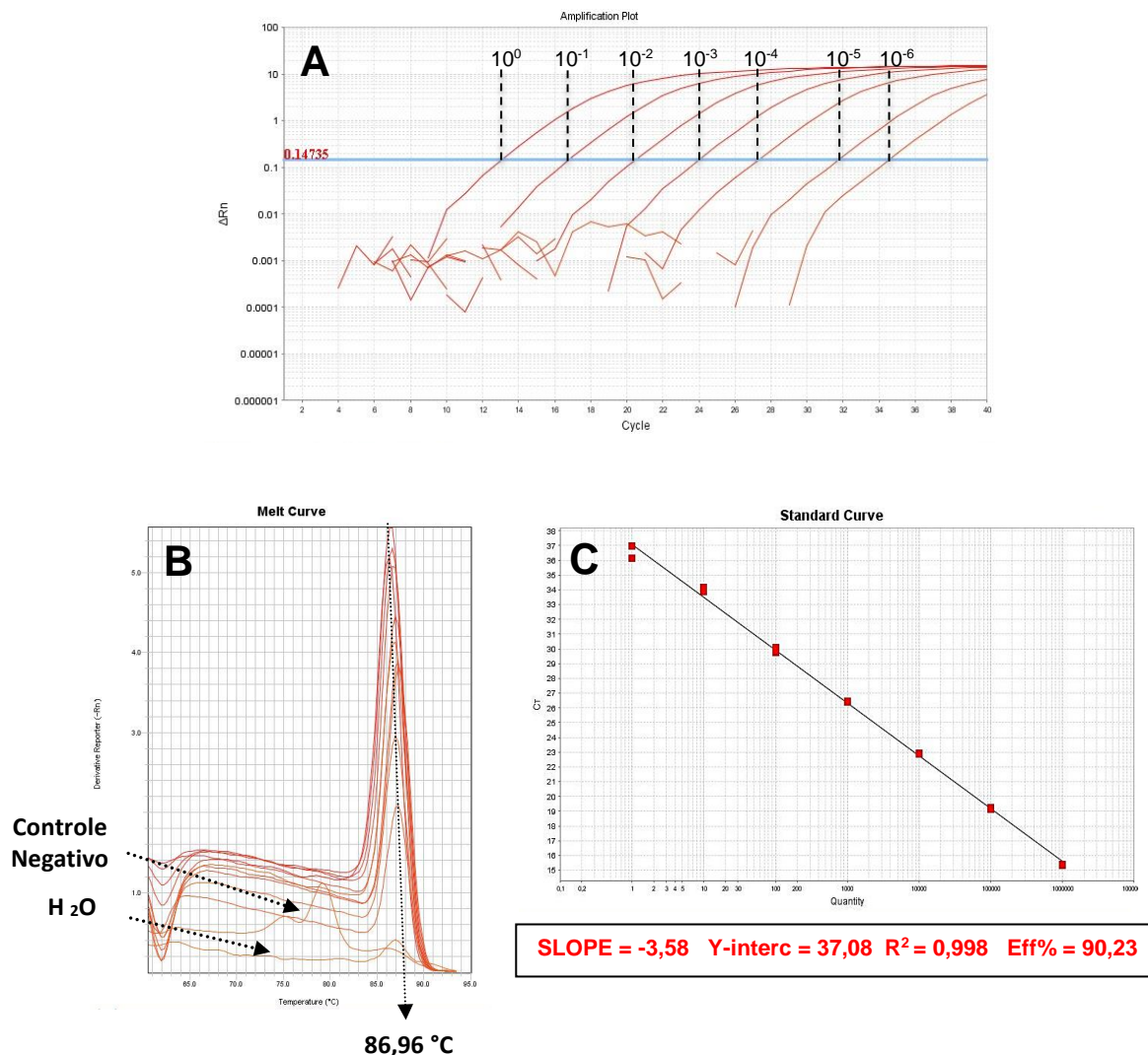


Figura 22. A. Amplificação da curva padrão com diluição de 1:10 do DNA de *M. bovis* AN5 (amostra referência), usando o método de detecção de qPCR SYBR Green. O *Ct* é proporcionalmente inverso a quantidade de DNA (as respectivas diluições). **B.** Curva de *Melting* do DNA da cepa referência *M. bovis* AN5 com a *Tm* de 86,96 °C. **C.** A eficiência das amplificações foi calculada por meio da curva padrão construída com as diluições seriadas, utilizando o valor da inclinação da reta (*slope*) da linha de regressão.

Para determinar a sensibilidade analítica foram utilizados os valores de *Cts* médios das diluições 10^{-6} , respectivamente, 36,978 e 36,147. Portanto o *endpoint* do controle positivo foi considerado a partir de $Ct \leq 36,56$. Já o *melting* foi representado pelas médias das diluições que foi considerado o $Tm = 86,96$ °C, com variação de ± 1 °C, de acordo com a **Tabela 2**.

Tabela 2. Resultado da média do ciclo de *threshold* (*Ct*) e *melting* (*Tm*) para a curva de diluição em 1/10 da amostra controle *M. bovis* AN5 da qPCR do primer IS1081-3. Reação de qPCR utiliza-se 5µL de amostra.

Cópias/µL	Diluição AN5*	<i>Ct</i> 1	<i>Ct</i> 2	Médias <i>Cts</i>	<i>Tm</i> 1 (°C)	<i>Tm</i> 2 (°C)
1x10 ⁶	10 ⁰	15,400	15,359	15,379	86,351	86,351
1x10 ⁵	10 ⁻¹	19,154	19,240	19,190	86,512	86,673
1x10 ⁴	10 ⁻²	22,910	22,866	22,888	86,673	86,995
1x10 ³	10 ⁻³	26,405	26,479	26,442	86,834	86,995
1x10 ²	10 ⁻⁴	29,759	30,088	29,923	86,995	87,317
1x10 ¹	10 ⁻⁵	34,179	33,888	34,033	87,317	87,478
1x10 ⁰	10 ⁻⁶	36,978	36,147	36,562	87,317	87,639
1x10 ⁻¹	10 ⁻⁷	Indeterm**	Indeterm**		62,349	62,349
<i>Endpoint</i>		<i>Ct</i> ≤ 36,56			<i>Tm</i> = 86,96 ±1,0 °C	

*AN5 = *M. bovis* AN5.

**Indeterm = indeterminado. Sendo que 1 e 2 são duplicatas do mesmo ponto.

A menor diluição que apresentou amplificação foi 1x10⁰ cópia/µL, sendo este considerado o limite de detecção do teste como demonstrado na **Tabela 2**. E confirmado pelo menor *Ct* com 36,978, pois o *Ct* é inversamente proporcional a quantidade de DNA alvo na amostra (**Figura 22 A**).

Com relação à sensibilidade, o *Ct* das reações foi obtido a partir do *threshold level* estabelecido automaticamente pelo programa para cada análise utilizado como padrão para todas as reações. Assim sendo, as amostras com *Ct* maior que o *Ct endpoint* padronizado (*Ct* ≤ 36,56) pelo controle positivo foram consideradas negativas para o alvo.

Segundo Caraguel e col. (2011), comumente, valores mais altos de *Ct* são interpretados como artefatos de amplificação ou fluorescência, ou contaminações cruzadas. Embora a implementação do corte de *Ct* possa ser razoável, sua justificativa e seleção devem ser baseadas em evidências.

Como o estudo centrado neste projeto é a seleção de um valor de corte para qPCR para atender a uma finalidade diagnóstica para TBb, os critérios reunidos durante o desenvolvimento do ensaio incluem: o limiar de fluorescência, o ciclo final da reação, o limite de detecção e a investigação do artefato. A variabilidade na eficácia da amplificação nos testes pode induzir

alguma instabilidade em um corte de *Ct* pretendido e requer padronização ou normalização dos procedimentos como descrito na **Tabela 2**.

O RT-qPCR da cepa de *M. bovis* AN5 foi capaz de detectar até a diluição 10^{-6} em uma curva padrão, com a média de $R^2 = 0,995$ e $Eff = 98,719\%$ mostrando um melhor desempenho quando comparado com DNA. No entanto, o RNA é mais instável e gerou uma instabilidade no *Melting*, tornando o diagnóstico impreciso e duvidoso, como se pode observar as ampliações inespecíficas geradas na **Figura 24**. Quando testados juntos, os dois alvos tanto o *M. bovis* como o *M. tuberculosis* foram amplificados, claramente podemos observar a variação entre o DNA e RNA principalmente nas curvas de fusão (*Tm*) (**Figuras 23 e 24**).

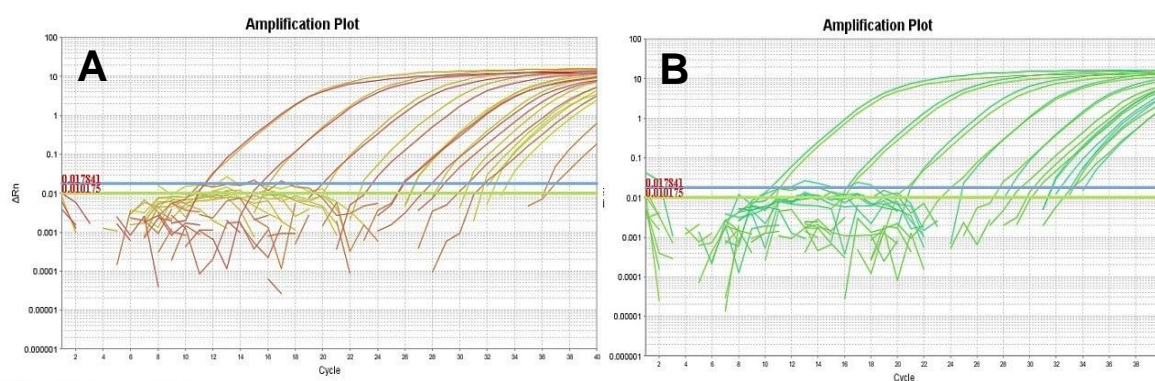


Figura 23. A. Curva de Amplificação do DNA (vermelho) e RNA (amarelo) da cepa *M. bovis* AN5 (vermelho). **B.** Curva de Amplificação do DNA (verde) e RNA (azul) da cepa *M. tuberculosis* H37Rv, ambos controles positivos da reação.

A especificidade do ensaio de PCR em tempo real foi demonstrada por análise de curva de fusão (Curva de *Tm*: $-\Delta F / \Delta T$ (mudança na fluorescência / mudança de temperatura), resultados obtidos usando as cepas de referência, os picos dos produtos específicos são visíveis tanto para DNA e RNA do *M. bovis* e do *M. tuberculosis* (**Figuras 24**). O RNA gerou claramente curvas inespecíficas impossibilitando o resultado do diagnóstico proposto.

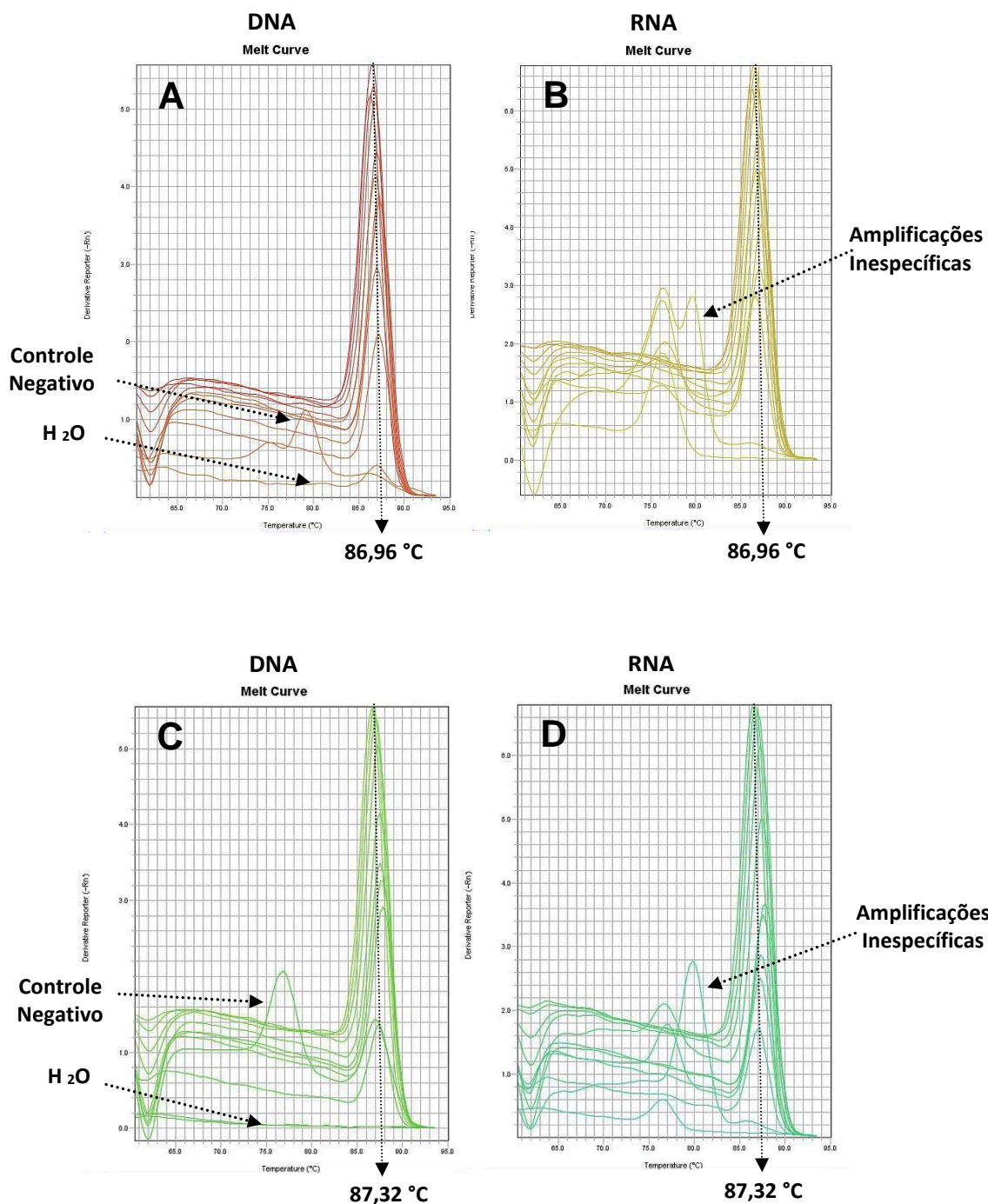


Figura 24. A. Curva de T_m do DNA da cepa padrão de *M. bovis* AN5. B. Curva de T_m do RNA da cepa padrão de *M. bovis* AN5. C. Curva de T_m do DNA da cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv. D. Curva de T_m do RNA da cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv.

6.6. RNA ribossômico e o DNA genômico

O 16S rDNA e 16S rRNA do CMT foram utilizados como alvos para desenvolver reações em qPCR mais sensíveis e específicas para melhorar o diagnóstico da tuberculose.

O RNA ribossômico 16S (rRNA) é um componente da pequena unidade 30S de ribossomos procarióticos, que tem aproximadamente 1500 nucleotídeos de comprimento e é codificado por 16S rDNA. O gene 16S rRNA é usado para estudos filogenéticos devido a sua sequência altamente conservada entre as bactérias, e tem sido amplamente utilizado para identificação genética bacteriana, pois contém regiões hipervariáveis que fornecem sequências específicas de espécies. O rRNA constitui 80% do RNA total e é estruturalmente mais estável que o RNA mensageiro (mRNA) (BAKER et al., 2003).

Além disso, rRNA está presente em 1.000 a 10.000 vezes mais cópias do que DNA genômico, o que implica que rRNA, e particularmente 16S rRNA, é um bom alvo para o desenvolvimento de ensaios com sensibilidade aumentada (CHOI et al., 2015). No presente estudo, desenvolvemos dois tipos de ensaios de PCR em tempo real, um visando o 16S rDNA e outro visando o 16S rRNA do *M. bovis*.

A PCR de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) 16S rRNA foi capaz de detectar até 1×10^6 bacilos/ μ L em uma curva padrão apresentando R^2 de 0,99, eficiência de 98,719%. Confirmando uma maior eficiência do que comparada com a qPCR do DNA genômico.

Foram comparados seus limites de detecção, sensibilidades e especificidades das reações, direcionados ao rRNA 16S e do 16S rDNA da amostra padrão de *M. bovis* AN5. A reação direcionada ao rRNA 16S foi mais sensível que a reação do 16S rDNA. A RT-qPCR 16S rRNA mostrou a mais alta sensibilidade e especificidade apresentando os valores de *C_t*s menores para a mesma diluição das amostras (**Figura 25 e Gráfico 2**).

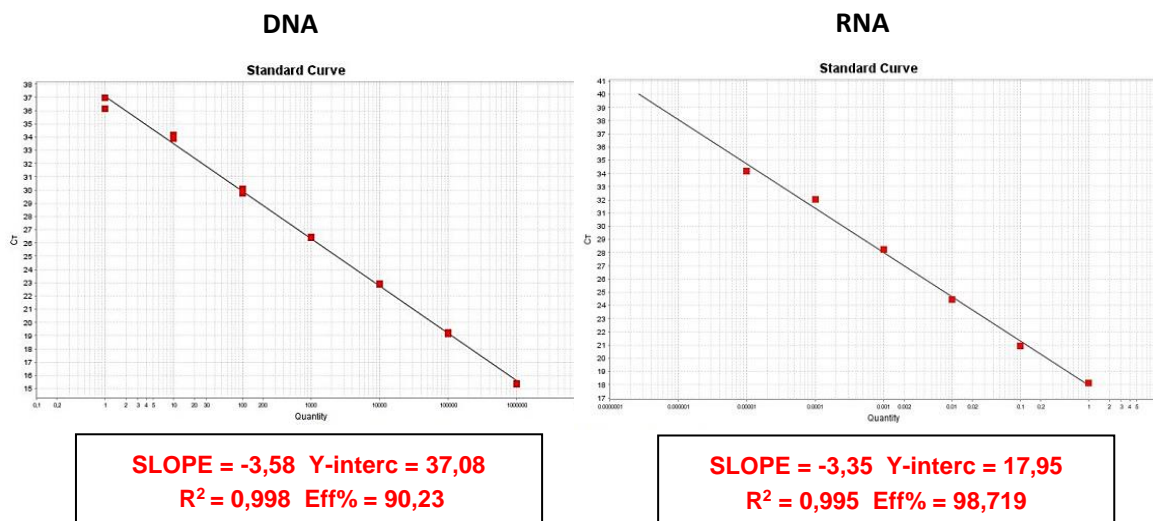


Figura 25. Valores da inclinação da reta (*slope*) da linha de regressão, com a média de R² e eficiência das amplificações, utilizando como matriz os ANs da cepa de *M. bovis* AN5 de acordo com a curva padrão construída com as diluições seriadas.

O **Gráfico 2** mostra a determinação do limite de detecção e comparação da sensibilidade da técnica de PCR em tempo real de acordo com o DNA e RNA do *M. bovis* AN5.

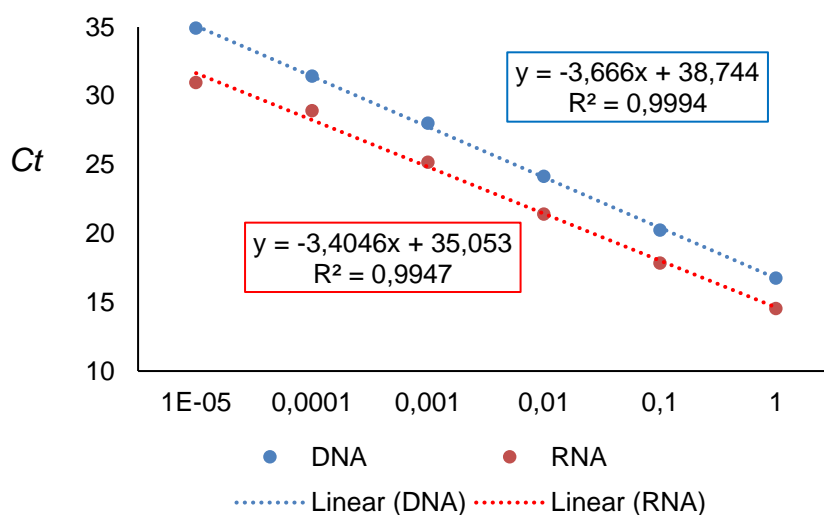


Gráfico 2. Determinação do limite de detecção e comparação da sensibilidade da técnica de acordo com o AN utilizado como matriz. Uma série de diluições da cepa de *M. bovis* AN5 foi utilizada.

Foram utilizadas durante todo o experimento duas cepas padrão consideradas como controle positivo: a cepa de *M. bovis* AN5 e a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. Não foi utilizada a diferenciação entre as cepas.

A cepa *M. tuberculosis* H37Rv obteve parâmetros semelhantes, mas com *Ct* menores (Figura 24 e a Tabela 3). Essa diferença entre as cepas de *Cts* pode ser em decorrência da imprecisão do método da escala nefelométrica (escala de *Mc Farland*). A **Tabela 3** mostra os valores de *Ct* dos ANs das cepas de referência.

Tabela 3. Resultado da média do ciclo de *threshold* (*Ct*) e *melting* (*Tm*) das cepas de referência *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv do teste diagnóstico de PCR em tempo real. Reação de qPCR e RT-qPCR.

Cópias/ µL	Diluições AN5* e H37Rv	<i>Ct</i> AN5* DNA	<i>Ct</i> AN5* RNA	<i>Ct</i> H37Rv** DNA	<i>Ct</i> H37Rv** RNA
1x10 ⁶	10 ⁰	15,400	10,623	11,238	9,73
1x10 ⁵	10 ⁻¹	19,154	15,719	16,546	15,77
1x10 ⁴	10 ⁻²	22,910	20,208	20,732	20,69
1x10 ³	10 ⁻³	26,405	22,614	24,225	24,61
1x10 ²	10 ⁻⁴	29,759	26,430	27,779	28,26
1x10 ¹	10 ⁻⁵	34,179	28,266	30,356	31,34
1x10 ⁰	10 ⁻⁶	36,978	30,287	30,782	31,45
1x10 ⁻¹	10 ⁻⁷	Indeterm***	33,213	29,488	31,98

*AN5 = *M. bovis* AN5; ** H37Rv = *M. tuberculosis* H37Rv; ***Indeterm = indeterminado.

O RNA foi melhor em termos de detecção no *Ct*, pois apresentou menores *Cts* em comparação com o DNA, mas houve geração de curvas inespecíficas no *Tm* que podem confundir o resultado impossibilitando o diagnóstico, mesmo ele estando presente em 1.000 a 10.000 vezes mais cópias do que DNA genômico, na prática não é o melhor alvo indicado para o diagnóstico de TBb (CHOI et al., 2015).

Na **Tabela 4** pode-se observar a variação dos valores de *Tms* entre as cepas de referência.

Tabela 4. Resultado dos *Tm*s para a curva de diluição em 1/10 da amostra controle *M. bovis* AN5 da qPCR e RT-qPCR.

Conc. AN5* e H37Rv*	<i>Tm</i> DNA AN5* (°C)	<i>Tm</i> RNA AN5* (°C)	<i>Tm</i> DNA H37Rv** (°C)	<i>Tm</i> RNA H37Rv** (°C)
10 ⁰	86,351	86,122	86,609	86,447
10 ⁻¹	86,512	86,447	86,772	86,772
10 ⁻²	86,673	86,609	87,097	86,934
10 ⁻³	86,834	86,772	87,260	87,260
10 ⁻⁴	86,995	86,934	87,585	87,422
10 ⁻⁵	87,317	87,260	87,747	87,747
10 ⁻⁶	87,317	87,260	87,910	87,585
10 ⁻⁷	87,097	87,097	87,585	87,422
<i>Endpoint</i>	<i>Tm</i> = 86,96 ±1,0 °C			

*AN5 = *M. bovis* AN5; ** H37Rv = *M. tuberculosis* H37Rv.

6.7. Especificidade do PCR em tempo real utilizando DNA genômico ou RNA ribossômico de *M. bovis* e *M. tuberculosis* como alvo

Para determinar a especificidade da recém-desenvolvida PCR em tempo real foram analisados os alvos *M. bovis* e *M. tuberculosis*, utilizando o DNA genômico e RNA ribossômico como mostrado nas **Figuras 24 e 25**. Produtos de amplificação dos dois modelos de cepa de referência da bactéria alvo geraram distintos picos de fusão no sistema de PCR em tempo real SYBR Green, com valores de temperatura de fusão (*Tm*) entre 85,351 a 87,097 °C (DNA) e 86,122 a 87,097 °C (RNA) para *M. bovis* e de 86,609 a 87,585 C (DNA) e 86,447 a 87,422 °C (RNA) para o *M. tuberculosis* (**Tabela 4**). Quando testados juntos, os dois alvos foram amplificados e separados por dois picos de fusão com valores de *Tm* bem próximos (**Figura 24**).

6.8. Sensibilidade e linearidade do ensaio PCR em tempo real utilizando DNA genômico ou RNA ribossômico de *M. bovis* e *M. tuberculosis* como alvo

O cálculo estimado da sensibilidade foi baseado na diluição da cepa de referência de *M. bovis* AN5 que foi diluída até a obtenção da concentração equivalente a escala 1 de *Mc Farland*, correspondente a 3×10^8 bacilos/mL,

posteriormente alíquotas de 100 μL (3×10^7 bacilos) e de 300 μL (9×10^7 bacilos) foram utilizadas para a extração.

A sensibilidade do ensaio foi avaliada testando diluições do *M. bovis* e *M. tuberculosis*, variando de 1×10^6 cópias / μL a 1×10^0 cópias / μL . As concentrações mínimas de bactérias detectadas foram de 1 cópia / μL (**Tabela 2**). A sensibilidade do ensaio para cada bactéria atingiu 1 cópia / μL . Além disso, todas as curvas padrão produzidas apresentaram excelente correlação linear com intervalo de 1 cópia / μL a 1×10^6 cópias / μL ($R^2 > 0,99$) (**Figura 23**), sugerindo que o componente de quantificação do ensaio é robusto.

6.9 Desempenho da qPCR em amostras de linfonodos de bovinos suspeitos de TBb

Diversos estudos vêm mostrando a possibilidade da qPCR no diagnóstico da TBb permitindo uma maior acurácia e significativa redução do tempo de diagnóstico em relação aos métodos tradicionais de identificação dos isolados (COLLINS et al., 2011). Muitos trabalhos evidenciam o uso do diagnóstico molecular, a partir da extração do DNA da bactéria cultivada em meio seletivo. No entanto, realizar a extração a partir de amostras clínicas diretamente é um desafio, devido aos contaminantes que atuam como inibidores da reação.

Os resultados obtidos pela técnica de qPCR como diagnóstico para lesões suspeitas de TBb demonstraram que dos 30 linfonodos coletados 24 (80%) foram confirmados positivos para *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis* e 6 (20%) foram confirmados negativos (**Figura 26 e Tabela 5**).

Os resultados obtidos pela técnica de qPCR foram satisfatórios e apresentaram resultados positivos quando utilizado tanto com as amostras de referência, *M. bovis* e *M. tuberculosis*, bem como com as amostras clínicas suspeitas de TBb, diagnosticados pelos parâmetros padronizados e estabelecidos de $Ct \leq 36,56$ e $Tm = 86,96 \pm 1$ °C.

Este projeto pode demonstrar que a qPCR é uma técnica sensível, específica, de rápida execução e que é possível identificar o *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis* diretamente a partir de uma matriz complexa como o linfonodo, revelando-se um diagnóstico rápido e eficiente (**Figura 26 e Tabela 5**).

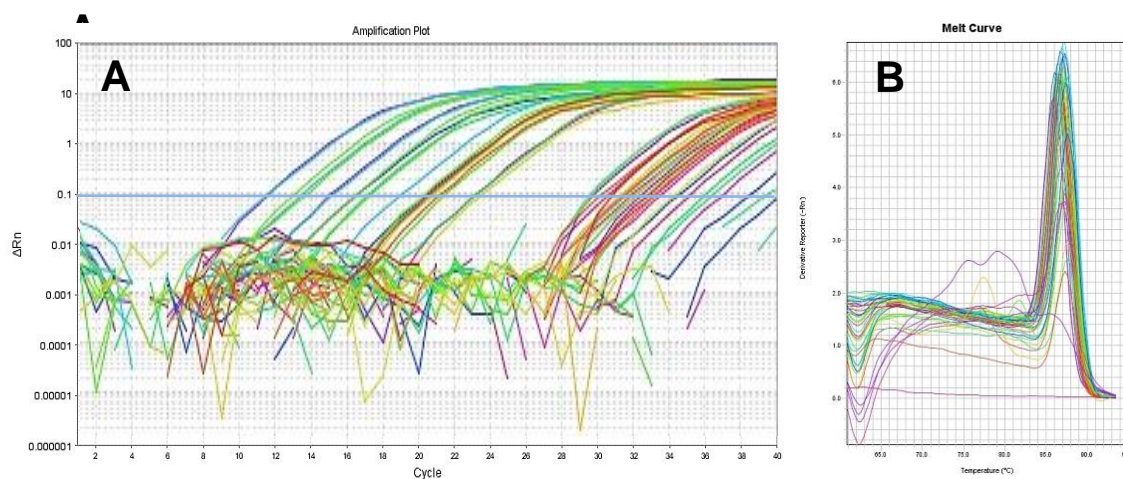


Figura 26. A. Curva de amplificação das amostras de linfonodos com suspeita de TBb com as cepas de referência *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv, como controles positivos, juntamente com o controle negativo e a H₂O *Nuclease Free* que estão presente em todas as reações. **B.** Curva de *Melting* (T_m): $-\Delta F / \Delta T$ (mudança na fluorescência / mudança de temperatura) DNA das amostras de linfonodos com suspeita de TBb.

Tabela 5. Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões suspeitas de TBb.

AMOSTRA	LIFONODO	DNA		RESULTADOS
		Ct	Tm	
1	PRÉ-PEITORAL	30,486	88,573	POS
2	PRÉ-PEITORAL	28,654	85,584	POS
3	RETROFARÍGEO	26,698	86,889	POS
4	PRÉ-PEITORAL	30,766	86,726	POS
5	RETROFARÍGEO	34,236	63,409	NEG
6	PRÉ-PEITORAL	38,445	79,388	NEG
7	PRÉ-PEITORAL	15,268	85,258	POS
8	RETROFARÍGEO	36,021	85,964	POS
9	RETROFARÍGEO	36,633	86,290	POS
10	PRÉ-PEITORAL	31,236	87,052	POS
11	PRÉ-PEITORAL	24,695	86,345	POS
12	MEDIASTINO	27,563	86,236	POS
13	RETROFARÍGEO	29,265	86,616	POS
14	PRÉ-PEITORAL	31,268	87,052	POS
15	PRÉ-PEITORAL	33,255	87,378	POS
16	PRÉ-PEITORAL	28,167	76,290	NEG
17	PRÉ-ESCAPULAR	30,912	87,105	POS
18	PRÉ-PEITORAL	36,295	88,899	POS
19	PRÉ-PEITORAL	33,780	85,584	POS
20	PRÉ-PEITORAL	32,504	86,726	POS
21	PRÉ-PEITORAL	28,274	77,877	NEG
22	PRÉ-ESCAPULAR	30,431	86,660	POS
23	PRÉ-PEITORAL	32,273	86,019	POS
24	PRÉ-PEITORAL	30,301	78,247	POS
25	PRÉ-PEITORAL	29,321	77,921	NEG
26	PRÉ-PEITORAL	33,587	75,312	NEG
27	PRÉ-ESCAPULAR	31,635	86,236	POS
28	PRÉ-PEITORAL	30,563	86,889	POS
29	PRÉ-PEITORAL	28,236	86,714	POS
30	RETROFARÍGEO	31,339	86,563	POS
C-		30,236	85,421	
AN5		11,566	86,073	
H37		9,573	86,563	
H2O		34,524	63,572	

6.10. Desempenho da qPCR em amostras de linfonodos de bovinos suspeitos de adenite

Os resultados positivos pela técnica de qPCR como diagnóstico para lesões de pequenos nódulos classificadas como adenite apresentaram ampliações no teste de diagnóstico proposto e dentre as 30 lesões, 13 (43,33%) foram positivas para TBb e 17 (56,66%) negativas para TBb (**Figura 27 e Tabela 6**).

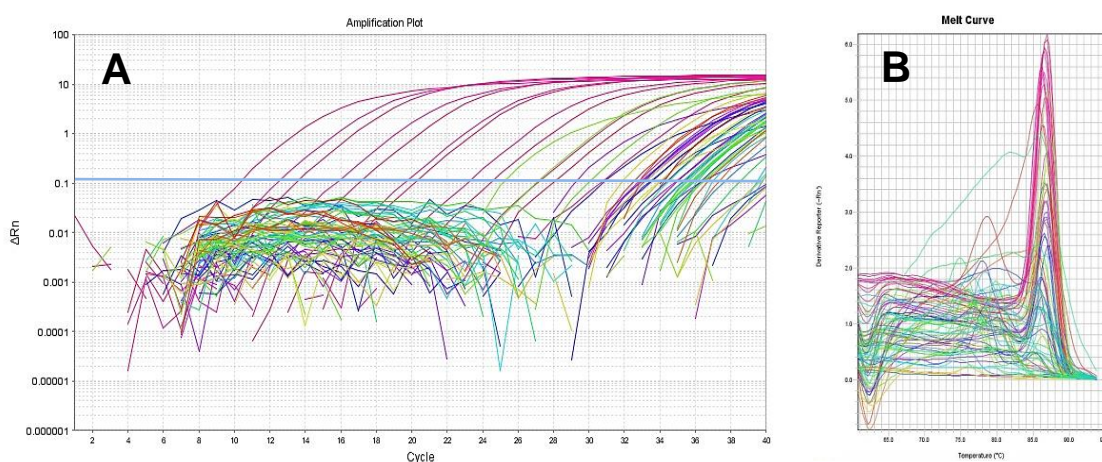


Figura 27. A. Curva de amplificação das amostras de linfonodos com lesões do tipo adenite, com as cepas de referência *M. bovis* AN5 e *M. tuberculosis* H37Rv, como controles positivos, juntamente com o controle negativo e a H₂O *Nuclease Free* que estão presente em todas as reações. **B.** Curva de *Melting* (*T_m*): $-\Delta F / \Delta T$ (mudança na fluorescência / mudança de temperatura) DNA das amostras de linfonodos com suspeita de TBb

Tabela 6. Resultado da técnica de qPCR como diagnóstico para lesões de pequenos nódulos classificados como adenite.

AMOSTRA	LIFONODO	DNA		RESULTADOS
		Ct	Tm	
1	RETROFARÍGEO	33,320	78,573	NEG
2	RETROFARÍGEO	10,139	85,584	POS
3	RETROFARÍGEO	30,667	86,889	POS
4	PRÉ-PEITORAL	31,867	86,726	POS
5	RETROFARÍGEO	35,123	63,409	NEG
6	PRÉ-PEITORAL	35,650	79,388	NEG
7	PRÉ-PEITORAL	10,996	85,258	POS
8	RETROFARÍGEO	37,642	75,964	NEG
9	RETROFARÍGEO	36,781	76,290	NEG
10	MEDIASTINO	30,430	87,052	POS
11	RETROFARÍGEO	26,253	81,345	NEG
12	RETROFARÍGEO	31,365	86,236	POS
13	RETROFARÍGEO	33,458	76,616	NEG
14	PRÉ-PEITORAL	24,656	87,052	POS
15	TRAQUEOBRONQUICO	27,825	87,378	POS
16	RETROFARÍGEO	34,105	76,290	NEG
17	PRÉ-ESCAPULAR	33,473	77,105	NEG
18	PRÉ-PEITORAL	36,295	78,899	NEG
19	PRÉ-PEITORAL	33,780	85,584	POS
20	PRÉ-ESCAPULAR	32,504	86,726	POS
21	PRÉ-PEITORAL	34,029	79,877	NEG
22	PRÉ-ESCAPULAR	37,420	74,660	NEG
23	PRÉ-ESCAPULAR	35,801	81,019	NEG
24	PRÉ-PEITORAL	33,238	78,247	NEG
25	PRÉ-ESCAPULAR	33,884	77,921	NEG
26	PRÉ-ESCAPULAR	35,490	75,312	NEG
27	PRÉ-ESCAPULAR	32,500	86,236	POS
28	PRÉ-PEITORAL	33,442	86,889	POS
29	PRÉ-PEITORAL	10,930	79,714	NEG
30	PRÉ-PEITORAL	33,207	86,563	POS
C-		32,072	85,421	
AN5		10,237	86,073	
H37		7,932	86,563	
H2O		37,708	63,572	

6.11. Resultados do Sequenciamento Sanger

Foram submetidas ao sequenciamento as amostras de referência (controles positivos), algumas amostras suspeitas de TBb e algumas lesões do tipo adenite, escolhidas aleatoriamente.

Os produtos do qPCR das amostras de referência (controles positivos) e das amostras teste positivas apresentaram similaridade genética de 100% com o *M. tuberculosis* e o *M. bovis*. O sequenciamento permitiu a confirmação da identificação de alguns isolados clínicos, e por ser a técnica padrão ouro, assegura que a detecção e identificação dos isolados pelo qPCR é correta.

6.12. Correlação dos resultados da padronização da técnica de PCR em tempo real para diagnosticar TBb e do diagnóstico visual praticado atualmente nos frigoríficos pelo SIF

O presente estudo centrou-se em desenvolver um diagnóstico para a detecção da TBb com *primers* específicos para *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis*, sendo as amostras testadas de lesões classificadas como lesões de TBb apresentando granuloma formado ou aspecto purulento cremoso. Pelo teste de qui-quadrado identificou-se diferença estatística significativa da porcentagem de TBb positiva encontrada pelo teste de qPCR e as porcentagens encontradas visualmente ($p < 0,001$), ou seja, 20% das amostras classificadas como TBb visualmente não foram identificadas pelo teste de qPCR proposto neste experimento. Quanto as adenites observaram-se que 43,3% das amostras apresentaram ser TBb positiva pelo teste qPCR padronizado (**Tabela 7**).

Inesperadamente, a alta taxa positiva encontrada nessas lesões do tipo adenite destaca a importância da detecção precoce da TBb pelo método diagnóstico proposto neste estudo. Além de maior alerta quanto à etiologia dessas lesões.

Tabela 7. Proporções de linfonodos identificados visualmente com TBb e lesões classificadas como adenites com o teste qPCR.

Identificação visual para TBb 100% (+)	qPCR		Total
	+	-	
	24 (80%)	6 (20%)	30 (100%)
Identificação visual para adenite 0% (-)	qPCR		
	+	-	
	13 (43,3%)	17 (56,7%)	30 (100%)
P	<0,001		

Os 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.

No presente estudo, os limites de detecção de *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis* pelo ensaio de PCR em tempo real variou entre 1 cópia / μL e 1×10^6 cópias / μL . A sensibilidade da técnica diagnóstica estabelecida neste estudo foi semelhante à de um teste de PCR multiplex convencional desenvolvido por Eisenach e col. (1990), porém muito superior à de outros ensaios diagnósticos como é o caso da cultura microbiológica, considerada padrão ouro e da inspeção visual praticada nos frigoríficos atualmente.

Pode-se concluir que não há animais com lesões clássicas de TBb, pois mesmo as lesões consideradas clássicas apresentaram uma porcentagem de 20% que foram erroneamente classificadas como TBb, mas a inspeção na linha de abate preza pela segurança alimentar e saúde pública, ou seja na dúvida condena a carcaça.

As lesões classificadas como adenites foram igualmente testadas e necessitam de mais estudos, como por exemplo, fazer um microbioma para saber a etiologia dessas lesões, pois não há relatos na literatura quanto a etiologia dessas lesões em bovinos, visto que podem se tratar de uma TBb, portanto não pode haver liberação de carcaças com tais lesões para o consumo interno sem um teste diagnóstico mais preciso.

6.13. Cultura microbiológica e Isolamento bacteriano

Das 60 amostras submetidas ao isolamento bacteriano em cultivo, não houve crescimento da bactéria após 24 semanas de incubação. A alíquota utilizada para semeadura foi de 300 µL, quantidade pequena, que pode ter sido insuficiente para o não crescimento da bactéria.

Estudos avaliando a cultura mostram que para que uma cultura de um espécime clínico seja positiva são necessárias entre 10 a 100 células de *M. tuberculosis* na amostra. A PCR é capaz de detectar uma cópia de DNA de *M. tuberculosis*, como já foi demonstrado por Eisenach e col. (1990).

O estudo bacteriológico envolve procedimentos como cultivos em meios de cultura, descontaminação e condições de incubação, os quais influenciam no sucesso do isolamento (CORNER, 1994; OIE, 2000). Em decorrência da manipulação nos frigoríficos e devido a presença da microbiota natural do animal, o material enviado não é estéril. Devido a este fato, a descontaminação é um procedimento indispensável para o cultivo primário do *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

Dada a dificuldade de isolamento, percebe-se a importância da padronização de um protocolo de coleta para o exame de cultura. Este achado corrobora com o estudo de Figueiredo e col. (2008) que conclui que a cultura bacteriológica depende do processo de descontaminação da amostra, procedimento laborioso e que em até 50% dos casos não é bem-sucedido.

Outro fator relevante é que a cultura em meios de Löwenstein-Jensen e Stonebrink favorece o crescimento de bactérias a partir de 10 bactérias/ml de espécime, mas requer cuidados de coleta e remessa, a fim de manter a viabilidade do agente para crescer nos meios de cultura (KANTOR, 1988). A ausência de micobactérias em amostras de animais com teste tuberculina positivos com lesões típicas ou sugestivas pode estar associada ao baixo número encontrado nas lesões no momento da coleta das amostras ou à dificuldade de isolamento de cepas do patógeno (PINTO et al., 2002).

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

Na tentativa de calcular o *Lead time* para os processos do diagnóstico da TBb para melhor conhecer cada etapa do tempo empregado, criou-se um quadro (**Quadro 4**) para se ter uma visão real do tempo gasto de cada processo, baseado no *Lean* e no *Lead time* que grandes corporações utilizam.

A partir do cálculo do *Lead Time* foi possível ter uma visão sistêmica do tempo total gasto em todo o fluxo de valor. Desta forma, podem ser realizadas análises como: determinação do prazo de atendimento à demanda; produtividade; verificação de gargalos; otimização dos processos.

Nº	ETAPA	AÇÃO	TEMPO
1	Chegada da amostra ao laboratório	Descongelamento da amostra	4 HORAS (240 MINUTOS)
2	Análise da amostra e escolha do fragmento	Capela de Fluxo, placa de Petri, microtubo eppendorf	10 MINUTOS
3	Preparação dos tubos para maceração da amostra	Beads de zircônia + PBS	5 MINUTOS
4	Maceração	Homogenizador	12 MINUTOS
5	Transferir amostra para outro tubo (qPCR)	microtubo eppendorf	23 MINUTOS
6	Inativação Térmica	Termobloco	30 MINUTOS
7	Extração DNA	Kit de extração	3 HORAS (180 MINUTOS)
8	Preparação dos reagentes para a amplificação	Capela de Fluxo, reagentes	32 MINUTOS
9	Pipetagem na placa de qPCR (reagentes)	Vórtex, pipetador, precisão manual	10 MINUTOS
10	Pipetagem na placa de qPCR (amostra – alvo)	Vórtex, pipetador, precisão manual	10 MINUTOS
11	Selagem	Selante	5 MINUTOS
12	Spin	Equipamento	1 MINUTO
13	Preparação do equipamento (coordenadas)	Equipamento Thermo Fisher 7500 Fast	10 MINUTOS
14	Início da corrida no equipamento até o término	Equipamento Thermo Fisher 7500 Fast	2,5 HORAS (150 MINUTOS)
15	Análise dos resultados		30 MINUTOS
			748 MINUTOS

Quadro 4. Cálculo do *Lead time* 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 (Valores calculados para fazer 1 a 10 amostras. Para um período de trabalho de 8 horas, é necessário 1 dia e meio de trabalho = 12 horas e 27 minutos = 748 minutos).

A cultura bacteriológica, considerada padrão ouro é um método complexo, laborioso e dispendioso, com resultados demorando de 60 a 90 dias após o abate, o que dificulta os esforços de rastreamento e descarte assertivo da carcaça bovina. O método diagnóstico padronizado de qPCR neste estudo

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, que é a cultura bacteriológica e a análise visual do SIF.

8. VALIDAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL PADRONIZADO PARA TBb

Os parâmetros para a metodologia de validação foram realizados de acordo com o *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, seguindo os “Princípios e métodos de validação de ensaios diagnósticos para doenças infecciosas” propostos no capítulo 1.1.6 (OIE, 2019).

A validação de um teste de diagnóstico é realizada com o objetivo de verificar o desempenho dos parâmetros do método a ser utilizado na prática diagnóstica e monitorar o método sob as condições utilizadas. Esta avaliação deve levar em conta os efeitos das variações inevitáveis causadas, por exemplo, pela composição das amostras, desempenho do equipamento, qualidade dos reagentes, variações ligadas ao analista e condições ambientais do laboratório. As características de desempenho investigadas no processo de validação são: Limite de Detecção (LD), Repetibilidade, Reprodutibilidade e Robustez. E estas características estão sendo analisadas por 3 empresas multinacionais que estão participando do projeto, disponibilizando seus equipamentos em comodato, são elas: Thermo Fisher®, BD® e Qiagen®. Como se trata de um projeto que está em processo de patente, os dados não poderão ser compartilhados neste momento.

Embora a cultura bacteriológica ainda seja o padrão ouro no diagnóstico final da TBb nosso propósito por meio deste estudo é propor a substituição da mesma pelo nosso método de diagnóstico padronizado que alçará o mesmo objetivo em 72 horas ao invés de 60 a 90 dias.

9. PONTOS CRÍTICOS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Para que ocorra um crescimento adequado na cultura do *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis* é de grande importância a forma de envio da amostra a ser analisada, pois o modo como se faz a coleta, armazenamento e envio da amostra influencia diretamente o resultado tanto da cultura como do qPCR, pois o material pode conter inibidores da reação, e até mesmo a amostra pode entrar em autólise, como ocorreram muitas vezes durante o experimento.

Um protocolo mais rigoroso de coleta deve ser adotado e o imediato congelamento da amostra pode evitar contaminantes e autólise da amostra, sendo considerado esse um fator restritivo para o sucesso do diagnóstico da TBb.

Outro fator limitante é a qualidade da extração do material genético, que influenciará a detecção e quantificação do patógeno. É importante garantir a reprodutibilidade das etapas de extração.

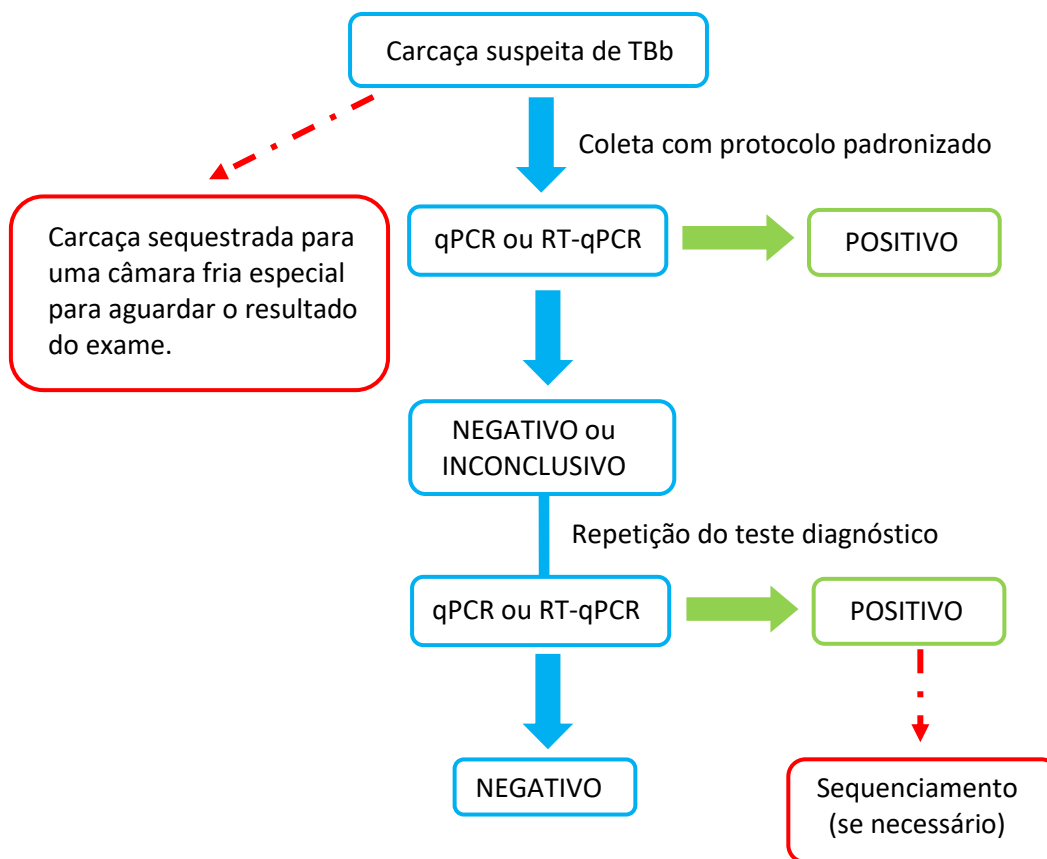
Os principais problemas que podem ocorrer são a extração de inibidores juntamente com os ANs ou a degradação da amostra.

10. FLUXOGRAMA PROPOSTO PARA O DIAGNÓSTICO EM CARCAÇAS BOVINAS SUSPEITAS DE TBb

Foram consideradas positivas para TBb as amostras que apresentaram o valor de Ct menor ou igual a 36,56 associado ao valor do $Tm = 86,96$ °C (± 1 °C). Valores dessas variáveis diferentes destes parâmetros (Ct e Tm) foram considerados negativos ou inconclusivos de acordo com a análise da amplificação e curva de *melting* quando comparadas com a curva padrão.

Quando a amostra for considerada negativa ou inconclusiva deve-se proceder da seguinte maneira: a reação de qPCR e/ou RT - qPCR devem ser repetidas e as amostras nas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} devem ser testadas novamente em duplicata.

Após a padronização da qPCR, foi adotado o protocolo de que a carcaça suspeita de TBb deve ser sequestrada para uma câmara fria especialmente para este caso e as amostras de linfonodos enviadas para análise. O protocolo de diagnóstico sugerido seria semelhante ao que o CDC propôs para humanos com algumas modificações: após o diagnóstico de qPCR, se a amostra for considerada negativa ou inconclusiva deve ser realizada a repetição da qPCR e/ou RT - qPCR, como descrito anteriormente (amostra em diluições), posteriormente testada em duplicata e se necessário realizar o sequenciamento antes da liberação dos resultados (**Fluxograma 2**).



Fluxograma 2. Protocolo proposto de acordo com os dados desse estudo para o diagnóstico de TBb em carcaças bovinas suspeitas.

11. DESAFIOS CIENTÍFICOS E TECNOLÓGICOS

Em princípio, a ideia era investigar qual a frequência de tuberculose em humanos era causado pelo *M. bovis* no estado de São Paulo-SP. Essa pesquisa obteve raríssimos resultados, sendo na verdade um levantamento epidemiológico desencorajado pela ausência de dados positivos, principalmente pelo desinteresse por parte dos médicos em elucidar a origem da infecção da TB em humanos.

Diante das visitas a grandes centros de referência em TB, conheci muitas pessoas *experts* no assunto e tive a oportunidade de conhecer Dra. Érica Chimara (diretora IAL - SP) que após algumas conversas me propôs a ideia de um diagnóstico rápido para TBb em animais de produção e tornou-se minha co-orientadora.

Da discussão intensa e produtiva sobre os métodos, leituras de artigos e conclusões emergiram novas ideias, diversas questões, assim como a parceria com empresas privadas como a *BD* e a *Thermo Fisher* e mais recentemente a *Qiagen*.

As dificuldades e impasses que enfrentamos me fez buscar mais e mais ajuda e encontramos alguns problemas com os nossos *primers* e contaminação cruzada. Nesse contexto li um artigo de Dykema e col. (2016), de Iowa - EUA, corripondi-me com o autor principal e obtive várias informações fornecidas por este grupo. Outra grande parceria surgia, agora com a equipe desse projeto que demonstrava o mesmo interesse que nós, desenvolver um diagnóstico rápido e eficiente para TBb em tecidos de carcaças de bovinos para ser utilizado na rotina da inspeção de carcaças bovinas.

Nosso projeto seguiu com essas parcerias valiosas e mais uma vez enfrentamos novos desafios e dificuldades agora quanto ao controle interno que utilizávamos, e mais uma vez busquei novas perspectivas e em um artigo de Portugal encontrei a resposta e por coincidência um dos autores visitou o IAL em São Paulo - SP e pude conversar sobre o problema enfrentado.

A TBb constitui o modelo clássico da doença infecciosa de curso lento e insidioso e, mais do que de recursos estritamente tecnológicos, depende, para seu enfrentamento, de serviços de inspeção, pesquisadores, profissionais resolutivos, ágeis e comprometidos com a saúde pública. Estes profissionais

dedicados, atuando em equipes multidisciplinares, apoiados por sistemas de informação adequados devem ser, equipes com atuação nos grandes e pequenos abatedouros e não exclusivamente no âmbito das próprias unidades de inspeção federal, e providas de recursos diagnósticos e apoio tecnológico e científico necessários à instituição e manutenção do controle de produtores e de funcionários treinados.

Os protocolos de diagnósticos e condições estabelecidos por este estudo são de extrema importância para os produtores, frigoríficos, médicos veterinários, consumidores e importadores de carne bovina, pois vão de encontro aos extenuantes esforços por qualidade da carne e sanidade animal. Apesar de não haver estatísticas que quantifiquem as perdas econômicas impostas pela tuberculose bovina no Brasil, os pesquisadores, a Medicina Veterinária e esse projeto serão a linha de frente para entendê-la e combatê-la.

12. CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolvemos um protocolo de diagnóstico provado ser um método rápido, econômico, eficiente, específico e sensível para detectar o *M. bovis* e/ou *M. tuberculosis* diretamente de linfonodos de carcaças de bovinos. O método baseia-se na amplificação de DNA e/ou RNA pela qPCR ou RT-qPCR, com o uso de *primers* altamente sensíveis e específicos para o alvo. Propomos uma validação e que este protocolo sirva como uma ferramenta para evitar descartes e desclassificações errôneas de carcaças em frigoríficos, além de defender melhor a saúde pública

Um ponto fundamental para o sucesso da qPCR ou RT-qPCR, e da cultura microbiológica é a coleta. As primeiras amostras coletadas foram descartadas por ocorrência de autólise contaminando assim o meio seletivo de cultura para micobactérias, confirmando que um protocolo de coleta ideal e padronizado deve ser adotado rigorosamente. Mesmo seguindo o protocolo de coleta instituído, conclui-se que o ponto crítico da coleta é o armazenamento da amostra, que deve ser rigorosamente congelada a -20 °C imediatamente após a coleta do linfonodo.

Este artigo descreve a implementação de PCR direto em tecido bovino suspeitos de TBb. Para um programa de vigilância de abate, este ensaio permitiu testar todas as amostras com a técnica de qPCR. Estas foram submetidas em paralelo com a cultura, mas não acusaram crescimento, talvez por necessitar de grandes quantidades de bacilos viáveis na amostra.

Limitações do ensaio de qPCR incluem a necessidade de pessoal altamente treinado, fluxo de trabalho, rigorosos procedimentos, controles ambientais para evitar a contaminação cruzada e o pequeno volume da amostra exigindo cuidadosas dissecações de lesões visíveis. Apesar dessas limitações, o ensaio apresenta-se extremamente sensível e específico.

Pode-se concluir que não há animais com lesões clássicas de TBb, pois mesmo as lesões consideradas clássicas foram erroneamente classificadas como TBb, bem como as consideradas adenites, desconhecendo a etiologia da lesão, podem se tratar de uma TBb, portanto não pode haver liberação de carcaças com tais lesões para o consumo interno sem um teste diagnóstico mais preciso.

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 Epizoities. **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.; MOHAPATRA, 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.

15. ANEXO

ANEXO 1 - Artigo 171 do Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017.

ANEXO 1**Artigo 171 do Decreto nº 9.069, de 2017**

Art. 171. As carcaças de animais com tuberculose devem ser condenadas quando:

- I** - no exame ante mortem o animal esteja febril;
- II** - sejam acompanhadas de caquexia;
- III** - apresentem lesões tuberculósicas nos músculos, nos ossos, nas articulações ou nos linfonodos que drenam a linfa destas partes;
- IV** - apresentem lesões caseosas concomitantes em órgãos ou serosas do tórax e do abdômen;
- V** - apresentem lesões miliares ou perláceas de parênquimas ou serosas;
- VI** - apresentem lesões múltiplas, agudas e ativamente progressivas, identificadas pela inflamação aguda nas proximidades das lesões, necrose de liquefação ou presença de tubérculos jovens;
- VII** - apresentem linfonodos hipertrofiados, edemaciados, com caseificação de aspecto raiado ou estrelado em mais de um local de eleição; ou
- VIII** - existam lesões caseosas ou calcificadas generalizadas, e sempre que houver evidência de entrada do bacilo na circulação sistêmica.

§ 1º As lesões de tuberculose são consideradas generalizadas quando, além das lesões dos aparelhos respiratório, digestório e de seus linfonodos correspondentes, forem encontrados tubérculos numerosos distribuídos em ambos os pulmões ou encontradas lesões no baço, nos rins, no útero, no ovário, nos testículos, nas cápsulas suprarrenais, no cérebro e na medula espinhal ou nas suas membranas.

§ 2º Depois de removidas e condenadas as áreas atingidas, as carcaças podem ser destinadas à esterilização pelo calor quando:

- I** - os órgãos apresentem lesões caseosas discretas, localizadas ou encapsuladas, limitadas a linfonodos do mesmo órgão;

II - os linfonodos da carcaça ou da cabeça apresentem lesões caseosas discretas, localizadas ou encapsuladas; e

III - existam lesões concomitantes em linfonodos e em órgãos pertencentes à mesma cavidade.

§ 3º Carcaças de animais reagentes positivos a teste de diagnóstico para tuberculose devem ser destinadas à esterilização pelo calor, desde que não se enquadrem nas condições previstas nos incisos I a VIII do caput.

§ 4º A carcaça que apresente apenas uma lesão tuberculósica discreta, localizada e completamente calcificada em um único órgão ou linfonodo pode ser liberada, depois de condenadas as áreas atingidas.

§ 5º As partes das carcaças e os órgãos que se contaminarem com material tuberculoso, por contato acidental de qualquer natureza, devem ser condenados.

Destarte, dentro de um Departamento de Inspeção Final (DIF) sob o controle do SIF, todas as condutas do Auditor Fiscal Federal Agropecuário devem pautar-se consoante ao suso mencionado artigo, não obstante seja este um critério meramente baseado em sinais clínicos observados nos animais durante a inspeção ante mortem, diga-se de passagem, impossíveis de possibilitar um fechamento de diagnóstico, servindo apenas de subsídio maior a ser utilizado juntamente aos demais sinais aferidos com a inspeção visual, palpação e olfatória de carcaças e órgãos, também com as diversas incisões praticadas, cuja base segue os critérios contidos no Manual de Inspeção de Carne bovina e Padronização de técnicas, Instalações e Equipamentos (MAPA, 2007) junto as linhas de inspeção.

Nos casos de aproveitamento condicional os produtos condenados devem ser submetidos, a critério do SIF, aos seguintes tratamentos pelo calor por meio de: a) cozimento em temperatura de 76,6°C (setenta e seis inteiros e seis décimos de graus Celsius) por no mínimo trinta minutos; b) fusão pelo calor em temperatura mínima de 121°C (cento e vinte e um graus Celsius); ou c) esterilização pelo calor úmido, com um valor de F0 igual ou maior que três minutos ou a redução de doze ciclos logarítmicos (12 log10) de *Clostridium botulinum*, seguido de resfriamento imediato. A aplicação de qualquer um dos tratamentos condicionais deve garantir a inativação ou a destruição do agente envolvido.