

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 24/05/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS NO LEITE DE VACAS
POSITIVAS NO TESTE DE TUBERCULINIZAÇÃO CERVICAL
COMPARATIVO

CARMEN ALICIA DAZA BOLAÑOS

Botucatu - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS NO LEITE DE VACAS
POSITIVAS NO TESTE DE TUBERCULINIZAÇÃO CERVICAL
COMPARATIVO

CARMEN ALICIA DAZA BOLAÑOS

Tese apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Adjunto Márcio Garcia Ribeiro.

Área: Saúde Animal, Saúde Pública
Veterinária e Segurança Alimentar.

Botucatu - SP

2016

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

Bolaños, Carmen Alicia Daza.

Isolamento microbiológico e caracterização molecular de micobactérias no leite de vacas positivas no teste de tuberculinização cervical comparativo / Carmen Alicia Daza Bolaños. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502034

1. Bovino de leite - Doenças. 2. Tuberculose em bovino. 3. Mycobacterium bovis. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Leite - Bacteriologia. 6. Alergia e imunologia - Diagnóstico.

Palavras-chave: Alergodagnóstico; Bovino; Mycobacterium; PCR-PRA; Sequenciamento.

Nome do Autor: **Carmen Alicia Daza Bolaños**

Título: **ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS NO LEITE DE VACAS POSITIVAS NO TESTE DE TUBERCULINIZAÇÃO CERVICAL COMPARATIVO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adjunto Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Adjunto Paulo Francisco Domingues

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Titular. Helio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Dra. Evelise Oliveira Telles

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ - USP/ São Paulo

Prof. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Membro

Departamento de Microbiologia, Instituto Lauro de Souza Lima
Bauru – SP.

Data da defesa: 24 de novembro de 2016.

DEDICATÓRIA

Ao meu avô, meu anjo da guarda que sempre me acompanha
A minha avó quem sempre me cuidava com suas orações
Aos meus pais, meus amigos, meu suporte
Ao meu irmão, minha companhia

AGRADECIMENTOS

Dizer obrigada é pouco para expressar a gratidão com todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte deste processo, pequena ou grande foi muito importante a ajuda que me brindaram, sem vocês não teria sido possível.

Ao Deus por cada dia de minha vida, pelas bençãos recebidas porque me encham de alegria e pelas dificuldades porque me fazem mais forte.

Aos meus pais Robert e Carmen Eugenia, meus irmãos Daniel e Sebastián por seu apoio incondicional e sua preocupação por meu bem-estar.

Ao Darío Alejandro, quem sempre me apoiou, e de quem aprendi coisas muito valiosas para minha vida.

Ao Professor Márcio Garcia Ribeiro, pela confiança depositada por acreditar em mim, por ter-me aceito como orientada ainda sem me conhecer.

Ao Fernando José Paganini Listoni pela ajuda durante todo o tempo, pelos conselhos, pelo café.

Às melhores amigas que tive a sorte de encontrar no Brasil, Carolina Lechinski, Ana Carolina Alves, Marília Junqueira, Rafaela Rissetti, Amanda Bonalume, Simony Guerra, com quem compartilhei mais do que o amor pela microbiologia.

Aos Colombianos que conheci aqui em Botucatu, mas que sem dúvida construímos laços de amizade muito fortes, Luz Ângela Correa, Viviana Vallejo, Fabiola Ocampo, Juliana Mira, Carlos Barrera, Diana Villota, Diana Rodríguez, Felipe Pérez, Mairena Lozano, Darío Pineda.

A todos que me ajudaram no projeto de pesquisa, Rodrigo Motta, Antônio Souza, Cássia Ikuta, obrigada pela paciência e pela disposição.

Ao professor Marcos Bryan e à professora Edith Mariela Burbano-Rosero pela ajuda na interpretação dos resultados.

Aos professores, José Carlos Pantoja, Helio Langoni e Paulo Domingues, pelos aprendizados.

Às professoras Evelise Telles e Ida Maria Foschiani, por ter aceito o convite como banca examinadora.

À Dri (Adriana Vieira), Seu Roberto, Adilson, Cleide, Cristina, Dona Rita.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo do Doutorado.

Obrigada Botucatu por ter me acolhido, porque conheci pessoas maravilhosas que entraram na minha vida para ficar, obrigada porque sem dúvida não sou a mesma pessoa, sou melhor.

“El futuro pertenece a aquellos que creen en el poder de sus sueños”.
(Eleanor Roosevelt)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Concentrações de produtos de PCR para sequenciamento segundo o tamanho do fragmento. IBTEC, Botucatu, SP.....	25
Tabela 2-	Frequência relativa e absoluta de animais positivos no teste tuberculinização cervical comparativo em vacas em lactação em municípios do sudoeste do Paraná, 2014 – 2015.....	28
Tabela 3-	Tempo de isolamento, coloração das colônias, tamanho de fragmento amplificado pelas enzimas de restrição e espécies de micobactérias identificadas no cultivo microbiológico e PCR-PRA no leite de vacas positivas no teste de tuberculinização cervical comparativo. Sudoeste do Paraná 2014 - 2015.....	31
Tabela 4-	Espécies de micobactérias identificadas por sequenciamento, medidas estatísticas de significância, número de acesso e fonte de isolamento da espécie de referência, em isolados obtidos do leite de vacas positivas no teste de tuberculinização cervical comparativo. Botucatu, SP, 2016.....	33
Tabela 5-	Comparação das espécies de micobactérias, tamanhos de fragmentos identificados por PRA-PRA e sequenciamento do gene <i>hsp65</i> , em isolados obtidos do leite de vacas positivas no teste de tuberculinização cervical comparativo. Botucatu, SP, 2016.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição de vacas em lactação tuberculinizadas pelo teste cervical comparativo, segundo a raça dos animais. Sudoeste do Paraná, 2014 – 2015.....	29
Figura 2-	Distribuição de vacas em lactação tuberculinizadas pelo teste cervical comparativo, segundo a idade dos animais. Sudoeste do Paraná, 2014 – 2015.....	29
Figura 3-	Colônias creme em meio de Stonebrink com 20 dias de incubação, sugestivas de micobactérias, isoladas do leite de vacas positivas na tuberculinização. Botucatu, SP, 2015.....	30
Figura 4-	Colônias laranja em meio de Lowenstein-Jensen com 20 dias de incubação, sugestivas de micobactérias, isoladas do leite de vacas positivas na tuberculinização. Botucatu, SP, 2015.....	30
Figura 5-	Presença de bacilos álcool-ácido resistentes (seta) obtidos no meio de Stonebrink do leite de vacas positivas na tuberculinização (Ziehl-Neelsen, 1000X). Botucatu, SP, 2015.....	30
Figura 6-	Gel de agarose 3% com bandas do produto da PCR com enzima <i>BstEII</i> em 14 isolados de micobactérias obtidos do leite de vacas positivas na tuberculinização. Botucatu, SP. 2015.....	32

Figura 7-	Gel de agarose 3% com bandas do produto da PCR com enzima <i>HaeIII</i> em 14 isolados de micobactérias obtidos do leite de vacas positivas na tuberculinização. Botucatu, SP, 2015.....	32
Figura 8-	Relação filogenética entre espécies de micobactérias (<i>M. engbaekii</i> , <i>M. arupense</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> e <i>M. heraklionense</i>) identificadas no leite de vacas positivas na tuberculinização, revelando a presença de 4 clusters (I, II, III, IV). Árvore filogenética analisada pelo método de Neighbor-Joining, considerando 1.000 replicações. Botucatu, SP, 2016.....	34
Figura 9-	Dendograma de similaridade genética, com base no coeficiente de Dice e análise do gene <i>hsp65</i> , entre espécies de micobactérias identificadas no leite de vacas positivas no teste de tuberculinização cervical comparativo. Botucatu, SP, 2016.....	35

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

16s rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal 16s
Aids	Acquire Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
bp	Base pair (pares de bases)
CRMV-PR	Conselho regional de medicina veterinária Paraná
DNA	Desoxirribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DR	Direct repeat (Repetição direta)
EUA	Estados Unidos da América
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
Hsp65	Heat shock protein (proteína de choque térmico)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LAM	Lipoarabinomannana
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIRU-VNTR	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat (número variável de unidades repetitivas intercaladas micobacterianas)
NaOH	Hidróxido de sódio
NTM	Nontuberculous mycobacteria (Micobactérias não tuberculosas)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PCR-PRA	Polymerase Chain Reaction - Pattern Restriction Analysis (Reação em cadeia da polimerase com padrão de análise de enzimas de restrição)
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	Purified Protein Derivative (Derivado purificado proteico)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo do tamanho de fragmento de restrição)
Spoligotyping	Spacer Oligonucleotide Typing
UHT	Ultra High Temperature
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMARIO

	Página
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1 Propriedades gerais do gênero <i>Mycobacterium</i>	05
2.2 Aspectos epidemiológicos.....	06
2.3 Tuberculose bovina.....	06
2.3.1 Aspectos gerais da doença.....	06
2.3.2 Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT.....	09
2.3.2.1 Testes de tuberculinização intradérmica no diagnóstico da tuberculose bovina.....	09
2.3.2.2 Destino dos animais positivos nos testes de tuberculinização.....	11
2.4 Outras micobacterioses em animais de produção.....	11
2.5 Diagnóstico.....	12
2.5.1 Diagnóstico bacteriológico.....	12
2.5.2 Diagnóstico molecular.....	13
2.5.2.1 PCR-PRA.....	14
2.5.2.2 PCR Multiplex.....	14
2.5.2.3 PCR em tempo real (qPCR).....	14
2.5.2.6 Sequenciamento do DNA.....	15
2.5.2.7 Diagnóstico de micobactérias no leite de vacas.....	15
2.5.2.8 Diagnóstico de micobactérias no leite de vacas tuberculinizadas.....	17
3. HIPOTHESES DE ESTUDO.....	19
4. OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo geral.....	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1 Animais e teste de tuberculinização.....	21
5.2 Coleta de amostras.....	21

5.3 Identificação microbiológica das micobactérias.....	22
5.4 Identificação molecular das micobactérias.....	22
5.4.1 Extração do DNA.....	23
5.4.2 PCR Multiplex.....	23
5.4.3 PCR-PRA.....	24
5.4.4 Sequenciamento.....	25
5.4.4.1 Edição e análises das sequências.....	25
5.4.4.2 Análise das sequências.....	26
5.4.4.2.1 Construção de árvores filogenéticas.....	26
5.4.4.2.2 Construção do dendograma.....	26
5.5 Análise estatística e cálculo do universo amostral.....	27
5.6 Comissão de Ética.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1 Animais positivos no teste de tuberculinização cervical comparativo.....	28
6.2 Diagnóstico microbiológico.....	29
6.3 Detecção molecular dos isolados.....	31
6.3.1 PCR Multiplex.....	31
6.3.2 PCR-PRA.....	31
6.3.3 Sequenciamento.....	33
6.3.3.1 Árvore filogenética.....	34
6.3.3.2 Similaridade genética.....	35
6.3.3.3 Concordância de detecção das espécies de micobactérias nos testes moleculares.....	36
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÕES.....	44
9. BIBLIOGRAFIA.....	45
10. ARTIGO CIENTIFICO.....	59
Normas da revista.....	59
Artigo.....	63
ANEXOS.....	77

BOLAÑOS, C.A.D. **Isolamento microbiológico e caracterização molecular de micobactérias no leite de vacas positivas no teste de tuberculinização cervical comparativo.** Botucatu, 2016. 80p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

A tuberculose, causada por *Mycobacterium bovis*, permanece como uma das principais doenças infecciosas de bovinos, em virtude dos prejuízos causados com a redução na produção de carne e leite, condenação de carcaças em abatedouros e embargos na comercialização de animais e produtos de origem animal, bem como pelo potencial zoonótico do patógeno, particularmente pela eliminação pelo leite. Ademais, micobactérias não tuberculosas ou atípicas são causa emergente de doenças em humanos e em animais. Apesar de a tuberculinização representar o principal teste diagnóstico “in vivo” da doença em rebanhos, poucos estudos têm avaliado a eliminação de micobactérias pelo leite em vacas positivas nos testes intradérmicos. O objetivo do presente estudo foi identificar espécies de *Mycobacterium* em amostras de leite de vacas positivas no teste de tuberculinização cervical comparativo. Um “pool” do leite dos quartos de 142 (2,97%) vacas positivas - proveniente de 4.766 animais tuberculinizados - foi coletado assepticamente e cultivado em condições de aerobiose a 37°C nos meios de Lowestein-Jensen e Stonebrink, mantidos por até 90 dias. Colônias compatíveis com micobactérias foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen para o diagnóstico de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e detecção molecular. Catorze estirpes isoladas em 12 amostras (n=12/142, 8.4%) foram classificadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase com enzimas de restrição (PCR-PRA) e sequenciamento como segue: *M. mucogenicum* tipo 2 (n=4), *M. nonchromogenicum* tipo 1 (n=3), *M. hodleri* type 1 (n=2), *M. terrae* tipo 3 (n=3), *M. cookii* tipo 1 (n=1), e *M. szulgai* tipo 1 (n=1). O sequenciamento do gene *hsp65* revelou >98% de similaridade com as espécies de micobactérias depositadas no GeneBank, e detectou: *M. engbaekii* (n=5), *M. arupense* (n=4), *M. nonchromogenicum* (n=3) e *M. heraklionense* (n=2). Houve concordância na detecção das espécies de micobactérias entre PCR-PRA e sequenciamento em três dos isolados, exclusivamente da espécie *M. nonchromogenicum* (n=3/14;

21.4%). Árvore filogenética e dendograma (baseado no gene *hsp65*) dos 14 isolados revelou 4 clusters e 3 subclusters (79,0% de similaridade), respectivamente, e classificou os isolados como micobactérias atípicas agrupados no complexo *M. terrae*. Apesar da ausência de espécies do complexo *M. tuberculosis* nas amostras cultivadas, a presença de micobactérias atípicas, alerta para o risco de transmissão do patógeno pelo leite ou derivados para os humanos, visto que muitas dessas espécies de micobactérias já foram descritas causando infecções pulmonares e extrapulmonares em humanos imunocompetentes e imunossuprimidos.

Palavras-Chave: *Mycobacterium*, bovino, alerгодиагнóstico, PCR-PRA, sequenciamento.

BOLAÑOS, C.A.D. **Microbiological and molecular identification of mycobacteria in milk from cows positive to the cervical comparative tuberculin test.** Botucatu, 2016. 80p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

ABSTRACT

Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* remains as one of the major infectious diseases of cattle, due to losses caused by the reduction in the meat and milk yield, condemnation of carcasses in slaughterhouses, and embargoes on the trade of bovine products, as well as the zoonotic potential of pathogen particularly by elimination in milk. In addition, nontuberculous or atypical mycobacteria infections are an emerging diseases to human and animals. Despite the tuberculin test represents the main *in vivo* diagnostic method to control and eradication of the bovine disease worldwide, few studies have focused the elimination of mycobacteria in milk from cows positive to the tuberculin tests. The aim of this study was to identify *Mycobacterium* species in milk samples from positive cows to the comparative cervical tuberculin test. A pool of milk from all quarters of 142 (2.97%) positive cows from 4,766 animals submitted to comparative cervical tuberculin test was aseptically collected and cultivated aerobically onto Lowenstein-Jensen and Stonebrink media, kept for up to 90 days. The colonies were subjected to Ziehl-Neelsen stain for detecting acid-fast bacilli (AFB) and molecular classification. Fourteen strains were isolated from 12 cows (n=12/142; 8.4%) and species identified by polymerase chain reaction with restriction enzymes (PCR-PRA) were: *M. mucogenicum* type 2 (n=4), *M. nonchromogenicum* type 1 (n=3), *M. hodleri* type 1 (n=2), *M. terrae* type 3 (n=3), *M. cookii* (n=1), and *M. szulgai* (n=1). The sequencing of *hsp65* gene identified mycobacteria species in the 14 isolates with an identity higher than 98%, as follow: Sequencing of 14 isolates allowed identify the followed species: *M. engbaekii* (n=5), *M. arupense* (n=4), *M. nonchromogenicum* (n=3), and *M. heraklionense* (n=2). There was concordance of mycobacterial typing between PCR-PRA and sequencing only to *M. nonchromogenicum* species (n=3/14; 21.4%). The phylogenetic tree and dendrogram of 14 isolates showed four clusters and three subclusters, respectively, identified as nontuberculous

mycobacteria grouped in *Mycobacterium terrae* complex. Despite the absence of species of the *M. tuberculosis* complex in milk samples, the identification of nontuberculous or atypical mycobacteria highlights the risk of pathogen transmission from bovine-to-humans through milk or dairy products, since many of mycobacterial species described here have been reported causing pulmonary and extrapulmonary diseases both in immunocompetent and immunocompromised people.

Keywords: *Mycobacterium*, bovine, tuberculin skin test, PCR-PRA, sequencing.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* apresenta patógenos estritos (ou obrigatórios) e oportunistas que acometem animais e humanos (RASTOGI et al., 2001). Entre as micobactérias de caráter estrito estão incluídas as espécies pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. canetti*, *M. mungi*, *M. orygis* e *M. suricattae*) [ALEXANDER et al., 2010; VAN INGEN et al., 2012; DIPPENAR et al., 2015] que causam doenças infectocontagiosas de distribuição mundial, de evolução crônica e alto impacto em saúde pública e saúde animal, como a tuberculose humana (*M. tuberculosis*) e a tuberculose bovina (*M. bovis*) (ACHA e SZYFRES, 2005; GOODCHILD e CLIFTON-HADLEY, 2001; QUINN, et al., 2011). Micobactérias oportunistas compreendem espécies de menor patogenicidade, porém também com importância clínica, especialmente pelo aumento de casos de humanos infectados pela síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) [WAGNER e YOUNG, 2004].

As espécies do gênero *Mycobacterium* podem ser transmitidas para os humanos pela inalação de aerossóis e ingestão de água contaminada, bem como pelo consumo de leite e derivados ingeridos na forma crua ou não submetidos aos tratamentos térmicos de pasteurização, fervura ou UHT (DAILLOUX et al., 1999; ACHA e SZYFRES, 2005). Estima-se que, no Brasil, cerca de 20 a 30% do leite bovino produzido seja comercializado sem inspeção sanitária (VIDAL-MARTINS et al., 2013; MOTTA et al., 2015), fato que aumenta o risco de transmissão de patógenos de potencial zoonótico pelo leite e derivados, notadamente do gênero *Mycobacterium* (ABRAHÃO, 1999; ACHA e SZYFRES, 2005). Ademais, *Mycobacterium* sp. pode manter-se viável em derivados como queijo e iogurte produzidos com leite cru por até 14 dias e até por 100 dias na manteiga (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

A tuberculose humana é considerada atualmente doença re-emergente pela Organização Mundial da Saúde (OMS), devido ao incremento do número de registros da doença em humanos (WHO, 2015), particularmente em pessoas vivendo com HIV/Aids, além da preocupação com o aumento de micobactérias multidroga resistentes (HOLLOWAY et al., 2011; WHO, 2016). A OMS estimou que ocorrem cerca de 9,6 milhões de novos casos da doença em humanos todo

o ano, dos quais cerca de 1,5 milhões evoluem para óbito (WHO, 2015). Estima-se que, entre 10 e 15% dos casos de tuberculose em humanos provenientes de países em desenvolvimento sejam causados por *M. bovis*, e 1 a 2% nos países desenvolvidos (ASHFORD et al., 2001; ACHA e SZYFRES, 2005).

No Brasil, 70 mil novos casos humanos de tuberculose são oficialmente notificados por ano, que resultam em aproximadamente 4,6 mil mortes. O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (BRASIL, 2016). Cerca de 2% das infecções pulmonares e extrapulmonares em humanos são causadas por *M. bovis* (LOBUE et al., 2010) particularmente em trabalhadores rurais e magarefes, denotando o comportamento ocupacional da doença (O'REILLY e DABORN, 1995; PAES e FRANCO, 2016).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui atualmente o maior rebanho comercial de bovinos de todo o mundo, com cerca de 212,34 milhões de cabeças (IBGE, 2014). Estima-se que aproximadamente 1,3% do rebanho bovino esteja acometido pela tuberculose (FRANCO et al., 2013), particularmente animais destinados à produção de leite (BRASIL, 2006). Além dos reflexos em saúde pública, a infecção por micobactérias em bovinos causa severos prejuízos econômicos aos produtores, particularmente no tocante à condenação de carcaças nos abatedouros, redução na produção do leite e carne, abate de animais positivos em testes de tuberculinização em programas de controle/erradicação, depreciação do valor comercial de animais provenientes de rebanhos endêmicos e embargos internacionais para a exportação de produtos de origem bovina (PAES e FRANCO, 2016).

No Brasil foi deflagrado em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com a finalidade de reduzir a prevalência da tuberculose em bovinos e búfalos, minimizando o impacto negativo da doença em saúde animal, assim como seus reflexos em saúde pública. O controle da tuberculose bovina pelo PNCEBT é fundamentado, principalmente, em testes de tuberculinização e abate sanitário de animais positivos (BRASIL, 2006).

As espécies do gênero *Mycobacterium* são exigentes quanto às necessidades de isolamento microbiano, necessitando de meios seletivos e ricos, geralmente a base de ovo (CORNER, 1994; QUINN et al., 2011). No tocante aos aspectos microbiológicos são divididas em espécies de multiplicação rápida e lenta. As espécies de multiplicação lenta podem levar até 90 dias para o isolamento. Devido à necessidade de grande tempo requerido para o isolamento microbiano, tem-se estimulado nas últimas décadas o desenvolvimento de técnicas moleculares que possibilitem o diagnóstico rápido, acurado e com custo acessível (SOINI e MUSSER, 2001).

Neste contexto, têm sido utilizadas com maior frequência no diagnóstico as técnicas de reação em cadeia da polimerase associadas a enzimas de restrição (PCR-PRA) [PIYKAYITIS et al., 2002; TELENTI et al., 1993], PCR multiplex (POROCA et al., 2009; SHAH et al., 2002; MOHAMED et al., 2014), PCR em tempo real (SHRESTHA et al., 2003; PINSKY e BANAEI, 2008; RICHARDSON et al., 2009) e sequenciamento (RINGUET et al., 1999; MACNABB et al., 2004; ESCOBAR-ESCAMILLA et al., 2014). Estudos têm observado o aumento da sensibilidade e especificidade diagnóstica quando se associa o diagnóstico microbiológico clássico com técnicas que utilizam marcadores moleculares na identificação de *Mycobacterium* sp. tanto em nível individual, como em rebanhos. As técnicas moleculares têm sido úteis no estudo da distribuição geográfica da diversidade de espécies, em episódios de surtos e na vigilância epidemiológica da tuberculose bovina e outras micobacterioses (SUPPLY et al., 2000, 2006; ROMERO et al., 2006; NENONAKIS et al., 2008; ROCHA et al., 2013).

Particularmente no leite cru de bovinos, a presença de *M. bovis* e micobactérias atípicas foi descrita na Tanzânia (KAZWALA et al., 1998). *M. bovis* e *M. africanum* foram identificados em vacas na Nigéria (CADMUS et al., 2010) bem como espécies atípicas de *Mycobacterium* na Turquia (KONUK et al., 2007). No Brasil, Franco et al. (2013) descreveram um isolado de *M. bovis* e várias espécies atípicas de micobactérias em leite de tanques de expansão coletivos, individuais e em leite comercializado sem inspeção sanitária (“leite informal”).

Apesar dos testes de tuberculinização (imunodiagnóstico ou alergodiagnóstico) representarem o principal método de diagnóstico “in vivo” da tuberculose bovina, são escassos, em todo o mundo, estudos envolvendo a

eliminação de micobactérias no leite de vacas positivas nos testes de tuberculinização. Neste contexto, na Tunísia, Ben Kahla et al. (2011) identificaram por métodos microbiológicos e spoligotyping cinco isolados de *M. bovis* (4,9%) obtidos de 306 amostras de leite de 102 vacas positivas no teste cervical simples. Pandey et al. (2013), na Zâmbia, investigaram a presença de *M. bovis* no leite de 16 vacas positivas na tuberculinização identificando três (18,7%) amostras positivas com métodos fenotípicos, confirmados por PCR.

No Brasil, Pardo et al. (2001) em 52 vacas com resultado positivo ou suspeito na tuberculinização com o teste de Stormont identificaram, com base em métodos fenotípicos, *M. bovis* e outras micobactérias atípicas em 78 (10%) amostras de leite obtidas de 19 animais. Digno de nota que, todos os estudos supracitados enalteceram a preocupação com a eliminação de micobactérias pelo leite, reforçando o impacto desses achados em saúde pública, em razão do risco de o consumo do leite cru ou derivados sem fiscalização e/ou tratamento térmico adequado.

Considerando o impacto negativo em saúde animal e saúde pública da tuberculose e a emergência de doenças causadas por outras micobactérias, o presente estudo investigou por métodos fenotípicos e moleculares espécies de *Mycobacterium* eliminadas no leite de vacas positivas no teste de tuberculinização cervical comparativo.

8. CONCLUSÕES

✓ A ocorrência de cerca de 3% dos animais positivos no teste de tuberculinização cervical comparativo, com identificação de micobactérias no leite, reforça a necessidade de rígido controle da doença na região estudada;

✓ A identificação molecular de *M. mucogenicum*, *M. nonchromogenicum*, *M. hoderi*, *M. terrae*, *M. cookii*, *M. szulgai*, *M. arupense*, *M. heraklionense* e *M. engbaekii* com base no PCR-PRA e/ou sequenciamento, obtidos do leite dos animais amostrados, revela a diversidade de micobactérias atípicas que podem acometer a glândula mamária das vacas;

✓ Exceto *M. engbaekii*, a identificação das demais espécies de micobactérias representa risco em saúde pública, em razão do hábito de consumo de leite “in natura” sem tratamento térmico adequado ou mesmo sem fiscalização sanitária no Brasil, posto que essas espécies do patógeno já foram descritas em casos de micobacterioses em humanos.

✓ Apesar da baixa concordância na detecção das espécies entre PCR-PRA e o sequenciamento - com exceção de *M. nonchromogenicum* identificados em ambas - essas técnicas foram eficientes na detecção de micobactérias atípicas e podem ser utilizadas como métodos complementares ao cultivo microbiológico convencional no diagnóstico das infecções por micobacterioses em animais.

9. BIBLIOGRAFIA

ABEDALTHAGAFI, M.; ROSENBERG, O.; MILLER, S. First report of tenosynovitis in an immunocompetent person caused by *M. heraklionense*. *JMM Case Reports*, v. 1, p. 1-3, 2014.

ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. *Archives of Veterinary Science*, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: bacterioses and mycoses*. Washington, DC: Pan American Health Organization, 2005. v. 1, 378 p. (PAHO Scientific and Technical Publication, n. 580).

ALEXANDER, K. A.; LAVER, P. N.; MICHAEL, A. L.; WILLIAMS, M.; VAN HELDEN, P. D.; WARREN, R. M.; VAN PITTIUS, N. C. G.; Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 8, p. 1296-1299, 2010.

ANON, A. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European union in 2007. *European Food Safety Authority*, v. 223, p. 142–154, 2009.

ASHFORD, D. A.; WHITNEY, E.; RAGHUNATHAN, P.; COSIVI, O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. Technical and Scientific Review. *International Office Of Epizootics*, v. 20, p. 105–112, 2001.

ASIL, E. T. A.; SULIEMAN, M.; SANOUSI, E.; GAMEEL, A.; BEIR, E. H.; FATHELRAHMAN, M.; TERAB, N. M.; MUAZ, A. M.; HAMID, M. E. Bovine tuberculosis in South Darfur State, Sudan: an abattoir study based on microscopy and molecular detection methods. *Tropical Animal Health Production*, v. 45, p. 469-472, 2012.

AYDIN, F. E.; ULGER, M.; EMEKDAŞ, G.; ASLAN, G.; GÜNAL, S. Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria in raw milk samples in Mersin province. *Mikrobiyoloji Bülteni*, v. 46, n. 2, p. 283-289,

2012.

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

BARLETTA, R. G.; STEFFEN, D. J. Mycobacterium. In: __. *Veterinary microbiology*. 3. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. 648 p.

BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, v. 349, p. 1149-1156, 2003.

BEAM, E.; VASOO, S.; SIMNER, P. J.; RIZZO, M.; MASON, E. L.; WALKER, R. C.; DEML, S. M.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE JR., R. J.; WENGENACK, N. L.; SIA, I. G. Mycobacterium arupense flexor tenosynovitis: case report and review of antimicrobial susceptibility profiles for 40 clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 7, p. 2706-2708, 2014.

BEN KAHLA, I.; BOSCHIROLI, M. L.; SOUSSI, F.; CHERIF, N.; BENZARTI, M.; BOUKADIDA, J.; HAMMAMI, S. Isolation and molecular characterization of Mycobacterium bovis from raw milk in Tunisia. *African Health Sciences*, v. 11, p. 1-5, 2011.

BHATTACHARYA, B.; KARAK, K.; GHOSAL, A. G.; ROY, A.; DAS, S.; DANDAPAT, R.; KHETAWAT, D.; MONDAL, D. K.; BHATTACHARYA, S.; and CHAKRABARTI, S. Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Tropical Medicine and International Health*, v. 8 n. 2, p. 150-157, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose*: manual técnico. Brasília, DF, 2006. 184 p.

BRASIL. Portal da Saúde. Ministério da Saúde. *Tuberculose*. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: 20 jul. 2016.

CADMUS, S. I. B.; YAKUBU, M. K.; MAGAJI, A. A.; JENKINS, A. O.; VAN SOOLINGEN, D. *Mycobacterium bovis*, but also *M. africanum* present in raw milk of pastoral cattle in north-central Nigeria. *Tropical Animal Health and Production*, v. 42, p. 1047-1048, 2010.

CEDEÑO, D. A.; VARGAS, B. Optimización de políticas de descarte en ganado bovino lechero de Costa Rica. *Archivos de Zootecnia*, v. 53, p. 249-260, 2004.

CHANG, C.; WANG, L.-Y.; LIAO, C.-Y.; HUANG, S. P. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 6, p. 3159–3161, 2002.

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

CORNER, L. A.; TRAJSTMAN, A. C.; LUND, K. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 43, n. 4, p. 129–133, 1995.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 1992.

DAILLOUX, M.; LAURAIN, C.; WEBER, M.; HARTEMANN, P. H. Water and nontuberculous mycobacteria. *Water Research Journal*, v. 33, n. 10, p. 2219-2228, 1999.

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, n. 2, p. 77–109, 2006.

DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A. T.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; CHRISTIANSEN, K. H.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, v. 81, p. 190–210, 2006.

DEMELASH, B.; INANGOLET, F.; OLOYA, J.; ASSEGED, B.; BADASO, M.;

YILKAL, A.; SKJERVE, E. Prevalence of bovine tuberculosis in Ethiopian slaughter cattle based on post-mortem examination. *Tropical Animal Health Production*, v. 41, p. 755–765, 2009.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, v. 26, n. 3, p. 297-302, 1945.

DIPPENAAR, A.; PARSONS, S. D. C.; SAMPSON, S. L.; VAN DER MERWE, R. G.; DREWE, J. A.; ABDALLAH, A. M.; SIAME, K. K.; VAN PITTIUS, N. C. G.; VAN HELDEN, P.D.; PAIN, A.; WARREN, R.M. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. *Tuberculosis*, v. 95, p. 682-688, 2015.

ESCOBAR-ESCAMILLA, N.; RAMÍREZ-GONZÁLEZ, J. E.; GONZÁLEZ-VILLA, M.; TORRES-MAZADIEGO, P.; MANDUJANO-MARTÍNEZ, A.; BARRÓN-RIVERA, C.; BÄCKER, C. E.; FRAGOSO-FONSECA, D. E.; OLIVERA-DÍAZ, H.; ALCÁNTARA-PÉREZ, P.; HERNÁNDEZ-SOLÍS, A.; CÍCERO-SABIDO, R.; CORTÉS-ORTÍZ, I. A. *Hsp65* phylogenetic assay for molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria isolated in Mexico. *Archives of Medical Research*, v. 45, n. 1, p. 90-97, 2014.

FRANCO, M. M. J. *Ocorrência de micobactérias em amostras de leite bovino provenientes de tanques de expansão individuais e coletivos de propriedades rurais e do comércio informal na região sudeste do estado de São Paulo*. 2012. 83f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FRANCO, M. M. J.; PAES, A. C.; RIBEIRO, M. G.; PANTOJA, J. C. F.; SANTOS, A. C. B.; MIYATA, M.; LEITE, C. Q. F.; MOTTA, R. G.; LISTONI, F. J. P. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*, v. 9, p. 85-93, 2013.

FUJISAWA, K.; WATANABE, H.; YAMAMOTO, K.; NASU, T.; KITAHARA, Y.; e NAKANO, M. Primary atypical mycobacteriosis of the intestine: a report of three cases. *gut*, v. 30, n. 541-545, 1989

GENTRY, C. A. Atypical Mycobacteria. In: SCHUMOCKV, G. T.; BRUNDAGE, D.; CHESSMAN, K.; DUNSWORTH, T.; FAGAN, S.; KELLY, W.; RATHBURN, R.; RICHIE, D.; SEMLA, T.; VASQUEZ, E.; ZAROWITZ, B. *Pharmacotherapy Self-Assessment Program – Infectious Diseases II*. 5. ed. Kansas City: American College of Clinical Pharmacy, 1996. p. 231-243.

GOODCHILD, A. V.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinburgh)*, v. 81, n. 1-2, p. 23–41, 2001.

HALSTROM, S.; PRICE, P.; THOMSON, R. Review: environmental ycobacteria as a cause of human infection. *International Journal of Mycobacteriology*, v. 4, n. 2, p. 81-91, 2015.

HADDAD, N.; MASSELOT, M.; DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Research in Veterinary Science*, v. 76, n. 1, p. 1–18, 2004.

HOLLOWAY, K. L.; HENNEBERG, R. J.; BARROS LOPES, M.; HENNEBERG, A. M. Evolution of human tuberculosis: A systematic review and meta-analysis of paleopathological evidence. *Journal of Comparative Human Biology*, v. 62, p. 402–458, 2011.

HUNTER, R. L.; OLSEN, M. R.; JAGANNATH, CH.; ACTOR, J. K. Review: multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v. 36, n.4, p. 371-386, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção da pecuária municipal*. Rio de Janeiro, 2014. v. 42, 39 p.

IKUTA, C. Y. *Estudo de micobactérias em animais silvestres mantidos em cativeiro*. 2015. 76 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update in bovine tuberculosis programmes in Latin America and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology*, v. 112, p.111-118. 2006.

KAZDA, J.; STACKEBRANDT, I. E.; SMIDA, J. D.; MINNIKIN, E.; DAFPE, M.; PARLETT, J. H.; PITULLE, C. *Mycobacterium cookii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 40, n. 3, p. 217-223, 1990.

KAZWALA, R. R.; DABORN, C. J.; KUSILUKA, L. J.; JIWA, S. F.; SHARP, J. M.; KAMBARAGE, D. M. Isolation of mycobacterium species from raw milk of pastoral cattle of the Southern Highlands of Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, v. 30, p. 233–239, 1998.

KONUK, M.; KORCAN, E.; DÜLGERBAKİ, S.; ALTINDIŞ, M. Isolation and identification of Mycobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, v. 115, n. 3, p. 343–347, 2007.

LARA, G. H.; RIBEIRO, M. G.; LEITE, C. Q.; PAES, A. C.; GUAZZELLI, A.; DA SILVA, A. V.; SANTOS, A. C.; LISTONI, F. J. Occurrence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). *Research in Veterinary Science*, v. 90, n. 2, p. 185-188, 2011.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A.; THOEN, C. O. Tuberculosis in humans and animals: an overview. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 14, n. 9, p. 1075-1078, 2010.

LOPEZ, F. K.; MILEY, M.; TAIWO, B. *Mycobacterium arupense* as an emerging cause of tenosynovitis. *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n. 3, p. 559-561, 2016.

MACKAY, I.K. Real-time PCR in microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, p. 190-212, 2003.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MGUIRE, D. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2. ed. Philadelphia: Elsevier, Mosby, 2013. 915 p.

MCNABB, A.; EISLER, D.; ADIE, K.; AMOS, M.; STEPHENS, G.; BLACK, W. A.; RODRIGUES, M.; ISAAC-RENTON, J. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 7, p. 3000-3011, 2004.

MEDIEL, M. J.; RODRIGUES, V.; CODINA, G.; MARTIN-CASABONA, N. Isolation of mycobacteria from frozen fish destined for human consumption. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 8, p. 3637-3638, 2000.

MOHAMED, A. S.; MOHAMED, Kh. F.; AGGOUR, M.G.; AHMED, H. A.; SELIM, S.A. Detection and Differentiation between Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis in Cattle Milk and Lymph Nodes Using Multiplex Real-Time PCR. *Global Veterinaria*. v. 13, n. 5, p. 794-800, 2014.

MOTTA, R. G.; SILVA, A. V.; GIUFFRIDA, R.; SIQUEIRA, A. K.; PAES, A. C.; MOTTA, I. G.; LISTONI, F. J. P.; RIBEIRO, M. G. Indicadores de qualidade e composição de leite informal comercializado na região Sudeste do Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 5, p. 417-424, 2015.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of Mycobacterium bovis infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p. 41-52, 1994.

NEONAKIS, I. K.; GITTI, Z.; KRAMBOVITIS, E.; SPANDIDOS, E.A. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of microbiology methods*, v. 75, p. 1-11, 2008.

NEONAKIS, I. K.; SPANDIDOS, D. A.; GITTI, Z. *Mycobacterium heraklionense* sp. nov.: a case series. *Experimental Therapeutic and Medicine*, v. 10, n. 4, p. 1401-1403, 2015.

NGEOW, Y. F.; WONG, Y. L.; TAN, J. L.; HONG, K.; NG, H. F.; ONG, B. L.; CHAN, K. G. Identification of new genomospecies in the *Mycobacterium terrae* complex. *PLoS One*, v. 10, n. 4, p. 1-16, 2015.

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

PAES, A. C. Tuberculose bovina. In: PIRES, A. V. *Bovinocultura de corte*. Piracicaba: FEALQ, 2010. v. 2, p. 993-1015.

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

PANDEY, G. S.; HANG'OMBRE, B. M.; MASHABATI, F.; KATABA, A. Prevalence of tuberculosis among southern Zambian cattle and isolation of *Mycobacterium bovis* in raw milk obtained from tuberculin positive cows. *Veterinary World*, v. 6, p. 986-991, 2013.

PARANÁ. Resolução SEAB nº 2, de 30 de janeiro de 2014. Dispõe sobre a indenização de proprietários de animais sacrificados em atendimento ao Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. *Diário Oficial do Estado*, 31 jan. 2014.

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*, v. 38, n.6, p.284-287, 2001.

PARASHAR, D.; CHAUHAN, D.S.; SHARMA, V. D.; and KATOCH, V.M. Applications of Real-time technology to mycobacterial research. *Indian Journal of Medical Research*, v. 124, p. 385-398, 2006.

PEREZ, A. M.; WARD, M. P.; CHARMANDARIÁN, A.; RITACCO, V. Simulation model of within-herd transmission of bovine tuberculosis in Argentine dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 54, n. 4, p. 361–372, 2002.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. *Vencendo a luta contra a mastite*. Illinois: Westfalia, Surge, Inc., 2002.

PIATEK, A. S.; TELENTI, A.; MURRAY, M.R.; EL-HAJJ, H.; JACOBS, Jr. W.; KRAMER, F.R.; ALLAND, D. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis*

in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrobial Agents Chemother*, v. 44, p. 103–110, 2000.

PINSKY, B.A.; BANAEI, N. Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 7, p. 2241-2246, 2006.

PLIKAYTIS, B. B.; PLIKAYTIS, B. D.; YAKRUS, A.; BUTLER, W. R.; WOODLEY, C. L.; SILCOX, V. A.; SHINNICK, T. M. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 1815-1822, 1992.

POROCA, D. DA R.; LIMA, A. S.; LIMA, J. F. DE A.; DA CRUZ, H. L. A.; MONTENEGRO, R, DE A.; DE MELO, F. L.; SCHINDLER, H. C.; MONTENEGRO, L. M. L. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.42, n. 6, p. 716-722, 2009.

PORTAELS, F. Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clinics in Dermatology*, v. 13, n. 3, p. 207–222, 1995.

POURAHMAD, F.; THOMPSON, K. D.; ADAMS, A.; RICHARDS, R. H. Comparative evaluation of Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis (PRA) and sequencing of heat shock protein 65 (hsp65) gene for identification of aquatic mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 76, n. 2, p.128-135, 2009.

PRASITE. Disponível em: <<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

QAMAR, M. F.; AZHAR, T. Detection of mycobacterium from bovine milk in lahore, pakistan. (Research Report). *Science International*, v. 25, n. 2, p. 353–357, 2013.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2. ed. UK: Wiley-Blackwell, 2011. p. 323-340.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. 2156 p.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique et Technique*, v. 20, n. 1, p. 21–54, 2001.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; PANTOJA, J. C. F. Mastite em animais domésticos. In: _____. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

RICHARDSON, E. T.; SAMSON, D.; and BANAEI, N. Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 5, p. 1997-1502. 2009

RINGUET, H.; AKOUA-KOFFI, C.; HONORE, S.; VARNEROT, A.; VINCENT, V.; BERCHE, P.; GAILLARD, J. L.; PIERRE-AUDIGIER, C. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 852-857, 1999.

ROCHA, C. F. R.; FIGUEIREDO, S. C.; ROSALER, C. A. R.; GRISI FILHO, J. H. H.; KEID, L. B.; SOARES, R. M.; FERREIRA NETO, J. S. Molecular discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, v. 13, n. 1, p. 17-21, 2013.

ROCHA, V. C. M. *Discriminação de isolados de Mycobacterium bovis pelas técnicas de Spoligotyping, MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas*. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ROMERO, B.; ARANAZ, A.; JUAN, L.; ÁLVAREZ, J.; BEZOS, J.; MATEOS, A.; GÓMEZ MAMPASO, E.; DOMÍNGUEZ, L. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 9, p. 3405-3408, 2006.

RUNYON, E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *The Medical*

Clinics of North America, v. 43, n. 1, p. 273–290, 1959.

SABEDOT, M. A.; BOETHCHER, A. V.; POZZA, M. S. S.; BUSANELLO, M.; MANGONI, J. Ocorrência de Tuberculose e de Brucelose em rebanho da região do sudoeste do Paraná. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 12, p. 1-9, 2009.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAWAI, T.; INOUE Y.; DOI, S.; IZUMIKAWA, K.; YANAGIHARA, K.; HIGASHIYAMA, Y.; MIYAZAKI, Y.; OHNO, H.; HIRAKATA, Y.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. A case of *Mycobacterium nonchromogenicum* pulmonary infection showing multiple nodular shadows in an immunocompetent patient. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 54, p. 311–314, 2006.

SCHILLER, I.; RAYWATERS, W.; VORDERMEIER, H. M.; JEMMI, T.; WELSH, M.; KECK, N.; WHELAN, A.; GORMLEY, E.; BOSCHIROLI, M. L.; MOYEN, J. L.; VELA, C.; CAGIOLA, M.; BUDDLE, B. M.; PALMER, M.; THACKER, T.; OESCH, B. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. *Veterinary Microbiology*, n. 151, p. 153-159, 2011.

SGARIONI, S. A.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; LEITE, C. Q. F.; PRINCE, K. A.; LEITE, S. R. A.; FILHO, D. V.; SIQUEIRA, V. L. D.; CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; CARDOSO, R. F. Occurrence of *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 707-711, 2014.

SHA, D. H.; VERMA, R.; BAKSHI, C.S.; SINGH, R.K. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology Letters*, v. 214, p. 39-43,, 2002.

SHRESTHA, N. K.; TUOHY, M. J.; HALL, G. S.; REISCHL, U.; GORDON, S. M.; e PROCOP, G. W. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and

nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 5121–5126, 2003.

SINHA, R. N. *The significance of pathogenic microorganisms in raw milk*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 1994. p. 117-167.

SILVA, M. C. P. *Epidemiologia e fatores de risco de tuberculose bovina no Estado do Paraná*. 2012. 86 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

SMITH, D. S.; LINDHOLM-LEVY, P.; HUITT, G. A.; HEIFETS, L. B.; COOK, J. L. *Mycobacterium terrae*: case reports, literature review and in vitro antibiotic susceptibility testing. *Clinical Infectious Diseases*, v. 30, p. 444-453, 2000.

SOINI, H.; MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry*, v. 47, n. 5, p. 809-814, 2001.

SPRINGER, B.; BOTTGER, E. C.; KIRSCHNER, P.; WALLACE JUNIOR, R. J. Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45, p. 262-267, 1995.

SONGER, J. G.; POST, K. W. *Veterinary mycrobiology: bacterial and fungal agents of animal disease*. Philadelphia: Saunders, 2005. 697 p.

STANFORD, J.; STANFORD, C. Mycobacteria and their world. *International Journal of Mycobacteriology*, v. 1, n. 1, p. 3–12, 2012.

SUPPLY, P.; MAGDALENA, J.; HIMPENS, S.; LOCHT, C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-components system operon. *Molecular Microbiology*, v. 26, p. 991-1003, 1997.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LESJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 762-771, 2000.

SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RÜSCHGERDES, S.; WILLERY, E.; SAVINE, E.; HAAS, P.; VAN DEUTEKOM, H.; RÖRING, S.; BIFANI, P.; KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B.; SOLA, C.;

RASTOJI, N.; VATIN, V.; GUTIERREZ, M.C.; FAUVILLE, M.; NIEMANN, S.; SKUCE, R.; KREMER, K.; LOCHT, C.; VAN SOOLINGEN, D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit– variable-number tandem repeat typing of *mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4498-4510, 2006.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, n. 10, p. 512-526, 1993.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTRGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 175-178, 1993.

THIERRY, D.; BRISSON-NOEL, A.; VINCENT-LEVY-FREBAULT, V.; NGUYEN, S.; GUESDON, J. L.; GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 2668–2673, 1990.

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 3. ed. Oxford: Blackwell, 2007. 626 p.

TORTOLI, E.; GITTI, Z.; KLENK, H. P.; LAURIA, S.; MANNINO, R.; MANTEGANI, P.; MARIOTTINI, A.; NEONAKIS, I. Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium terrae* complex and description of *Mycobacterium engbaekii* sp. nov., *Mycobacterium heraklionense* sp. nov. and *Mycobacterium longobardum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 401-411, 2013

TSAI, T. F.; LAI, C.-C.; TSAI, I. C.; CHANG, C. H.; HSIAO, C. H.; HSUEH, P. H. Tenosynovitis caused by mycobacterium arupense in a patient with Diabetes Mellitus. *Clinical and Infectious Diseases*, v. 47, n. 6, p. 861-863, 2008.

VAN INGEN J, RAHIM Z, MULDER A, BOEREE MJ, SIMEONE R, BROSCHE R, VAN SOOLINGEN D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, m. 4,

p. 653-655, 2012.

VASIREDDY, R.; VASIREDDY, S.; BROWN-ELLIOT, B. A.; WENGANACK, N. L.; EKE, U. A.; BENWILL, J. L.; TURENNE, C.; WALLACE Jr, R. J. *Mycobacterium arupense*, *Mycobacterium heraklionense*, and a Newly Proposed Species, “*Mycobacterium virginiense*” sp. nov., but Not *Mycobacterium nonchromogenicum*, as Species of the *Mycobacterium terrae* Complex Causing Tenosynovitis and Osteomyelitis. *Journal of clinical microbiology*, v. 54, n. 5, p. 1340- 1351, 2016.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; BÜRGER, K. P.; GONÇALVES, A. C. S.; GRISÓLIO, A. P. R.; AGUILAR, C. E. G.; ROSSI, G. A. M. Avaliação do consumo de leite e produtos lácteos informais e do conhecimento da população sobre os seu agravos à saúde pública, em um município do estado de São Paulo, Brasil. *Boletim de Indústria Animal*, v. 70, n. 3, p. 221-227, 2013.

WAGNER, D.; YOUNG, L. S. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection*, v. 32, n. 5, p. 257–270, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO Global tuberculosis report 2015*. Geneva, 2015. 752 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Consolidated guidelines on HIV prevention, diagnosis, treatment and care for key populaions*. Geneva, 2016. 180 p.

WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods and Applications*, v. 1, n. 4, p. 269-273, 1992.