



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**DETECÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium bovis* EM SANGUE,
LEITE E QUEIJO COALHO PELA qPCR E ANÁLISE DOS
FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO EM REBANHOS
BOVINOS DA MICRORREGIÃO GARANHUNS, ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

RENATA DUARTE DA SILVA CEZAR

RECIFE, 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**DETECÇÃO DE DNA DE *Mycobacterium bovis* EM SANGUE,
LEITE E QUEIJO COALHO PELA qPCR E ANÁLISE DOS
FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO EM REBANHOS
BOVINOS DA MICRORREGIÃO GARANHUNS, ESTADO DE
PERNAMBUCO BRASIL**

RENATA DUARTE DA SILVA CEZAR

“Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Co-orientadora: Dra. Vania Lucia de Assis Santana”

RECIFE, 2016

BANCA EXAMINADORA

“Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central dessa universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.”

Renata Duarte S. Cezar

Renata Duarte da Silva Cezar

APROVADO EM *09/08/2016*

AVALIADORES

José Wilton Pinheiro Junior

Presidente: José Wilton Pinheiro Junior, Professor Doutor – UFRPE

Daniel Friguglietti Brandespm

1º Examinador: Daniel Friguglietti Brandespm, Professor Doutor – UFRPE

Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti

2º Examinador: Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti,
Professora Doutora, UFRPE

Frederico Celso Lyra Maia

3º Examinador: Frederico Celso Lyra Maia, Professor Doutor – UFRPE

Jean Carlos Ramos da Silva

4º Examinador: Jean Carlos Ramos da Silva, Professor Doutor – UFRPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por todas as bênçãos recebidas ao longo desta jornada, pela sua misericórdia em nunca ter me deixado só e por, sempre ter me enviado ajuda quando precisei. Aos amigos espirituais que me acompanham e que me auxiliam emanando fluidos tão importantes para o meu prosseguir.

À minha família, pilar da minha vida, motivo para eu sempre dar o melhor de mim em tudo o que faço. Amo vocês. Em especial ao meu esposo, Kleber Cezar, por todo seu amor, carinho, dedicação e paciência. Por sempre acreditar em mim até mais do que eu mesma. Por se orgulhar e festejar comigo nas metas alcançadas e por me apoiar nos momentos difíceis. Por me ajudar, principalmente, nos momentos em que não pude estar tão presente e sempre cuidar de mim e dos nossos filhos. Ao meu filho lindo e maravilhoso Luiz Grissom, por todo amor incondicional que ele demonstra todos os dias, mesmo naqueles em que ficou triste porque mamãe tinha que sair para trabalhar. Ao meu segundo filhote, Eric, que chegou para alegrar minha vida e enchê-la de mais amor. À minha sogra-mãe, Vera Lúcia, por todo amor e carinho, bem como pelos cuidados diários com Grissom e Eric.

Sou muito grata ao meu excelente orientador, Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior, pela oportunidade de poder desenvolver o projeto. Por todo o conhecimento passado e por todo o apoio durante o desenvolvimento desta tese, dando suporte bem mais além da função de um orientador. Sem a ativa participação dele, com toda seriedade, dedicação e responsabilidade para com os seus orientados, não seria possível a plena realização deste trabalho.

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Vania Lucia de Assis Santana, não apenas pela orientação durante o desenvolvimento do projeto como também pelo suporte laboratorial durante a etapa de experimentação. Meus agradecimentos, também, a toda a equipe do Lanagro/MAPA – Recife que me acolheu tão bem e sempre me ajudou em relação ao que precisei.

Aos colegas do laboratório de doenças infecciosas da Unidade Acadêmica de Garanhuns–UAG-UFRPE, que trabalharam ativamente comigo na fase de coleta e em parte do processamento das amostras. Sem eles, não teria sido possível realizar as coletas em todos os municípios da região. Meus eternos agradecimentos a Fernando Barbosa, Jonas Borges,

Júnior Mário, Paulo Feitosa, Luan Brito, Leonardo Magno, Marlos Rego e ao professor Daniel Brandespim. Agradeço, também, às alunas Pollyanne Fernandes, Bruna Soares, Érica Chaves, Roberta Arruda e Anne Caroline que me ajudaram em parte do processamento das amostras.

Agradeço com muito carinho à Dra. Norma Lucena (Laboratório de Imunogenética – LIG do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fiocruz – Recife), por não só ter me disponibilizado seu laboratório para parte da minha experimentação como também por ter me acolhido em sua equipe, me confiando seu espaço de trabalho. Obrigada por cada momento em que a senhora parou para me orientar e por cada esquema desenhado no papel que guardo carinhosamente.

Cada dia no LIG foi sempre regado de muito trabalho e conhecimento. Lá eu fiz amigos que vou levar para o resto da vida, foram bons momentos de aprendizado e de muita descontração. Obrigada à minha flor mais cheirosa, Maíra Lima, pelo apoio e ajuda durante o período em que estive no LIG. Pelas vezes em que foi minha amiga e me ajudou com sua calma e carinho quando eu estava ansiosa e preocupada com as coisas que não davam certo. Obrigada a Renan Garcia, sempre paciente e disposto a ajudar e a ensinar algo quando precisei. Às flores Laís Baracho e Renata Almeida pela ajuda e carinho dedicados a mim nessa jornada. Aos alunos Jair Figueiredo, Ana Cláudia e Rafaela Mikaella, pela ajuda que me dispensaram. Aos demais colegas do Aggeu, pela amizade que criamos ao longo do meu doutorado, Rossana Santos, Sávio Vieira, Lígia Figueiredo, Fernanda Medeiros, André, Veruska Alexandrino e Alessandra Ramos.

Ao Professor Rinaldo Mota do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, pelo apoio quando precisei no meu trabalho, como também aos meus colegas Pedro Paulo, André Santos, Pomy Kim, Renata Pimentel, Grasiene Menezes e toda equipe do laboratório.

Agradeço às professoras Márcia Moraes e Socorro Cavalcanti do laboratório de biologia molecular de vírus da Universidade de Pernambuco, pela disponibilização da estrutura do laboratório onde processei parte das minhas amostras. Meus agradecimentos e carinho às amigas Carla Mola e Taciana Mendonça, pelo apoio dispensado nessa etapa, bem como sou grata à Andreia Soares e Fernanda Medeiros pelo auxílio que recebi durante a pesquisa.

FONTE FINANCIADORA

Este projeto foi contemplado com bolsa de pesquisa pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE sob o número IBPG04425.05/12.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1 Agente etiológico.....	14
1.2.Epidemiologia.....	16
1.3 Diagnóstico	19
1.4 Saúde pública.....	24
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 ARTIGOS PUBLICADOS	30
3.1 ARTIGO 1	31
3.2 ARTIGO 2	38
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE	53
QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO	54
ANEXO	56
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFRPE.....	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema representando as deleções que ocorreram a partir do *M. tuberculosis* até o *M. bovis*. p. 15
- Figura 2 – Mapa da distribuição da tuberculose bovina no mundo no período de janeiro a julho de 2015. p. 17

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Pesquisa de *M. bovis* em leite e derivados a utilização da PCR em diferentes regiões do mundo. p.24
- Tabela 2 – Results of qPCR of milk and blood samples collected from cattle of the micro region of Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil, 2014. p.34
- Tabela 3 – Analysis of risk factors associated with prevalence of *M. bovis* in cattle herds of the micro region of Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil, 2014. p.35
- Tabela 4 – Results of Quantitative Polymerase Chain Reaction of Cheese Samples Collected from Cattle of the Microregion of Garanhuns, State of Pernambuco, Brazil, 2014. p.41

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

CMT – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – ensaio de imunoenzimático

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IFN – γ – Interferon gama

IS – Sequência de inserção

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PNCETB - Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal

PPD – Proteína purificada derivada

PRA PCR – PCR com análise de restrição enzimática

qPCR – PCR real time – PCR em tempo real

RD4 – Região de diferença 4

RNA – ácido ribonucleico

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

TC – Teste cutâneo

UFC – Unidade formadora de colônia

RESUMO

Objetivou-se com esta tese detectar a ocorrência do DNA de *Mycobacterium bovis* em bovinos e em queijo tipo coalho utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para identificar possíveis focos do agente e seu potencial risco para saúde pública. Foram analisadas amostras de leite e sangue de 401 animais, sem histórico de tuberculose bovina, procedentes de 20 propriedades dos 19 municípios que compõem a microrregião Garanhuns, bacia leiteira do Estado de Pernambuco, Brasil. As 107 amostras de queijo tipo coalho foram procedentes de feiras livres, padarias e mercados dos municípios localizados na microrregião Garanhuns. A qPCR foi realizada usando como alvo a região de diferença 4 (RD4) de *M. bovis*. Em relação às amostras biológicas analisadas dos bovinos, nove (2,2%) foram positivas e confirmadas por sequenciamento genético. Em relação às nove amostras positivas, uma (11,1%) foi de leite e oito (88,9%) de sangue. Foram identificados animais positivos em seis (30%) propriedades. Não foi identificado nenhum fator de risco associado à infecção por *M. bovis*. A respeito das 107 amostras de queijo analisadas, três (2,8%) foram positivas para pesquisa de DNA de *M. bovis* e confirmadas por sequenciamento. A identificação do DNA de *M. bovis* em amostras biológicas de rebanhos provenientes da microrregião Garanhuns, bem como em queijo tipo coalho comercializados nessa região denotam a importância da implantação de medidas de controle para a tuberculose bovina para assegurar não só a sanidade dos animais como também minimizar os riscos para a saúde pública.

Palavras-chaves: Biologia Molecular, Leite, Tuberculose, Vacas.

ABSTRACT

The aim of this study was to detect the occurrence of *Mycobacterium bovis* in cattle and artisanal cheese through real time Polymerase Chain Reaction (qPCR) to identify possible agent's outbreaks and its potential risk to public health. Samples of 401 animals were analyzed, with no history of bovine tuberculosis, from 20 properties of the 19 municipalities that forms the microregion Garanhuns, dairy region of Pernambuco, Brazil. The 107 samples of cheese were coming from open-air markets, bakeries and neighborhood grocery stores of the municipalities located in the Garanhuns. The qPCR was used to identify a fragment corresponding to the difference in region 4 (RD4) of *M. bovis*. Of all analyzed samples, nine (2.2%) were positive and the presence of *M. bovis* DNA was confirmed by sequencing. Of the nine positive samples, one (11.1%) was a milk sample and eight (88.9%) were blood. Positive animals were identified in six (30%) properties. None of the risk factors evaluated were statistically associated with bovine tuberculose. Of the 107 samples analyzed cheese, three (2.8%) were positive for DNA detection of *M. bovis* and confirmed by sequencing. The identification of the DNA of *M. bovis* in biological samples of cattle from Garanhuns as well as artisanal cheese marketed in this region show the importance of the implementation of control measures for bovine tuberculosis to ensure not only the health of animals as well minimize risks to public health.

Keywords: Cows, Milk, Molecular Biology, Tuberculosis.

INTRODUÇÃO

Na última década, a produção leiteira no Estado de Pernambuco cresceu 173%, ficando atrás, apenas, da Bahia, na Região Nordeste (SEBRAE, 2010). Em 2013 o estado ocupou o 11º lugar no *ranking* de produção de leite totalizando 561.829 litros (MEZZADRI, 2014). Em 2008 a microrregião Garanhuns, Estado de Pernambuco, ocupou o 3º lugar em produção com 104 milhões de litros produzidos. Dentre os derivados de leite, o queijo de coalho destaca-se na região nordeste e em Pernambuco, sendo considerado um alimento identitário (MENEZES, 2011), com receita aproximada de R\$ 25 milhões mensalmente com o produto, colocando a população do Estado como a maior consumidora de queijo do Nordeste (SEBRAE, 2010).

Dentre as enfermidades de importância para a saúde dos rebanhos bovinos, destaca-se a tuberculose bovina, enfermidade infectocontagiosa de grande impacto para a saúde animal e pública, ocasionando perdas não só na produtividade do plantel como na economia da atividade (MENDES et al., 2011).

A doença tem caráter crônico e apresenta-se como lesões granulomatosas afetando, principalmente, linfonodos e tecidos pulmonares dos bovinos. É causada pelo *Mycobacterium bovis* que junto com o *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias formam o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (BRASIL, 2006).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que no ano de 2014, 9,6 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose e seis milhões de novos casos foram notificados (WHO, 2015). No Brasil, anualmente são notificados aproximadamente 70 mil casos novos, ocorrendo 4,6 mil mortes em decorrência da doença. O país ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (BRASIL, 2016). Estudos no Brasil sobre a tuberculose humana por *M. bovis* ainda são escassos.

A tuberculose em humanos causada por *M. bovis* é, clinicamente indistinguível daquela causada pelo *M. tuberculosis*. Cerca de 7,2% dos casos da doença em países industrializados é ocasionada pelo *M. bovis* (COSTA, 2009).

O monitoramento da doença em bovinos é feito pelo teste tuberculínico e o diagnóstico definitivo é realizado mediante isolamento e identificação do agente etiológico

com base em amostras biológicas. Contudo, essas técnicas são demoradas e podem ocorrer problemas de contaminação (JORDÃO-JÚNIOR et al., 2005; COSTA, 2009).

Técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) oferecem alta sensibilidade e especificidade e vêm sendo utilizadas em estudos para diagnóstico de tuberculose bovina em várias amostras clínicas como sangue, leite e exsudato nasal. Nesse contexto, a PCR, em tempo real, permite análise mais rápida e sensível contribuindo para melhor conhecimento da epidemiologia da doença (FIGUEIREDO et al., 2008).

Em Pernambuco os estudos publicados com tuberculose bovina foram realizados com o uso da tuberculinização (IZAEL, 2009; MENDES et al., 2011), não havendo dados com PCR em amostras de leite, sangue e queijo.

Em virtude do impacto econômico que a tuberculose bovina pode ocasionar para a bovinocultura e o risco da transmissão do *M. bovis* para humanos pelo consumo do leite e do queijo coalho contaminados, objetivou-se com este estudo pesquisar a ocorrência do *Mycobacterium bovis* em rebanhos bovinos da microrregião Garanhuns – PE, assim como em queijos tipo coalho comercializados na região.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Agente etiológico

A tuberculose bovina é causada pelo *Mycobacterium bovis*, pertencente à família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. Essa bactéria possui forma de bastonete curto, é aeróbico, imóvel, não capsulado, não flagelado, apresentando aspecto granular, medindo de 0,5 a 10,0 µm de comprimento por 0,2 a 0,6µm de largura, apresentando coloração vermelho intensa na coloração de Ziehl-Neelsen devido à resistência na descoloração ao álcool-ácido, sendo denominada como bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (PANDOLFI et al., 2007; THOEN et al., 2009; WILDNER et al., 2011).

O isolamento é feito em meios diferenciados que levam em sua composição ovo e amido, enriquecido de asparagina e com adição de verde malaquita. Para *M. bovis* é usado o piruvato de sódio em substituição do glicerol que é tóxico para este (KUBICA et al., 2006). A temperatura ótima de crescimento varia entre os 30°C e 45°C (THOEN et al., 2009). A característica do gênero consiste na complexidade da sua parede celular, constituída por uma elevada percentagem de lipídeos, que incluem ácidos micólicos de 60 a 90 carbonos (COSTA, 2009). Essas micobactérias caracterizam-se, também, por ter crescimento lento (> 7 dias) (RIBÓN, 2012).

As colônias em meio Lowenstein-Jensen apresentam crescimento de tamanho pequeno, arredondadas, de coloração amarelo-pálida, com borda irregular e superfície granular. É negativo para a acumulação de niacina e redução de nitrato e é susceptível ao ácido hidrazida tiofeno-2-carboxílico (TCH) (KUBICA et al., 2006; THOEN et al., 2009).

Os membros do complexo apresentam o fator corda tendo a capacidade de formar cordões de agregado de BAARs devido a uma molécula do ácido micólico, trealose 6,6-dimicolato. A presença do fator na coloração de Ziehl-Neelsen é indicativa para os membros do complexo em comparação com as micobactérias não tuberculosas que se distribuem uniformemente (THOEN et al., 2009; RIBÓN, 2012).

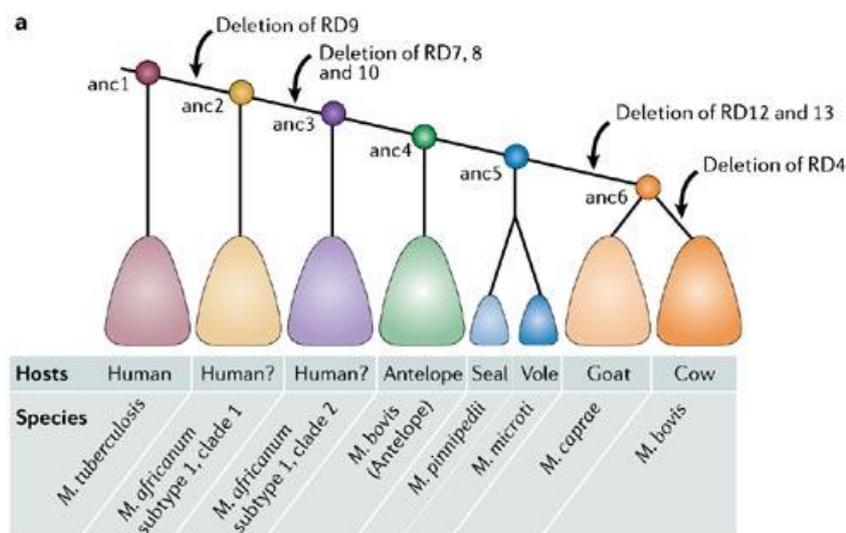
M. bovis faz parte do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) que compreende, também, o *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* (MOSTOWY et al., 2002), *M. caneti*, *M. pinipedii*, *M. caprae* (REDDINGTON et al., 2011). O genoma dos membros do CMT

possui 4,4 milhões de pares de bases. Apesar do elevado grau de conservação dos seus genomas, as espécies do CMT demonstram importantes diferenças fenotípicas, diferentes adaptações e virulências nos hospedeiros (COSMA, SHERMAN; RAMAKRISHNA, 2003; KUBICA et al., 2006; PANDOLFI et al., 2007; ROEW; DONAGHY, 2008; COSTA, 2009; JORGE, 2010).

O genoma do *M. bovis* possui 4.345.492 pares de bases com 4.003 genes que codificam 3.952 proteínas e 50 RNAs estruturais, possui um profago e 42 sequências de inserção (IS -*Insertions sequences*) (GARNIER et al., 2003; ACOSTA-SALINASA; ESTRADA-CHÁVEZB; MILIÁN-SUAZOC, 2009). O DNA apresenta 65,63% de conteúdo guanina-citosina (GC) (GARNIER et al., 2003) e suas proteínas são na maioria enzimas necessárias para o metabolismo lipídico constitutivo da parede celular como o ácido micólico (ACOSTA-SALINASA; ESTRADA-CHÁVEZB; MILIÁN-SUAZOC, 2009).

Geneticamente, *M. bovis* tem 99,9% de identidade com o *M. tuberculosis* (GARNIER et al., 2003; TAYLOR et al., 2007; GUTA et al., 2014), mas o genoma do *M. bovis* é reduzido devido a deleções variando de 1 a 12.7kp de tamanho (GARNIER et al., 2003; COUSINS, 2004) (Figura 1).

Figura 1 – Esquema representando as deleções que ocorreram a partir do *M. tuberculosis* até o *M. bovis* (SMITH et al., 2006).



Estudos direcionados para essa pequena porcentagem diferente no genoma (0,01%) são fundamentais para entender os diferentes mecanismos existentes entre os dois bacilos

(TIBATÁ; GONZALEZ, 2004). Foram identificados 2.437 SNPs (*Single nucleotide polymorphism*) entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* que conferem características próprias ao bacilo bovino como, por exemplo, a resistência à droga antituberculose pirazinamida para humanos (GARNIER et al., 2003).

Recombinações genéticas são raras em micobactérias e não há evidências de translocações, duplicações e inversões devido ao seu crescimento lento. Essa similaridade deve-se, também, à ausência de mecanismos de troca genética como conjugação e transformação (MOSTOWY et al., 2002; GARNIER et al., 2003; ACOSTA-SALINASA, ESTRADA-CHÁVEZB; MILIÁN-SUAZOC, 2009).

A maioria das trocas genéticas entre as micobactérias ocorrem por elementos móveis como as ISs, conferindo polimorfismos entre as cepas (ACOSTA-SALINASA; ESTRADA-CHÁVEZB; MILIÁN-SUAZOC, 2009). Em *M. bovis*, esses polimorfismos ocorrem em deleções dessas ISs que se encontram em cópias únicas. Dentre as sequências repetidas, cinco estão associadas com a diversidade genética entre as cepas do CMT, entre elas as sequências em *tandem* ricas em GC (PGRS) e as sequências repetidas em número variável (VNTR) (ACOSTA-SALINASA; ESTRADA-CHÁVEZB; MILIÁN-SUAZOC, 2009; RAMOS et al., 2014).

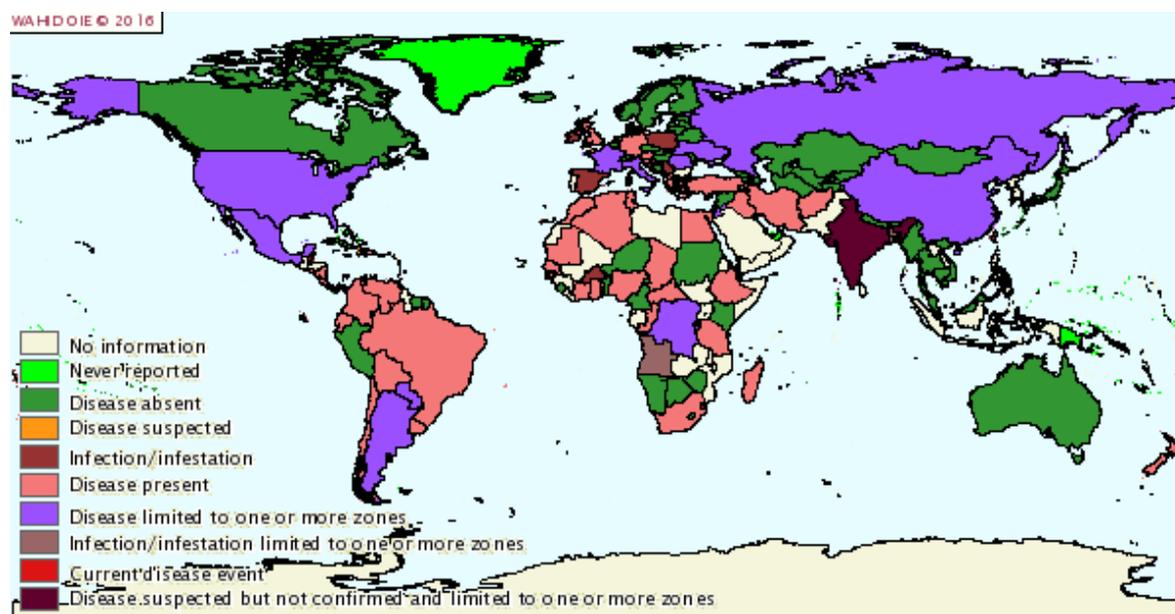
1.2. Epidemiologia

No relatório da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), 109 países reportaram a infecção pelo *M. bovis* em rebanhos bovinos entre 2005-2010 (RAMOS et al., 2014); na Figura 2 encontra-se o mapa da OIE (2016¹) de distribuição da doença no mundo no primeiro semestre de 2015. De acordo com o mapa, no Brasil a doença ocorre em bovinos, assim como alguns países da América Latina. Na Argentina e Paraguai a doença está limitada a uma ou mais áreas. Embora a doença tenha distribuição mundial, programas de controle têm eliminado ou ajudado a controlar a doença em animais domésticos em vários países (CFSPH,

¹ OIE :
http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=32&species_t=0&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2015&selected_report_period=1&selected_start_month=12&date_submit=OK

2009; MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010; SKUCE; ALEEN; MCDOWELL, 2012; RAMOS et al., 2014). Austrália, Dinamarca, Suécia, Canadá, entre outros, são considerados livres de tuberculose (CFSPH, 2009; GUTA et al., 2014). Alguns países da Europa, Estados Unidos e México apresentam programas de controle em andamento (CFSPH, 2009).

Figura 2: Mapa da distribuição da tuberculose bovina no mundo no período de janeiro a julho de 2015.



Fonte: OIE.

A prevalência da tuberculose bovina na Coreia entre 1961-2010 foi de 1,4 para cada 1000 animais (LEE; LEE, 2013). Na Palestina um estudo avaliou amostras de tecidos e de leite cru de vacas por PCR e identificou prevalência de 3,2% (EREQAT et al., 2013). Na Espanha estudo indicou prevalência de 1,3% entre 2006-2011, com 50% dos casos positivos sendo representados por casos novos (GUTA et al., 2014).

Na África, a prevalência da tuberculose bovina é alta (até 50%) e foi relatada em diversas regiões da Zâmbia onde bovinos e antílopes (*Kafue lechwe*) compartilham água e pastagem, bem como em áreas onde ocorre a movimentação dos bovinos de várzeas para pastagens durante a estação seca (MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010).

No Brasil, entre dezembro de 2014 a dezembro de 2015, foram registrados 53 novos focos de tuberculose bovina (OIE, 2016²). O Estado de Pernambuco registrou dois focos

²

OIE: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail

nesse período. Os Estados do Rio Grande do Sul e Paraná foram os que mais registram focos nesse período. Ceará, Goiás, Minas Gerais e Paraíba tiveram o menor número de focos em comparação com os demais (OIE, 2016).

Os bovinos são os hospedeiros primários para *M. bovis* (MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010) e outros animais domésticos e mamíferos selvagens também podem se infectar (MALAMA et al., 2013). Animais selvagens exercem o papel de reservatório em diversas partes do mundo e são responsáveis por novos casos de BTB onde a doença já foi erradicada. Na Nova Zelândia, os gambás rabo-de-escova (*Trichosurus vulpecula*) atuam como reservatório. No Reino Unido e Irlanda são relatados como reservatórios os texugos (*Taxidea taxus*), Alces (*Alces alces*) no Canadá, cudu (*Tragelaphus strepsiceros*) e búfalos (*Syncerus caffer*) na África e veados de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) nos Estados Unidos da América (CFSPH, 2009; OIE, 2009; THOEN et al., 2009).

Além dos exemplos citados acima, espécies como ovelhas, cabras, cavalos, suínos, cães, gatos, furões, camelos, lhamas, muitas espécies de ruminantes selvagens, elefantes, rinocerontes, raposas, coiotes, primatas, lontras, focas, leões-marinhos, lebres, guaxinins, ursos, javalis, grandes felinos e várias espécies de roedores foram relatadas como reservatórios para o bacilo (COUSINS, 2004; THOEN et al., 2009).

A transmissão de *M. bovis* ocorre por contato direto entre animais ou indiretamente por meio de produtos contaminados. A eliminação de *M. bovis* pelos animais infectados ocorre, principalmente, por secreções respiratórias e fezes, além do leite, urina, descargas vaginais e uterinas e materiais dos abscessos ou de lesões abertas de linfonodos periféricos (NEILL; SKUCE; POLLOCK, 2005; SKUCE, ALEEN; MCDOWELL, 2012). Os animais silvestres atuam como reservatórios, eliminando o agente sem apresentar sinais clínicos (RAPOSO, 2011; SOUZA et al., 2011; TAMIRU; HAILEMARIAM; TERFA, 2013).

A principal via de transmissão de *M. bovis* em bovinos é por aerossóis (MURAKAMI et al., 2009; RAPOSO, 2011; SOUZA et al., 2011). A via transplacentária é rara e a infecção pela via sexual é menos comum (CFSPH, 2009; DOMINGOS; VIDAL; MARCO, 2014). Pode ocorrer transmissão para o bezerro alimentado com leite proveniente de vacas com mastite tuberculosa (DOMINGOS; VIDAL; MARCO, 2014), como também em animais que ingerem água ou forragens contaminadas (NEILL; SKUCE; POLLOCK, 2005; MURAKAMI et al., 2009; SKUCE, ALEEN, MCDOWELL, 2012).

A infecção humana com *M. bovis* deve-se, principalmente, à ingestão de leite não pasteurizado ou por inalação de aerossóis (MURAKAMI et al., 2009; ROCHA et al., 2011).

O bovino e bubalino infectados constituem a principal fonte de infecção para os rebanhos (RODRIGUES et al., 2008). A aquisição de animal infectado é um dos principais fatores de risco para rebanhos livres. O homem com tuberculose causada por *M. bovis* pode ser fonte de infecção para os rebanhos bovinos (HUMBLET et al., 2009).

No Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, a identificação de caprinos reativos ao teste tuberculínico e com confirmação molecular para o agente levanta questionamentos sobre a importância de pequenos ruminantes na epidemiologia da tuberculose bovina (MELO et al., 2012).

Alguns fatores podem facilitar a disseminação do agente como a aglomeração dos animais que pode propiciar o contato entre os animais e facilitando a infecção (HUMBLET et al., 2009). Outros fatores como idade, comportamento e nutrição animal, tipo de produção, prática de manejo (MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010) e tamanho do rebanho já foram identificados como fatores de risco (HUMBLET et al., 2009; VELOSO et al., 2015).

Alguns fatores diretos como aquisição de animais, ocorrência de BTB em propriedades vizinhas, a movimentação e comércio de animais já foram associados com a infecção (GUTA et al., 2014; MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010). Esses fatores podem variar de acordo com a região, o rebanho, a estrutura da propriedade e a presença de animais selvagens (MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010) Fatores como a exposição a fezes e urina contaminadas, rotação de pastagem podem atuar, indiretamente, na epidemiologia da doença facilitando a transmissão do agente etiológico (GUTA et al., 2014).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser realizado por várias técnicas, muitas vezes em conjunto (STRAIN; MACNAIR; MCDOWELL, 2011). Pode ser realizado, diretamente, pela identificação do agente em amostras clínicas ou indiretamente por meio da resposta imune do animal frente ao agente (STRAIN; MACNAIR; MCDOWELL, 2011).

O diagnóstico *in vivo* realizado no bovino é feito pelo exame clínico (KICH; KRELING; POZZOBON, 2012) o que, geralmente, não tem grande valor, uma vez que a maioria dos animais só apresenta sinais clínicos em estágios avançados da enfermidade (RUGGIERO, 2007; COSTA et al., 2014) e os sinais não são patognomônicos para a doença (STRAIN; MACNAIR; MCDOWELL, 2011).

A detecção direta pode ser feita pelo isolamento microbiológico ou por técnicas moleculares para detecção do DNA do bacilo (STRAIN; MACNAIR; MCDOWELL, 2011). Indiretamente o diagnóstico é feito pelo teste tuberculínico (KICH; KRELING; POZZOBON 2012), baseado na resposta celular contra o bacilo e pelo ensaio de interferon gama (IFN- γ), bem como o teste de ELISA de forma complementar (COSTA et al., 2014; RUGGIERO, 2007).

O diagnóstico *post-mortem* é realizado mediante exames histológicos, bacteriológicos ou moleculares a partir de tecidos (ROXO, 1996; FUVERKI, 2008; OIE, 2009 FURLANETTO et al., 2012). Apesar dos testes histológicos serem rápidos e simples, exigem uma grande quantidade de bactéria no tecido (10^4 bacilos/mL) e outras micobactérias podem causar lesões similares às de *M. bovis* (RUGGIERO, 2007).

M. bovis pode ser visto microscopicamente em esfregaços diretos de amostras clínicas utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen (COSTA et al., 2014). Esse diagnóstico pode ser realizado se o tecido possuir lesões histológicas características (necrose caseosa, mineralização, células epiteliais, células gigantes multinucleadas e macrófagos) (OIE, 2009). Apesar de ser um teste rápido, apresenta a desvantagem de perda de especificidade (COSTA et al., 2014) e não tem a capacidade de distinguir os diferentes membros da família *Mycobacteriaceae* (PROANO-PÉREZ et al., 2011; ALWATHNANI; ASHGAN; IHAB, 2012), além de funcionar com tecidos com quantidades superior a 10.000 bactérias/mL (FUVERKI, 2008).

O teste tuberculínico ou teste cutâneo (TC) consiste na prova cutânea, simples e com boa sensibilidade (RUGGIERO, 2007) e tem papel fundamental em programas de erradicação da doença (MURAKAMI, 2009). É o método estabelecido como padrão da OIE para a identificação de animais infectados (FIGUEIREDO et al., 2008; OIE, 2009). No Brasil a tuberculinização é utilizada como prova no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), de forma periódica e os animais positivos são abatidos, uma vez que não há tratamento preconizado por lei no país (BRASIL, 2006; IZABEL, 2009).

O teste do interferon gama (IFN- γ) avalia a reatividade celular mediante dosagem da citocina em amostras de sangue de animais infectados após estimulação anterior dos linfócitos com o PPD (proteína purificada derivada) aviário e bovino (RUGGIERO, 2007; STRAIN; MACNAIR; MCDOWELL, 2011; COSTA et al., 2014). O teste é um procedimento não invasivo, que ao contrário do TC pode ser realizado várias vezes e sem intervalo de tempo, além do animal só precisar ser contido uma vez. Porém a técnica tem elevado custo e a necessidade de rápida execução no laboratório uma vez que as amostras de sangue devem ser processadas em até 8 horas após a coleta. Também pode apresentar resultados falso-positivos em decorrência de reações cruzadas com outras micobactérias (RUGGIERO, 2007).

O teste de ELISA pode ser usado de forma complementar e é útil na detecção de infecção em animais anérgicos. Porém não apresenta boa sensibilidade e especificidade, sendo usado em alguns países em conjunto com o TC (RUGGIERO, 2007; THOEN, et al., 2009).

O diagnóstico confirmatório é realizado com isolamento e identificação do agente por cultura bacteriana que é trabalhoso e demorado (COSTA et al., 2014; FIQUEIREDO et al., 2008). A identificação definitiva da espécie cultivada só é possível com a realização de provas bioquímicas e de sensibilidade a drogas (FUVERKI, 2008). Vários testes clássicos baseados em crescimentos, propriedades fenotípicas e bioquímicas são usados para diferenciar as espécies, mas são testes lentos, laboriosos e imprecisos, além de não poderem ser realizados em qualquer laboratório (MURAKAMI et al., 2009).

Para o isolamento, na necropsia podem-se coletar amostras de nódulos linfáticos de órgãos como pulmão, fígado e intestino e enviadas para laboratório onde serão processadas, descontaminadas e inoculadas em meios específicos (CFSPH, 2009). O cultivo é realizado após uma descontaminação do material pelo método Petrof e a semeadura feita em meios à base de ovo como Stonebrink e Lowenstein-Jensen com piruvato de sódio por 10 a 12 semanas (ROXO, 1996; FENTAHUN; LUKE, 2012; COSTA et al., 2014). Bioquimicamente são utilizadas provas como niacina, catalase, redução de nitrato e urease para diferenciar as espécies (ALWATHNANI; ASHGAN; IHAB, 2012).

Apesar de o bacilo poder ser isolado de amostras de animais negativos ou não reagentes no TC, o procedimento é demorado e leva semanas para dar um bom resultado (ALWATHNANI; ASHGAN; IHAB, 2012). Os métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos para identificar as espécies em um tempo menor e com a vantagem de poder detectar uma quantidade muito pequena de DNA na amostra com alta sensibilidade e

especificidade (ALWATHNANI; ASHGAN; IHAB, 2012; COSTA et al., 2014). O uso de técnicas moleculares no diagnóstico da doença pode melhorar o conhecimento da epidemiologia da mesma, fornecendo dados que aumentem a eficiência dos programas de controles (RAMOS et al., 2014).

Os primeiros trabalhos com o uso de PCR para detecção e identificação de membros do CMT na medicina veterinária foram publicados logo após a introdução da técnica nos anos 80 e a PCR em tempo real foi introduzida na década seguinte permitindo quantificar o DNA presente na amostra (COSTA et al., 2014).

Vários trabalhos com diferentes abordagens moleculares na detecção do DNA do bacilo tanto em animais vivos, como *post-mortem* já foram descritos, inclusive, com melhor sensibilidade e especificidade que os métodos oficiais preconizados (FIGUEIREDO et al., 2008), com a possibilidade de uso de amostras clínicas e ambientais (STRAIN; MACNAIR; MCDOWELL, 2011). A ferramenta vem sendo aplicada no diagnóstico da tuberculose com redução no tempo da obtenção do resultado, alta especificidade e sensibilidade e pode detectar pequenas quantidades de bacilos vivos ou mortos na amostra (KICH; KRELING; POZZOBON, 2012; SWIFT; REES, 2013).

Detecção baseada na PCR já foi padronizada utilizando diferentes genes como a região IS1081 (TAYLOR et al., 2007), *hsp65* (FRANCO et al., 2013), IS6110 (LEITE et al., 2003), região de diferença RD4 (TAYLOR et al., 2007; SALES, et al., 2014a e b).

A técnica de *Spoligotyping* é um método por PCR que se baseia em polimorfismos em regiões de repetição dentro do cromossomo e que vem sendo usada na identificação de fontes de infecção, no estudo da transmissão entre espécies, e na estabilidade de estirpes por longos períodos de tempo em populações fechadas (RAMOS et al., 2014). Outra técnica descrita é a PRA PCR (*restriction-enzyme analysis*) que foi desenvolvida por Telenti em 1993, já foi usada em diversos estudos para identificação de espécies de micobactérias em amostras bovinas (FIGUEIREDO et al., 2008; FRANCO et al., 2013).

Estudo publicado por Araújo et al. (2014) detectou membros do CMT com 100% de especificidade, diretamente de amostras de animais negativos no TC pela técnica de *nested* PCR, revelando que essa ferramenta molecular pode ser útil na investigação epidemiológica da doença em rebanhos que não reagem ao TC.

Diferentes amostras clínicas já foram utilizadas para a detecção direta de *M. bovis* na PCR como sangue, leite, exsudato nasal, urina (JIA et al., 2012; CARVALHO et al., 2014). Um estudo feito por Romero et al. (1999) demonstrou que houve detecção maior do DNA do bacilo em amostra de muco nasal (59%), seguido por sangue (29%) e leite (14%). Já outra pesquisa feita por Senthil, Ranjani e Vasumathi (2014) não demonstrou diferença significativa na detecção com base em amostras de leite e muco nasal na PCR.

Considerando-se que aproximadamente 30% das vacas em lactação que são positivas para o TC eliminam o bacilo no leite e, apenas em 4% dos casos a bactéria é eliminada em quantidade suficiente para ser detectada em cultura (FIQUEIREDO et al., 2008), é importante o desenvolvimento de testes rápidos, sensíveis, específicos e seguros para identificar o *M. bovis* no leite bovino (JIA et al., 2012).

Jordão-Junior et al. (2005) padronizaram uma PCR para detectar *M. bovis* diretamente do leite bovino e para o experimento, o leite foi, artificialmente contaminado e a PCR foi realizada com os *primers* JB21 e 22. A reação foi capaz de detectar 80 UFC/ mL de leite com boa sensibilidade e especificidade. Um estudo feito por Senthil; Ranjani e Vasumathi (2014) indicou uma maior sensibilidade da PCR em relação ao teste de coloração por BAAR, em que 2,2% do muco nasal e 2,4% de leite foram positivos, enquanto na PCR esse percentual aumentou para 9,8 e 12,2%, respectivamente.

Sales et al. (2014a) testaram *primers* para a região de diferença RD4 com 100% de eficiência em que todas as 30 amostras testadas de *M. bovis* foram positivas, indicando que a região é um alvo específico para o bacilo bovino com 100% de sensibilidade e especificidade. Outro estudo publicado por Sales et al. (2014b) usou o *primer* Mbo.88, também, para a região RD4, para validar a reação de PCR em tempo real com resultados de 100% de sensibilidade e especificidade em diferentes equipamentos de qPCR e com diferentes protocolos de reação.

Apesar da prova padrão ouro para a OIE ser o teste tuberculínico (OIE, 2009), a PCR é indicada como diagnóstico complementar (BRASIL, 2006) e seu uso vem sendo cada vez mais difundido em diferentes partes do mundo principalmente para detectar o bacilo em amostras de leite e derivados (Tabela 1), o que tem relevante papel na saúde pública uma vez que esses produtos contaminados podem causar infecção na população humana (JIA et al., 2012).

Tabela 1 - Pesquisa de *Mycobacterium bovis* em leite bovino e derivados em diferentes regiões do mundo

Autor	Ano	Local	Amostra	Alvo PCR	Amostras positivas	n/N
Leite et al.	2003	Brasil	Leite cru	IS6110	18,0%	23/128
Mishra et al.	2005	Índia	Leite cru	<i>HupB</i>	41%	19/48
Mumtaz et al.	2008	Paquistão	Leite cru	Rv2031c	29,0%	9/31
Jia et al.	2012	China	Leite cru	MTP 40 <i>pncA</i>	7,1%	24/336
Zumárraga et al	2012	Argentina	Leite cru	IS6110	40,0%	103/257
Silva et al.	2013a	Brasil	Queijo fresco	RD4	10,0%	3/30
Franco et al.	2013	Brasil	Leite cru	<i>Hsp65</i>	1,0%	1/100
Zarden et al.	2013	Brasil	Leite cru	IS6110 RvD1Rv2031c	50,0%	23/46
Carvalho et al.	2014	Brasil	Leite cru	IS6110	50,0%	75/150
Mohamed et al.	2014	Egito	Leite cru	IS1081	96,4%	27/28
Melo et al.	2014	Brasil	Queijo fresco	RD4	17,5%	26/ 147
Pereira-Suárez et al.	2014	México	Queijo fresco	rmpb70	3,15%	3/95
Bezerra et al.	2015	Brasil	Leite cru	BoF	1,8%	9/502
Bhanurekha et al.	2015	Índia	Leite cru	IS6110 Rv1506c	2,2%	4/181

Convenções: n – amostras positivas; N – total de amostras analisadas.

1.4 Saúde pública

M. bovis pode causar tuberculose em humanos, conhecida como tuberculose zoonótica (VELAYAT et al., 2007; MURAKAMI et al., 2009; INGRAM et al., 2010) considerada pela OMS como doença negligenciada (INGRAM et al., 2010). Cerca de 90% das pessoas infectadas com TB carregam o bacilo durante toda a vida ou permanecem ignorando o fato de que estão infectados (JABBAR et al., 2015).

O elo epidemiológico entre a tuberculose bovina e humana, principalmente em crianças, tem sido reconhecido mesmo antes da identificação do bacilo tuberculoso em 1882

por Robert Koch (MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010), quando em 1865 o médico Francês Jean Antoine Villemin publicou um estudo provando a transmissão do agente de humanos para animais e vice-versa (DANIEL, 2006).

Estima-se que a taxa de casos de tuberculose zoonótica no mundo seja de 2% e em alguns países a incidência é alta (18-30%) como ocorre na Tanzânia, por exemplo (GONZALO-ASENSIO et al., 2014). Jabbar et al. (2015) analisaram 100 amostras de sangue e escarro de pacientes com tuberculose e identificaram *M. bovis* em 2% dos casos no Paquistão. Já na China, de acordo com Jiang et al. (2015), não existem dados no serviço de vigilância de infecção humana pelo bacilo bovino, sugerindo que a incidência de tuberculose bovina é baixa e não existe identificação laboratorial do agente.

Existem diferenças nas prevalências nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (INGRAM et al., 2010). No Reino Unido, onde as medidas de controle foram implementadas com diagnóstico de rebanhos em 1930, os casos humanos pelo bacilo bovino representam menos de 1% dos casos de tuberculose, sendo estes relacionados com fazendeiros, veterinários e funcionários de abatedouros pelo contato próximo com os animais (TAYLOR et al., 2007) ou relacionados a casos de reativação de tuberculose latente (MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010).

Na Nova Zelândia e Estados Unidos, a proporção fica em torno de 2,7% e 1,4%, respectivamente. Já países em desenvolvimento como México, Uganda e Nigéria as taxas representam 13,8%, 6,9% e 5%, respectivamente (INGRAM et al., 2010). Nos países em desenvolvimento, o maior risco da população está associado com a pobreza, HIV e redução dos cuidados com saúde. Na América Latina, especula-se que mais de 7.000 novos casos de tuberculose podem ocorrer a cada ano (MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010).

No Brasil, existem evidências do envolvimento de *M. bovis* na tuberculose humana, embora seja pouco identificado por limitações nas técnicas de diagnóstico, como por exemplo, o não crescimento do bacilo bovino em meio com glicerol, utilizado no meio para isolar o bacilo humano (SILVA et al., 2013b). Kantor et al. (2008) verificaram dados de diagnóstico tuberculose humana de laboratórios oficiais e encontraram apenas 3 casos confirmados por *M. bovis*. No estudo realizado no Brasil por Silva et al. (2013) encontrou-se uma prevalência de 1,6% para o casos de tuberculose zoonótica, sugerindo que a metodologia dos serviços de saúde locais provavelmente subestimam a frequência real dos casos pelo *M. bovis* e que este merece mais atenção dos funcionários de saúde pública. Apesar da

prevalência da tuberculose zoonótica ser maior em locais onde a infecção em bovinos é alta (MURAKAMI et al., 2009; VINNERÅS et al., 2011), há relatos de infecção humana por contato com outros animais infectados como alces, mamíferos marinhos e rinocerontes (MURAKAMI et al., 2009).

O homem pode se infectar pela inalação de aerossóis ou pelo consumo de leite cru (GRANGE, 2001; BILAL et al., 2010; EL-GEDAWY; AHMED; AWADALLAH, 2014; SANOU et al., 2014), ou ainda por mucosa e pele lesada (BILAL et al., 2010; SANOU et al., 2014), Alimentos e água podem ser contaminados por urina, material fecal ou exsudato e funcionarem como vias de transmissão para humanos (SAIDU et al., 2015). A infecção pessoa-pessoa pelo bacilo bovino é considerada rara (GALLIVAN; NEHA; FLOOD, 2015).

O maior risco de infecção pelo bacilo bovino é para crianças, idosos e pessoas com deficiência imunológica (MURAKAMI et al., 2009; MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010). Fatores como etnia, práticas culturais e religiosas, como fatores socioeconômicos podem contribuir para aumentar a infecção por *M. bovis* em humanos (MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010).

Trabalhadores de abatedouros que manipulam carne e carcaça, assim como fazendeiros e veterinários que possuem contato próximo com os animais apresentam risco maior de se infectarem por inalação (BILAL et al., 2010). Boukary et al. (2012), também destacaram fatores que expõem os seres humanos a infecção por *M. bovis*, como hábitos alimentares, práticas de criação e falta de higiene.

Clinicamente, a tuberculose causada pelo *M. tuberculosis* é igual à causada pelo *M. bovis* e com radiografia e patologia indistinguíveis (ALLIX-BÉGUEC et al., 2010; BILAL et al., 2010; MICHEL; MULLER; HELDEN, 2010; NAWAZ et al., 2011; GALLIVAN; NEHA; FLOOD, 2015). A apresentação da TB humana vai depender da via de infecção. O consumo de leite contaminado ocasiona uma tuberculose extrapulmonar (BOUKARY et al., 2012), com doença primária no estômago e intestino (TAYLOR et al., 2007) com nódulos cervicais e mesentéricos (BILAL et al., 2010), mas pode, também, causar a forma respiratória (TAYLOR et al., 2007). A infecção por via respiratória determina a TB pulmonar (BILAL et al., 2010).

O bacilo bovino é o principal causador de tuberculose gastrointestinal em humanos (NAWAZ et al., 2011). Um estudo realizado no México verificou que 83,3% dos pacientes com TB abdominal foram associados com o bacilo bovino. *M. bovis* tem sido encontrado em

rebanhos no México, bem como em produtos lácteos nos EUA de origem mexicana. Em Nova Iorque, casos humanos de tuberculose gastrointestinal foram relacionados com consumo de queijo mexicano contaminado (PARK et al., 2010).

Kahla et al. (2011) verificaram que casos de linfadenopatia cervical estavam relacionados com o consumo de leite cru (60%). Essa infecção por produtos lácteos provavelmente é a mais frequente, pois a doença em crianças menores de um ano de idade é rara e existe uma alta frequência de doença extrapulmonar (GALLIVAN; NEHA; FLOOD, 2015).

Um estudo feito na Califórnia, Estados Unidos, verificou que 24.424 casos de TB foram reportados entre 2003-2011. Desses casos, 25% das culturas positivas foram de *M. bovis* em crianças. As mortes desses pacientes foram maiores naqueles infectados com *M. bovis* do que aqueles com *M. tuberculosis* (GALLIVAN; NEHA; FLOOD, 2015). Outro estudo também indica que a tuberculose causada pelo bacilo bovino é mais severa, em que pessoas que se infectaram com o bacilo apresentaram 2,55 mais chances de morrer do que pelo bacilo humano (BILAL et al., 2010). Dados publicados por Park et al. (2010) indicaram que a mortalidade dos pacientes com *M. bovis* foi de 10% em comparação com o *M. tuberculosis* que foi 3,6%.

El-Gedawy, Ahmed, Awadallah (2014) isolaram *M. bovis* em 1% das amostras de leite cru analisadas, com resultados similares no Brasil publicados por Franco et al. (2013). Outro trabalho realizado no Brasil identificou três (10%) amostras de queijo coalho contaminadas com *M. bovis* mostrando a importância desse alimento para a saúde pública, principalmente porque a produção de queijo com base em leite cru no país chega a 40% (SILVA et al., 2013b).

A diferenciação dos casos humanos causados por *M. bovis* é de grande importância para o acompanhamento do paciente, uma vez que o bacilo bovino é intrinsecamente resistente à pirazinamida (ALLIX-BÉGUEC et al., 2010). Casos de tuberculose zoonótica quando não tratada pode ser fatal (CFSPH, 2009). Um caso relatado por Allix-Béguec et al. (2010) mostrou o histórico de uma paciente com TB reativa e sem sucesso no tratamento. Foi identificado que o bacilo bovino era o agente da TB e que, posteriormente, foi detectado um surto de BTB em vacas de sua fazenda.

Atenção à saúde pública com programas de erradicação da doença em vacas e pasteurização do leite representam a principal forma de prevenção de transmissão do agente para humanos (SAIDU et al., 2015). Isso pode ser notado com a baixa proporção de casos humanos pelo bacilo bovino (0,2 a 7,2%) em países desenvolvidos, mas, ainda, é uma importante causa de TB em países em desenvolvimento (STONE; BROWN; DROBNIEWSKI, 2012), onde 85% das vacas e 82% da população humana vivem em áreas onde a doença é prevalente (SHAR et al., 2006).

De acordo com Silva et al. (2013b), no Brasil se faz necessária uma pesquisa nacional baseada na tuberculose humana por *M. bovis*, podendo ser feita em conjunto com a pesquisa nacional de tuberculose multirresistente. Os autores ressaltam ainda que os riscos potenciais à saúde pelo consumo de leite não pasteurizado devem ser enfatizados para as regiões em que a tuberculose bovina ainda é prevalente.

A meta do governo brasileiro, conforme proposta da OMS é de detectar 70% dos casos estimados de tuberculose. Para tal, o Ministério da Saúde criou o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) que recomenda a implantação da Estratégia do Tratamento Diretamente Observado para o controle da Tuberculose no Brasil. O objetivo principal do programa é reduzir a morbidade, mortalidade e transmissão da doença (BRASIL, 2016b). De acordo com o manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil do Ministério da Saúde, o diagnóstico é baseado em provas que detectem apenas o *M. tuberculosis* (BRASIL, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

– Pesquisar a ocorrência do DNA de *Mycobacterium bovis* mediante método molecular em rebanhos bovinos da microrregião Garanhuns – PE e queijos tipo coalho comercializados nesta região.

2.2 Objetivos específicos

– Analisar amostras de sangue e de leite de rebanhos bovinos usando a técnica de PCR em tempo real para pesquisa do DNA do *M. bovis*.

– Identificar os possíveis fatores de risco associados à infecção pelo *M. bovis* em rebanhos bovinos.

– Analisar amostras de queijo tipo coalho comercializados na microrregião Garanhuns, usando a qPCR para pesquisa de DNA do *M. bovis*.

3 ARTIGOS PUBLICADOS

3.1 ARTIGO 1

TÍTULO: Molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle herds of the state of Pernambuco, Brazil.

REVISTA: BMC Veterinary Research

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle herds of the state of Pernambuco, Brazil



Renata Duarte da Silva Cezar¹, Norma Lucena-Silva², Antônio Fernando Barbosa Batista Filho³, Jonas de Melo Borges³, Pollyane Raysa Fernandes de Oliveira¹, Érica Chaves Lúcio³, Máira Arruda-Lima², Vania Lucia de Assis Santana⁴ and José Wilton Pinheiro Junior^{1*}

Abstract

Background: The present study aimed to directly detect *Mycobacterium bovis* in milk ($n = 401$) and blood ($n = 401$) samples collected from 401 dairy cows of 20 properties located in the state of Pernambuco, Brazil, by real-time quantitative PCR (qPCR) targeting the region of difference 4 (RD4). Risk factors possibly associated with bovine tuberculosis (BTB) were also evaluated.

Results: Of the 802 samples analyzed, one milk (0.25 %) and eight blood (2 %) samples were positive for *M. bovis* in the qPCR and their identities were confirmed by sequencing. Animals positive for *M. bovis* were found in six (30 %) of the 20 properties visited. None of the risk factors evaluated were statistically associated with BTB.

Conclusions: *M. bovis* DNA was detected in one milk sample what may pose a risk to public health because raw milk is commonly consumed in Brazil.

Keywords: Tuberculosis, Cows, PCR, Milk

Background

Bovine tuberculosis (BTB) is caused by *Mycobacterium bovis*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex that affects mammals, including humans [1].

M. bovis has been isolated from milk and colostrum samples what can be important to perpetuate BTB infection in a herd through the digestive route [2]. Raw milk is commonly consumed in Brazil [3] and clandestine milk is an important public health issue in the country [4, 5].

Despite the fact that Brazil has a National Program for Control and Eradication of Tuberculosis and Brucellosis (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e da Brucelose - PNCETB) supervised by a public agency, its implementation is not mandatory [6]. The tuberculin skin test is the diagnostic method recommended by the PNCETB and it must be followed by

bacterial isolation for result confirmation [7]. Efforts to reduce the risk of *M. bovis* infection must include sanitary measures to ensure a healthy cattle herd.

Molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR) have been used for BTB diagnosis in several clinical samples such as blood, milk and nasal exudates [2]. Standardization of direct methods for detection of *M. bovis* in clinical samples will enable a more accurate BTB diagnosis and facilitate epidemiological studies on *M. bovis* prevalence [1, 8].

In the present study, we used qPCR for direct detection of *Mycobacterium bovis* in milk and blood samples of cattle from the state of Pernambuco, Brazil.

Methods

Sampling

The sample size was calculated as recommended by Thrusfield [9] using the following parameters: bovine population of 336,221 animals in the micro region of Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil [10], 95 % confidence interval and 5 % sampling error margin using a

* Correspondence: wiltonjuniorufpe@gmail.com

¹Federal Rural University of Pernambuco (Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco CEP 52171-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 da Silva Cezar et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

prevalence of 50 %, since there is no official data on BTB prevalence in the studied region. According to the calculation, the minimum sample size should be 385 dairy cattle.

From January to February 2014, a total of 802 milk and blood samples were collected from 401 dairy cows of 20 properties distributed in the municipalities of Angelim, Bom Conselho, Brejão, Caetés, Calçado, Canhotinho, Correntes, Garanhuns, Iati, Jucati, Jupí, Jurema, Lagoa do Ouro, Lajedo, Palmeirina, Paratama, Salóá, São João and Terezinha, state of Pernambuco, Brazil.

Written informed consent was obtained from the farmers to take samples from the cattle. The blood samples ($n=401$) were collected by caudal venipuncture, stored in tubes containing citrate, properly identified and sent to the Garanhuns Laboratories Center (Central de Laboratórios de Garanhuns - CENLAG), located in the Garanhuns Academic Unit (Unidade Acadêmica de Garanhuns - UAG) of the Federal Rural University of Pernambuco (Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE), Brazil.

The milk samples ($n=401$), which consisted of 50 ml of a pool of milk from the four quarters of each cow, were collected during milking after the udder disinfection with 70 % alcohol and the first jets of milk were discarded. Then the samples were stored in sterile bottles, cooled and sent to the CENLAG (UAG - UFRPE).

An epidemiological questionnaire containing multiple-choice questions concerning animal production characteristics, hygiene and sanitary aspects of the herd, and reproductive management was applied in each property. The questionnaire comprised 11 possible risk factors for *M. bovis* infection, as follows: herd size (less than 50 animals, 51–100 animals, 101–200 animals, more than 201 animals), rearing system (intensive, extensive, semi-intensive), origin of replacement animals (farm's own herd, another farm, both), conducting quarantine after animal's purchase, performance of BTB diagnostic tests upon animals' acquisition, water source (stagnant or running), milking procedure (manual or mechanic), frequency of cleaning the farm facilities, udder disinfection, feeding colostrum to calves and history of BTB in the herd.

DNA Extraction

M. bovis DNA was extracted from milk samples using the Qamp* kit (Qiagen Inc.) following the manufacturer's instructions. Leukocyte DNA was isolated by a modified phenol-chloroform extraction method [11], 100 μ l of white blood cells were used, ammonium acetate and phenol-chloroform for DNA extraction from the blood samples.

Positive control

The *Mycobacterium bovis* ATCC 19274 strain was gently provided by the Oswaldo Cruz Foundation (Fundação

Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) and was used for construction of a plasmid harboring the target sequence, which was the positive control in the molecular assays. *M. bovis* genomic DNA was extracted and the fragment corresponding to the region of difference 4 (RD4) was amplified with the specific primers reported by Sales et al. [12]. The target fragment was cloned using *Escherichia coli* XL1 blue strain and TA cloning kit* (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The recombinant plasmid pRD4-TA was sequenced by the Sanger method using an ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Real-time PCR

The molecular detection of *M. bovis* DNA in the milk and blood samples was performed in the Laboratory of Immunogenetics (Laboratório de Imunogenética) of FIOCRUZ, state of Pernambuco, Brazil. Quantitative real time PCR (qPCR) was performed using the same primer set used for amplification of the RD4 fragment of the positive control and a fluorescent probe that discriminates *M. bovis* from other *M. tuberculosis* complex members since it hybridizes with both the 5' and 3' RD4 deletion flanking sequences, which only occur directly adjacent to each other in *M. bovis*. The probe was designed using the software Primer Express* Software and targeted a region in the amplicon in between the primer pair. The probe showed 100 % homology to *M. bovis* in BLAST/ncbi. Probe sequence: 5'- /56-FAM/AGCCG-TAGTCGTGCAGAAGCGCA/3BHQ_1/- 3'. The total reaction volume was 25 μ l comprising 2.0 μ l of DNA, 12.5 μ l of TaqMan*Universal PCR Master Mix, 1.0 μ l each primer (5 pmol), 0.5 μ l of probe (5 pmol) and water (8 μ l). The amplification conditions were 95 °C for 15 min (denaturation) followed by 40 cycles of 94 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. In all PCR runs, standard curves were obtained using the positive control, plasmid DNA encompassing the mycobacteria RD4 sequence, which was prepared in triplicate by serial dilution of 10x plasmid DNA from 200 ng (Quantification cycle - Cq = 11.8) to 0.0002 ng (Cq = 32.2). The qPCR was performed in an ABI 7500 Real-Time PCR system set for absolute quantification. The slope of the standard curve was -3.40 and R = 0.999, with 97 % efficiency.

Spiked samples were not used. The standard curve and the detection limit were determined using a serial 10X dilution from 100 to 10⁻¹⁰ ng/ μ l in triplicate and the positive control was detected in samples with up to 10⁻⁶ ng/ μ l. The reaction was repeated four times in different days and the same results were obtained in each day.

To verify the presence of inhibitors in the samples, a few blood samples of 1000 ng/ μ l DNA were randomly selected and diluted them to 800, 600, 400, 200 and

50 ng/ μ l of DNA. Then 20 ng were added of positive control to the diluted samples and performed a qPCR. All the dilutions had the same C_q in the qPCR; therefore, there were no inhibitors in the samples.

Sequencing

DNA sequencing was performed in the Center of Technological Platforms (Núcleo de Plataformas Tecnológicas - NPT), of the Research Center Aggeu Magalhães (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM), FIOCRUZ, state of Pernambuco, Brazil.

The commercial kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1 (Applied Biosystems*) was used for DNA sequencing following the manufacturer's recommendations. The RD4 fragments were sequenced by the Sanger method and the reaction products were analyzed in the ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

All the sequences obtained in the present study were compared with the RD4 fragment of the reference genome (88 bp) (GenBank Access number BX248339.1) using the software Blast-N (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and MEGA6 [13].

Ethical considerations

The Ethics Committee on Animal Use (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA) of UFRPE provided scientific and ethical clearance for the present study (reference number 23082.004671/2013, license number 028/2013).

Statistical analysis

The absolute and relative prevalence of *M. bovis* in the milk and blood samples were determined by descriptive analysis. Univariate analysis using chi-square test, Pearson's test or Fisher's exact test were used to evaluate the possible risk factors associated with BTB. All statistical analyzes were performed in the Epi Info 3.5.1 software.

Results

Of the 802 samples analyzed, one milk (0.25 %) and eight blood (2 %) samples were positive for *M. bovis* in the qPCR and their identities were confirmed by sequencing. All positive samples were from different animals (Table 1).

Six (30 %) of the 20 properties visited had animals positive for *M. bovis* (Table 1). None of the risk factors evaluated in the present study were statistically associated with BTB as shown in Table 2.

Discussion

This is the first report of direct detection of *M. bovis* DNA in milk and blood samples from cattle of the region of Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil.

Table 1 Results of qPCR of milk and blood samples collected from cattle of the micro region of Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil, 2014

Municipality ^a	Number of animals	Positive		Negative	
		Milk	Blood	Milk	Blood
Bom Conselho	25	-	01	25	24
Lagoa do Ouro	40	-	01	40	39
Paranatama	18	-	01	18	17
Iati ^b	13	-	01	13	12
Caetés	18	01	-	17	18
Palmeirina	10	-	04	10	06
Total ^b	401	01	08	400	398

^aMunicipalities which herds had only negative results in the qPCR are not shown

^bRefers to the total number of animals evaluated in the study; it is not a sum of each column

The prevalence of *M. bovis* DNA in milk samples ranges from 2 to 87 % according to different studies [14–20], which evaluated the mycobacteria presence by PCR. The different prevalence rates observed by them may be related to management characteristics [21], sampling methods [22] and disease-control measures adopted in each location [23].

The presence of *M. bovis* in milk may pose a risk to public health, because humans can become infected by *M. bovis* through exposure to infected animals, consumption of infected raw milk and dairy products [24, 25]. The presence of *M. bovis* in milk samples is a concern because it is estimated that 41 % of all milk consumed in Brazil is not pasteurized [12] being a source of infection of human TB. Since the clinical symptoms of human TB caused by *M. bovis* are indistinguishable from those caused by *M. tuberculosis* [23, 26], a detailed epidemiological investigation considering the patients eating habits and professional occupation must be performed by the health surveillance service to determine the TB causal agent. In Brazil, a study performed by Silva et al. [27] with 189 TB patients identified coinfection with *M. bovis* in three patients. In two of these patients, consumption of cheese made with raw milk was the probable cause of infection. The other patient used to work in a slaughterhouse, so the infection was related to labor risk. Other study conducted in Brazil also identified *M. bovis* in humans, although with lower prevalence. It is believed that *M. bovis* prevalence in Brazil is underestimated [28].

In the present study, the milk sample positive for *M. bovis* did not belong to any of the eight animals that had positive blood samples what can be explained by various reasons: collection of only one milk sample per dairy cow, interaction between the bacillus and the bovine immune system cells, which may have decreased the amount of bacillus in milk [2, 20, 29], and presence of

Table 2 Analysis of risk factors associated with prevalence of *M. bovis* in cattle herds of the micro region of Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil, 2014

Risk factors	n	Positive		Negative		OR (95 % CI)	p value
		AF	RF%	AF	RF%		
Herd size^a							
<50 animals	9	2	22.2	7	77.8	-	0.467
51–100 animals	6	3	50.0	3	50.0	3.50 (0.37–32.97)	
101–200 animals	2	1	50.0	1	50.0	1.00 (0.04–24.55)	
>200 animals	2	-	-	2	100	-	
Rearing system							
Intensive	3	1	33.3	2	66.7	-	0.788
Extensive	2	1	50.0	1	50.0	2.00 (0.05–78.25)	
Semi-Intensive	15	4	26.7	11	73.3	0.36 (0.02–7.30)	
Origin of replacement animals							
Farm's own herd	12	4	33.3	8	66.7	0.67 (0.09–4.92)	0.544
Other farms	8	2	25.0	6	75.0		
Quarantine							
Yes	4	1	25.0	3	75.0	1.36 (0.11–16.57)	0.657
No	16	5	31.3	11	68.8		
BTB diagnostic tests upon animals' acquisition^a							
Yes	10	3	30.0	7	70.0	1.16 (0.16–8.0)	0.630
No	9	3	33.3	6	66.7		
Water source^a							
Stagnant	14	4	28.6	10	71.4	1.66 (0.19–14.0)	0.520
Running	5	2	40.0	3	60.0		
Milking procedure							
Manual	12	4	33.3	8	66.7	0.66 (0.09–4.92)	0.544
Mechanic	8	2	25.0	6	75.0		
Frequency of cleaning the farm facilities^a							
Daily	12	3	25.0	9	75.0	-	0.360
Weekly	3	2	66.7	1	33.3	6.00 (0.39–92.28)	
Monthly	2	1	50.0	1	50.0	0.50 (0.01–19.56)	
Udder disinfection							
Yes	7	1	14.3	6	85.7	3.75 (0.34–41.0)	0.276
No	13	5	38.5	8	61.5		
Feeding colostrum to calves							
Yes	17	5	29.4	12	70.6	1.20 (0.08–16.44)	0.370
No	3	1	33.3	2	66.7		
History of bovine tuberculosis in the herd^a							
Yes	2	-	-	2	100.0	-	0.456
No	17	6	35.3	11	64.6		

AF absolute frequency, RF relative frequency, OR odds ratio, 95 % CI 95 % confidence interval

^aNot all the respondents answered the question

milk proteins and fat that may have impaired the extraction of *M. bovis* DNA from the milk samples [14, 30]. Despite these limitations, studies using experimentally

contaminated milk have demonstrated that PCR can detect the mycobacteria in milk samples with much lower concentrations of *M. bovis* DNA than the concentration

usually present in natural infections [2, 20, 29, 31]. The mycobacteria has been more frequently identified in blood than in milk samples [20, 32, 33].

Another factor that can hinder the detection of *M. bovis* in milk is its intermittent release during a short period post-infection [20, 29]. Pardo et al. [34] evaluated the mycobacteria secretion pattern in 780 milk samples collected from 52 animals for 15 consecutive days and *M. bovis* showed an intermittent and irregular release pattern in 26.5 % of the samples [34].

In the present study, of the six farms that had animals positive for *M. bovis*, only one have a history of performing tuberculin tests upon acquisition of new animals. According to the farmer, all the animals were negative for *M. bovis* in the tuberculin tests. This data shows the importance of using tests that are more sensitive in enzootic areas, as the state of Pernambuco, Brazil, where cases of BTB have already been identified using tuberculin skin test [35, 36].

Although there was no statistical association between herd size and *M. bovis* positivity, the mycobacteria was more prevalent in larger herds (101–200 animals). Herd size can influence BTB epidemiology because a high population density favors a more frequent contact between animals, facilitating the mycobacteria dissemination [37, 38].

According to Skuce et al. [39], *M. bovis* can survive in water what favors its dissemination. *M. bovis* DNA was identified in water samples experimentally contaminated even 11 months after contamination [40]. In Uganda, Africa, where cattle commonly drinks running water from rivers or streams, a study evaluated the risk factors associated with BTB and concluded that the water source was statistically associated with the disease [41]. However, in the present study, no correlation was found between water source and presence of *M. bovis* in milk and blood samples (Table 1). The fact that water sources could be implicated with BTB transmission may be a concern to health authorities, because control measures would also have to consider this contamination source besides slaughter of positive animals.

Despite the higher number of animals positive for *M. bovis* in herds with low frequency of cleaning the farm facilities and lack of udder disinfection before milking, no positive correlation was found between pathogen presence and these risk factors. Roxo [42] reported that cleaning, disinfection and hygiene are risk factors for TB. Waste management and treatment of organic matter can influence *M. bovis* prevalence in areas with previous cases of TB [43].

Conclusion

M. bovis DNA was detected in one milk sample what may pose a risk to public health. We suggest that

environmental control measures should be implemented in farms at high risk of TB transmission because environmental factors contribute to bacteria perpetuation and dissemination.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RDC performed the study, analyzed the data and drafted the manuscript. NLS, VLAS and JWP, JG conceived and designed the study, critically revised the paper and acted as the first author's study supervisors. AFBF, JMS, PRF, RCL, MAL performed some of the data analysis and critically revised the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Federal Rural University of Pernambuco (Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco CEP 52171-900, Brazil. ²Department of Immunology (Departamento de Imunologia), Research Center Aggeu Magalhães (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM) Oswaldo Cruz Foundation (Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz), Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco CEP 50740-465, Brazil. ³Academic Unit of Garanhuns (Unidade Acadêmica de Garanhuns), Federal Rural University of Pernambuco (Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE), Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns, Pernambuco CEP 55292-270, Brazil. ⁴National Agricultural Laboratory of Pernambuco (Laboratório Nacional Agropecuário de Pernambuco- LAMagro/PE), Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply of Brazil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA), Rua Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco CEP 52171-080, Brazil.

Received: 29 July 2015 Accepted: 15 February 2016

Published online: 26 February 2016

References

- Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res*. 2007;3:12. doi:10.1186/1746-6148-3-12.
- Sereno-Moreno BA, Romero TA, Ariaga C, Torres RA, Restrepo-Sudrez AL, Garcia-Salazar JA, et al. High frequency of *Mycobacterium bovis* DNA in clostridia from tuberculous cattle detected by nested PCR. *Zoonoses Public Health*. 2008;55:258–66. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01125.x.
- Milka CDA, Grace BDS, Fernando Z, Maurício CH, Francesca SQ, Mateus MDC. Microbiological evaluation of raw milk and coalho cheese commercialized in the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. *African J Microbiol Res*. 2014; 8:222–9. doi:10.5897/AJMR20136476.
- Bermudez HR, Hentzler ET, Medira BG, Hori-Oshima S, De La Mora VA, Lopez VG, et al. Correlation between histopathological, Bacteriological and PCR diagnosis of bovine tuberculosis. *J Anim Vet Adv*. 2010;9:282–4.
- Sgarioni SA, Dominguez R, Hirata C, Hirata MH, Quelco C, Leite F, et al. Occurrence of *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Paraná, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2014;71:1077–11.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Eradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEB). Brasília, 2006. http://www.agricultura.gov.br/raq_editor/faq/entam/programa%20nacional%20de%20brucelose%20e%20tuberculose%20em%20animais.pdf. Accessed 15 Jan 2015.
- Araujo CP, Oatiro ALAR, Jorge KSG, Ramos CAN, Filho AFS, Vidal CES, Vargas APC, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bupaline tissues through nested-PCR. *Braz J Microbiol*. 2014;45:33–40.
- Majeed MA-M, Ahmed WA, Manki A. Amplification of a 300 base-pair fragment from routinely identified isolates of *M. bovis* from cow's milk in Baghdad. *IJABR*. 2013;3:163–7.
- Thrusfield MV. *Epidemiologia Veterinária*. 2ª ed. São Paulo: ROCA; 2004.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2005. Available from <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/territorio/unt>.

- asp?e-cb=71&p-CAB=2057&coduti=6189&sto=48-P.A. Accessed 15 Jan 2015.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. 3.
 - Sales ML, JrAAF, Oral L, Alencar AP, Hadon MA. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. *Genet Mol Res*. 2014;13(4):7-16.
 - Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(2):725-9.
 - Zumruga MJ, Soutullo A, Garcia MJ, Marini R, Abdala A, Tarabla H, et al. Identification of dairy herds using PCR in bulk tank milk samples. *Foodborne Pathog Dis*. 2012;9(1):32-7. doi:10.1089/fpd.2011.0963.
 - Franco MM, Paes AC, Ribeiro MG, de Figueiredo Rantouja JC, Santos ACB, Miyata M, et al. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res*. 2013;9:2-8. doi:10.1186/1746-6148-9-85.
 - Zanden CHO, Marasi CD, Figueiredo EES, Lilenbaum W. *Mycobacterium bovis* detection from milk of negative skin test cows. *Vet Rec*. 2013;172:130. doi:10.1136/vr.101054.
 - El-Gedawy AA, Ahmed HA, Awadallah MAI. Occurrence and molecular characterization of some zoonotic bacteria in bovine milk, milking equipment and humans in dairy farms, Sharkia, Egypt. *Int Food Res J*. 2014;21:1813-23.
 - Mohamed SA, Aggour MG, Ahmed HA, Selim SA. Detection and differentiation between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in cattle milk and lymph nodes using multiplex real-time PCR. *Global Veterinaria*. 2014;13:794-800. doi:10.5829/idos.gv.2014.13.05.86179.
 - Senthil NR, Ranjani MR, Vasumathi K. Comparative diagnosis of *Mycobacterium bovis* by Polymerase chain reaction and Ziehl-Neelsen staining technique using Milk and nasal washing. *J Res Agril Animal Sci*. 2014;21-3.
 - Canalho RCT, Castro VS, Fernandes DWG, Moura GF, Santos ECC, Paschoalin VMF, et al. Use of the Pcr for detection *Mycobacterium bovis* in milk. *Proc XII Lat Am Cong Food Microbiol Hyg*. 2014;1359-60. doi:10.5151/foodsci-microal-180.
 - Evangelista TBR, De Anda JH. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. exposure associated with management of colostrum and milk. *Prev Vet Med*. 1996;27:23-7. doi:10.1016/0167-5877(95)00579-0.
 - Kazale BZ, Mbugi BV, Karimuribo ED, Keyyu JD, Kibiki GS, et al. Prevalence and risk factors for infection of bovine tuberculosis in indigenous cattle in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *BMC Vet Res*. 2013;9:267. doi:10.1186/1746-6148-9-267.
 - Silagwana B, Green E, Ndip RN. Molecular detection and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex from cattle at a dairy farm in the Nkonkobe region of South Africa: A pilot study. *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9:2045-56. doi:10.3390/ijerph9062045.
 - Rowe MI, Donaghy J. *Mycobacterium bovis*: The importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to rhesian cheeses. *Int J Dairy Technol*. 2008;61:317-26. doi:10.1111/j.1471-0307.2008.00483.x.
 - Eraqat S, Nazeeruddin A, Levine H, Azmi K, Al-Jawabreh A, Greenblatt CL, et al. First-time detection of *Mycobacterium bovis* in livestock tissues and milk in the West Bank, Palestinian Territories. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2417. doi:10.1371/journal.pntd.002417.
 - Malama S, Muma JB, Olea-Popelka F, Mbulu G. Isolation of *Mycobacterium bovis* from human sputum in Zambia: public health and diagnostic significance. *J Infect Dis Ther*. 2013;12. doi:10.4172/jid.1000114.
 - Silva MR, Rocha AS, da Costa RR, de Alencar AP, de Oliveira VM, Fonseca Junior AA, et al. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:321-7.
 - Kantor N, Ambroggio M, Foggli S, Marullo N, Telles MAS, Marta Ribeiro MC, Tomes MDG, et al. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis*. 2008;88:58-65.
 - Figueiredo EES, Junior CQC, Adam C, Furlaneto LV, Silvestre FG, Duarte RS, et al. Molecular techniques for identification of species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: the use of multiplex PCR and an adapted HPLC method for identification of *Mycobacterium bovis* and diagnosis of bovine tuberculosis. *Underst Tuberc - Glob Exp Innov Approaches to Diagnosis* 2012:411-432. Available in available in <http://cd.ingentaconnect.com/pdfs-wm/28550.pdf>. Accessed 15 Jan 2015.
 - Kitch DM, Weiling CS, Pozobon A. Análise da presença de *Mycobacterium bovis* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (pcr) em amostras de leite bovino in natura na região do Vale do Raquari, RS. *Revista Destaque Acadêmicos*. 2012;419-26.
 - Jordão-Junior CM, Lopes FCM, Pinto MRA, Roxo E, Leite CQF. Development of a PCR assay for the direct detection of *Mycobacterium bovis* in milk. *Brazilian J Food Nutr*. 2005;16:51-5.
 - Romero RE, Garzón DL, Mejía GA, Morroy W, Patarroyo ME, Murillo LA. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. *Can J Vet Res*. 1999;63:101-6.
 - Srinivasa K, Chauhan DS, Gupta P, Singh HB, Sharma VQ, Yadav VS, et al. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India - possible relevance in human health. *Indian J Med Res*. 2008;128:26-31.
 - Pardo RB, Langoni H, Mendonça LJP, Chi KD. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2001;38:284-7.
 - Izuel MA, Silva STG, Costa NA. Estudo retrospectivo da ocorrência de casos de tuberculose bovina diagnosticados na clínica de bovinos de Garanhuns - PE, de 2000 a 2009. *Brazilian Animal Sci*. 2009;14:52-7.
 - Mendes B, Melo LBH, Tenório TGS, Sá LM, Souto RJC, Fernandes ACC, et al. Intercorrência entre leucose emodótica e tuberculose em bovinos leiteiros do estado de Pernambuco. *Arq Inst Biol*. 2011;78:1-8.
 - Humbler MF, Gilbert M, Govaerts M, Fauville-Dufaux M, Walravens K, Saegerman C. New assessment of bovine tuberculosis risk factors in Belgium based on nationwide molecular epidemiology. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2802-8. doi:10.1128/JCM.00293-10.
 - Humbler MF, Boschiroli M, Saegerman C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: A stratified approach. *Vet Res*. 2009;40. doi:10.1051/veter/2009083.
 - Skuce RA, Allen AR, McDowell SWJ. 2011. Bovine tuberculosis (TB): a review of cattle-to-cattle transmission, risk factors and susceptibility. <https://www.dardni.gov.uk/sites/default/files/publications/dard/ntbi-literature-review-to-review-cattle-to-cattle-transmission.pdf>. Accessed 15 Jan 2015.
 - Adams AP, Bolin SR, Fine AE, Bolin CA, Kaneene JB. Comparison of PCR versus culture for detection of *Mycobacterium bovis* after experimental inoculation of various matrices held under environmental conditions for extended periods. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79:6501-6. doi:10.1128/AEM.02032-13.
 - Kazoola HB, Majalip S, Kwanuka N, Kaneene JB. Prevalence of *Mycobacterium bovis* skin positivity and associated risk factors in cattle from Western Uganda. *Trop Anim Health Prod*. 2014;46:1383-90. doi:10.1007/s11250-014-0650-1.
 - Roxo E. Bovine tuberculosis: review. *Arquivos do Instituto Biológico*. 1999;63(2):91-7.
 - Lilenbaum W, Souza GN, Fonseca LDS. Fatores de manejo associados à ocorrência de tuberculose bovina em rebanhos leiteiros do Rio de Janeiro, Brasil. *R Bras O Vet*. 2007;1498-100.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3.2 ARTIGO 2

TÍTULO: Molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle herds of the state of Pernambuco, Brazil.

REVISTA: International Journal of Mycobacteriology

Available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/IJMYCO

Full Length Article

Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil

Renata D.S. Cezar^a, Norma Lucena-Silva^b, Jonas M. Borges^c, Vania L.A. Santana^d, José W. Pinheiro Junior^{a,*}

^aFederal Rural University of Pernambuco, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil

^bDepartment of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

^cAcademic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, Brazil

^dNational Agricultural Laboratory of Pernambuco, Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply of Brazil, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2016

Accepted 27 April 2016

Available online xxxxx

Keywords:

Cheese

Food safety

PCR

Tuberculosis

ABSTRACT

Objective/background: The present study was aimed at detecting *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese using real-time quantitative polymerase chain reaction.

Methods: One hundred seven cheese samples (250 g) were purchased in 107 commercial establishments including neighborhood grocery stores, bakeries, and open-air markets from 19 municipalities of the state of Pernambuco, Brazil. Ten grams of each cheese sample were macerated with sterile saline solution in a sterile bag and DNA was extracted from 20 mg of the macerated material using the Wizard SV Genomic DNA Purification System. The quantitative polymerase chain reaction amplified a fragment corresponding to the region of difference 4 of *M. bovis*.

Results: Of the 107 samples analyzed, three (2.8%) were positive for *M. bovis* and their identities were confirmed by sequencing. This is perhaps the first report of the presence of *M. bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil.

Conclusion: The results of the present study highlight the need for improving sanitary measures during the production of artisanal cheese to prevent zoonotic tuberculosis in humans, resulting from the consumption of food contaminated with *M. bovis*.

© 2016 Asian-African Society for Mycobacteriology. Production and Hosting by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Artisanal cheeses are produced with raw milk in small farms around the world [1]. The production of artisanal cheese often

does not comply with the hygienic-sanitary requirements demanded by official agencies, especially regarding to the possibility of being contaminated with pathogens due to the

* Corresponding author at: Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail address: wiltonjrufpe@gmail.com (J.W. Pinheiro Junior).

Peer review under responsibility of Asian African Society for Mycobacteriology.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.04.007>

2212-5531/© 2016 Asian-African Society for Mycobacteriology. Production and Hosting by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: RDS Cezar et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil. Int. J. Mycobacteriol. (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.04.007>

use of raw milk from unhealthy dairy cows and lack of hygiene during processing [2].

Mycobacterium bovis is the etiological agent of bovine tuberculosis and can cause human tuberculosis, in which clinical symptoms are indistinguishable from those caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Consumption of milk and its derived products contaminated with *M. bovis* represent the main infection route of zoonotic tuberculosis for humans [3,4].

The presence of the bacillus in cheese and its association with human tuberculosis has already been reported [5-7]. In Brazil, studies have demonstrated the presence of *M. bovis* in raw cattle milk [8,9].

Considering the importance of artisanal cheese in Brazil and its participation in the transmission chain of zoonotic tuberculosis to humans, the aim of the present study was to detect *M. bovis* in artisanal cheeses commercialized in the state of Pernambuco, Brazil, using molecular techniques.

Material and methods

Sampling

One hundred and seven samples of artisanal cheese "coalho" type were purchased in 107 commercial establishments including neighborhood grocery stores, bakeries, and open-air markets located in 19 municipalities of the Garanhuns microregion, state of Pernambuco, Brazil, as follows: Angelim (six samples), Bom Conselho (six samples), Brejão (six samples), Caetés (six samples), Calçado (seven samples), Canhotinho (six samples), Correntes (six samples), Garanhuns (six samples), Iati (four samples), Jucati (six samples), Juí (eight samples), Jurema (five samples), Lagoa do Ouro (six samples), Lajedo (six samples), Palmerina (three samples), Paratama (five samples), Saloi (six samples), São João (six samples), and Terezinha (three samples).

The cheese samples were sent to the Garanhuns Laboratories Center, located in the Garanhuns Academic Unit of the Federal Rural University of Pernambuco in an isothermal box containing reusable ice.

DNA extraction

The cheese samples (250 g) were partitioned and 10 g of cheese were macerated with 20 mL of 0.9% sterile saline solution in a sterile bag. DNA extractions were performed with 20 mg of the macerated material using the Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Promega Corporation, USA, 2012) following the manufacturer's instructions.

Positive control

The *M. bovis* American Type Culture Collection (ATCC) 19274 strain was provided by the Oswaldo Cruz Foundation (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil) and it was used for the construction of a plasmid harboring the target sequence, which was the positive control in the molecular tests. The genomic DNA of *M. bovis* ATCC 19274 strain was extracted and the fragment corresponding to the region of difference 4 (RD4) was amplified with the specific primers

reported by Sales et al. [10]. The target fragment was cloned using *Escherichia coli* XL1 blue strain and TA cloning kit (Invitrogen, Invitrogen Corporation, California, 2006) according to the manufacturer's instructions.

Real-time polymerase chain reaction

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using the same primer set used for the amplification of the RD4 fragment of the *M. bovis* ATCC 19274 strain in the presence of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA, 2010) and DNA sample. The reaction solution (25 μ L) consisted of 2.0 μ L of DNA and 12.5 μ L of the master mix with 1.0 μ L of each primer (5 pmol), 0.5 μ L of probe (5 pmol), and 8- μ L water. The amplification conditions were 95 °C for 15 min (denaturation) followed by 40 cycles of 94 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. The qPCR was performed in an ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA, 2010) system set for absolute quantification. In all PCR runs, standard curves were obtained using plasmid DNA encompassing the mycobacteria RD4 sequence as positive control. The positive control was prepared in triplicate by serial dilution of 10 \times plasmid DNA from 200 ng (quantification cycle = 11.8) to 0.0002 ng (quantification cycle = 32.2). The standard curve slope was -3.40 and R = 0.999 with 97% efficiency.

Sequencing

The commercial kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1 (Applied Biosystems, USA, 2009) was used for DNA sequencing following the manufacturer's recommendations. The RD4 fragments were sequenced using the Sanger method and the reaction products were analyzed in the ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA, 2009).

All the sequences obtained in the present study were compared with the RD4 fragment of the reference genome (88 bp; GenBank Access number BX248339.1) using the software Blast-N (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and MEGA6 [11].

Results and discussion

This is the first report on the occurrence of *M. bovis* in artisanal cheese commercialized in the Garanhuns microregion, a dairy region of the state of Pernambuco, northeastern Brazil.

Of the 107 samples analyzed in the present study, three (2.8%) were positive for *M. bovis* and their identities were confirmed by sequencing. The positive samples were from two neighborhood grocery stores of the municipality of Correntes (one out of six) and Lagoa do Ouro (one out of six), and an open-air market located in Bom Conselho (one out of six; Table 1).

Few studies in Brazil have evaluated the presence of *M. bovis* in cheese. In the present study, *M. bovis* DNA was present in 2.8% of the samples analyzed, which is lower than the 10% positivity found in samples of the same type of cheese collected in the state of Piauí, northeastern Brazil [12]. Our study and the one of Silva et al. [12] shows the risk of human infection by *M. bovis* through the consumption of cheese, yogurt, and milk without heat treatment, as 41% of milk is illegally

Table 1 – Results of quantitative polymerase chain reaction of cheese samples collected from cattle of the microregion of Garanhuns, state of Pernambuco, Brazil, 2014.

Municipality	No. of samples	Results	
		Positive	Negative
Angelim	6	–	6
Bom Conselho	6	1	5
Brejão	6	–	6
Caetés	6	–	6
Caçado	7	–	7
Canhotinho	6	–	6
Correntes	6	1	5
Garanhuns	6	–	6
Iati	4	–	4
Jucati	6	–	6
Jupi	8	–	8
Jurema	5	–	5
Lagoa do Ouro	6	1	5
Lajedo	6	–	6
Palmerina	3	–	3
Paranatama	5	–	5
Salóá	6	–	6
São João	6	–	6
Terezinha	3	–	3
Total	107	3	104

produced in Brazil [10]. Melo et al. [13] evaluated the presence of *M. bovis* in 147 cheese samples confiscated from travelers coming from 21 countries to Brazil and found *M. bovis* genetic material in 17.5% of the samples, showing that cheese may contribute to the spread of bacteria to different countries.

More than 200 samples of fresh cheese from the USA were analyzed and only 0.5% of them were positive for *M. bovis* [1,5]. However, the consumption of Mexican fresh cheese accounts for 90% of cases of zoonotic tuberculosis affecting persons of Hispanic ethnicity living in the USA [14]. A study by Rodwell et al. [15] compared spoligotyping by *M. bovis* strains isolated from humans in the USA with strains from cows raised in Mexico and found that 91% of the human *M. bovis* isolates from the USA had spoligotypes identical to those found in Mexican cattle. Of 95 samples of fresh cheese from the state of Hidalgo, Mexico, 6.31% (six from 95) were positive for the bovine bacillus and four samples (4.21%) were from regions with enzootic bovine tuberculosis. A positive correlation between cases of zoonotic tuberculosis and the consumption of cheese made from raw milk in endemic areas for bovine tuberculosis has been previously described [16].

In 2001, one third of all cases of pediatric tuberculosis diagnosed in San Diego, California, USA were caused by *M. bovis*, and the consumption of dairy products was associated with positive tuberculin skin test in children [17]. In a study performed in Brazil, of 189 patients with tuberculosis, only three (1.59%) were diagnosed with *M. bovis*; however, the consumption of cheese made with raw milk was associated with two of the cases of zoonotic tuberculosis [7].

Although in Brazil a National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis was established in 2001 [18], tuberculosis is still present in several states [19] with an average prevalence of 3.3% [20]. The Garanhuns microregion, where the present study was performed, is enzootic for bovine tuberculosis [21,22].

The consumption of raw milk and its by-products are the main infection route associated with human cases of tuberculosis caused by *M. bovis*, especially in cases of extrapulmonary tuberculosis [5,7,20]. It is believed that *M. bovis* is responsible for approximately 4000 of the 100,000 cases of human tuberculosis diagnosed in Brazil [23].

The manufacturing process of artisanal cheese, which uses raw milk, does not eliminate the tuberculosis bacillus. Experimental studies have shown that the bacillus can persist for up to 305 days depending on the type of cheese [24].

Milk pasteurization and use of pasteurized milk in cheese production dramatically reduces the incidence of zoonotic tuberculosis [25]. Due to the risk that dairy products made with raw milk may pose to public health, it is important to study cases of human tuberculosis caused by *M. bovis* in order to provide better assistance to patients as well as to improve the diagnosis, control, and prevention measures of tuberculosis in cattle herds.

Detection of *M. bovis* in samples of artisanal cheese intended for human consumption may pose a risk to public health, showing that measures to prevent and control tuberculosis in cattle herds should be improved. Cheese quality must also be monitored, which can be achieved using molecular techniques. Artisanal cheese should be consumed with caution.

Ethical considerations

The Ethics Committee on Animal Use of The Federal Rural University of Pernambuco provided scientific and ethical clearance for the present study (reference number 23082.00467/1/2013, license number 028/2013).

Conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

- [1] H. Kinde, A. Mikolon, A. Rodriguez-Lainz, et al, Recovery of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Mycobacterium bovis* from cheese entering the United States through a noncommercial land port of entry, *J. Food Prot.* 70 (2007) 47–52.
- [2] S.L. Almeida, E.G.P. Júnior, J.R.F. Guerra, Representação da Produção e Consumo do queijo artesanal, *RGS* 2 (2013) 37–58.
- [3] M. Gallivan, S. Neha, J. Flood, Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003–2011, *Emerg. Infect. Dis.* 21 (2015) 435–443.
- [4] P.R. Ingram, P. Bremner, T.J. Inglis, et al, Zoonotic tuberculosis: on the decline, *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 34 (2010) 339–341.
- [5] N.B. Harris, J. Payeur, D. Bravo, et al, Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 1025–1028.
- [6] D. Park, H. Qin, S. Jain, et al, Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in patients coinfecting with human immunodeficiency virus, *Clin. Infect. Dis.* 51 (2010) 1343–1346.
- [7] M.R. Silva, A. da Silva Rocha, R.R. da Costa, et al, Tuberculosis patients coinfecting with *Mycobacterium bovis* and

ARTICLE IN PRESS

4

INTERNATIONAL JOURNAL OF MYCOBACTERIOLOGY XXX (2016) XXX–XXX

- Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108 (2013) 321–327.
- [8] A.A. El-Ge dawy, H.A. Ahmed, M.A.I. Awadallah, Occurrence and molecular characterization of some zoonotic bacteria in bovine milk, milking equipments and humans in dairy farms, Sharbia, Egypt, Int. Food Res. J. 21 (2014) 1813–1823.
- [9] M.M. Franco, A.C. Paes, M.G. Ribeiro, et al, 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 Vet. Res. 9 (2013) 85.
- [10] M.L. Sales, A.A. Fonseca Jr., L. Orzül, et al, Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates, Gen. Mol. Res. 13 (2014) 4607–4616.
- [11] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, et al, MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, Mol. Biol. Evol. 30 (2013) 2725–2729.
- [12] M.R. Silva, B.B. Rocha, G.N. Souza, et al, Ocorrência de *Mycobacterium bovis* em queijo Coalho na região de Parnaíba, Piauí – Brasil. XII Congresso internacional do leite. 2008. Available from: <<http://www.cnpq.lembrapa.br/congresso2013/anais/artigos/qualidade/743.pdf>> (Date accessed 15 May, 2015).
- [13] C.B. Melo, M.E. Pinheiro de Sá, A.R. Souza, et al, Bacteria in dairy products in baggage of incoming travelers, Brazil, Emerg. Infect. Dis. 20 (2014) 1933–1934.
- [14] B. Müller, B. Dürr, A. Salome, et al, Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans, Emerg. Infect. Dis. 19 (2013) 899–908.
- [15] T.C. Rodwell, A.J. Kapsis, M. Moore, et al, Tracing the origins of *Mycobacterium bovis tuberculosis* in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping, Int. J. Infect. Dis. 14 (2010) e129–135.
- [16] CDC, Raw-milk cheese implicated in 35 TB cases, Morb. Mortal. Wkly Rep. 54 (2005) 605–608.
- [17] R.E. Besser, B. Pakiz, J.M. Schulte, et al, Risk factors for positive mantoux tuberculin skin tests in children in San Diego, California: evidence for boosting and possible foodborne transmission, Pediatrics 108 (2001) 305–310.
- [18] Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília, 2006. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf> (Date accessed 15 May, 2015).
- [19] OIE 2015, Available from: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail> (Date accessed 15 May, 2015).
- [20] R.C.T. Carvalho, V.S. Castro, D.V.G.S. Fernandes, et al, Use of PCR for detection of bovine tuberculosis bacillus in milk of positive skin test cows, Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 51 (2014) 42–48.
- [21] M.A. Izael, S.T.G. Silva, N.A. Costa, et al, Estudo retrospectivo da ocorrência dos casos de tuberculose bovina diagnosticados na clínica de bovinos de Garanhuns – PE, de A 2009, Ciênc. anim. bras. 1 (2009) (2000) 452–457 (in Portuguese).
- [22] E.I. Mendes, L.E.H. Melo, T.G.S. Tenório, et al, Intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose em bovinos leiteiros do estado de Pernambuco, Arq. Inst. Biol. 78 (2012) 1–8 (in Portuguese).
- [23] P.S. Murakami, R.B.N. Fuverki, S.M. Nakatani, et al, Tuberculose bovina : Saúde Animal e Saúde Pública, Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR 12 (2009) 67–74 (in Portuguese).
- [24] M.T. Rowe, J. Donaghy, *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses, Int. J. Dairy Technol. 61 (2008) 317–326.
- [25] M. Bose, Natural reservoir, zoonotic tuberculosis and interface with human tuberculosis: an unsolved question, Indian J. Med. Res. 128 (2008) 4–6.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação do DNA de *Mycobacterium bovis* nas diferentes amostras analisadas constatou a presença do agente em rebanhos da microrregião Garanhuns, bem como em queijo coalho comercializado na região. Não foi possível identificar associação da prevalência com os fatores de risco avaliados.

Os resultados encontrados nesta tese revelaram a importância da implantação de medidas de controle para a tuberculose bovina com o objetivo de evitar a permanência e a propagação do agente no rebanho bovino, assegurando a sanidade dos animais e garantindo a qualidade de leite e derivados para a população, minimizando o risco para a saúde pública.

Uma vez evidenciado a presença do DNA do agente da tuberculose bovina no estado de Pernambuco, os resultados desta tese alertam para a importância de uma integração entre os órgãos oficiais compreendendo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e o Ministério da Saúde juntamente com seus programas de controle para tuberculose bovina e tuberculose humana, respectivamente, com o objetivo de estabelecer um inquérito epidemiológico a fim de se conhecer os casos de tuberculose zoonótica e a partir de então criar uma rede de trabalho conjunto no controle e prevenção da doença no rebanho e na população humana.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-SALINAS, R.; ESTRADA CHÁVEZ, C.; MILIÁN-SUAZO, F. Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Revisión genotyping methods for *Mycobacterium bovis*. Review. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, Guadalajara, v. 47, n. 4, p. 389-412, 2009.
- ALLIX-BÉGUEC, C. Importance of identifying *Mycobacterium bovis* as a causative agent of human tuberculosis. **European respiratory journal**, Lille, v. 35, n. 3, p. 692-694, 2010.
- ALWATHNANI, H. A.; ASHGAN, M. H.; IHAB, M. M. Nested polymerase chain reaction as a molecular tool for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex recovered from milk samples. **African Journal of Microbiology Research**, Riyadh, v. 6, n. 6, p. 1338-1344, 2012.
- ARAÚJO, C. P. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. **PLoS One**, California, v. 9, n. 3, p. 633-640, 2014.
- BEZERRA, A. V. A. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complexes by Real-Time PCR in bovine milk from Brazilian Dairy Farms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 78, n. 5, p. 1037-1042, 2015.
- BHANUREKHA, V. et al. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* from bovine milk samples. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, bangladesh, v. 2, n. 1, p. 80-83, 2015.
- BILAL, S. et al. Human bovine tuberculosis - remains in the differential. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 59, n. 11, p. 1379-1382, 2010.
- BOUKARY, A. R. et al. Risk Factors Associated with bovine tuberculosis and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains in urban settings in niger. **Transboundary and Emerging Diseases**, Malden, v. 59, n. 6, p. 490-502, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. 2011. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/30/MANUAL-DE-RECOMENDACOES-PARA-O-CONTROLE-DA-TUBERCULOSE-NO-BRASIL.pdf>>. Acesso em: 11 ago 2016
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. 2016a. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11045&Itemid=674>. Acesso em: 11 ago 2016.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. 2016b. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ProgramaTB.pdf>> Acesso em: 11 ago 2016.
- CARVALHO, R. C. T. et al. Use of the PCR for detection *Mycobacterium bovis* in milk. **Food Microbiology and Hygiene**, Cham, v. 1, p.3 59–360, 2014.
- CFSPH. Bovine tuberculosis. 2009. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2015.
- COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 641-676, 2003.
- COSTA, L. B. **Tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no estado da Bahia**. 2012. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.
- COSTA, P. et al. Rapid identification of veterinary-relevant *Mycobacterium tuberculosis* complex species using 16S rDNA, IS6110 and Regions of Difference-targeted dual-labelled hydrolysis probes. **Journal of Microbiological Methods**, Norway, v. 107, p. 13-22, 2014.
- COSTA, P. M. N. **Diagnóstico molecular da tuberculose bovina, Portugal**. 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa
- COUSINS, D. Under the Microscope *Mycobacterium bovis* : an extraordinary pathogen. **Microbiology Australia**, Clayton South, v. 2, n. 4, p. 15-17, 2004
- DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, Philadelphia, v. 100, n. 11, p. 1862-1870, 2006.
- DOMIGO, M.; VIDAL, E.; MARCO, A. Pathology of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, 2014. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.03.017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528814000927>> Acesso em 08 jun. 2016
- EREQAT, S. et al. First-time detection of *Mycobacterium bovis* in livestock tissues and milk in the West Bank, Palestinian Territories. **PLoS neglected tropical diseases** San Francisco, v. , n. 9, p. 2417, 2013.
- EL-GEDAWY, A. A.; AHMED, H. A.; AWADALLAH, M. A. I. Occurrence and molecular characterization of some zoonotic bacteria in bovine milk, milking equipments and humans in dairy farms, Sharkia, Egypt. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 21, n. 5, p. 1813-1823, 2014.
- FENTAHUN, T.; LUKE, G. Diagnostic techniques of bovine tuberculosis: a review. **African Journal of Basic & Applied Sciences**, Dubai, v. 4, n. 6, p. 192-199, 2012.

FRANCO, M. M. J. et al. 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**, London, v. 9, n. 85, p. 2-8, 2013.

FIGUEIREDO, E. E. S. et al. 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**, Goiás, v. 9, n. 4, p. 1023-1033, 2008.

FURLANETTO, L. V. et al. Prevalência de tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 64, n. 2, p. 274-280, 2012.

FUVERKI, R. B. N. PCR use for detection and identification of mycobacterias from bovine clinical samples. **Archives of Veterinary Science**, Paraná, v. 13, n. 1, p. 73-77, 2008.

GALLIVAN, M.; NEHA, S.; FLOOD, J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003–2011. **Emerging Infectious Diseases**, Mailstop, v. 21, n. 3, p. 435-443, 2015.

GARNIER, T. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 3, p. 7877-7882, 2003.

GRANGE, J. M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**, Philadelphia, v. 81, n. 1/2, p. 71-77, 2001.

GONZALO-ASENSIO, J. et al. Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 31, p. 11491-11496, 2014.

GUTA, S. et al. Epidemiological investigation of bovine tuberculosis herd breakdowns in Spain 2009/2011. **PLoS ONE**, Califórnia, v. 9, n. 8, p. 1-12, 2014.

HUMBLET, M.F., BOSCHIROLI, M.L., SAEGERMAN, C. et al. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: A stratified approach. **Veterinary Research**, London, v. 40, n. 50, p. 2-24, 2009. doi:10.1051/vetres/2009033

INGRAM, P. R. et al. Zoonotic tuberculosis : on the decline Declining incidence of *Mycobacterium bovis* infection in Australia. **Communicable Diseases Intelligence**, Canberra, v. 34, n. 3, p. 1-6, 2010.

IZAEL, M. A. (2009). Estudo retrospectivo da ocorrência dos casos de tuberculose bovina diagnosticados na clínica de bovinos de Garanhuns - PE, de 2000 A 2009. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, suplemento 1. Este suplemento contém as palestras e resumos de trabalho apresentados durante o VIII Congresso brasileiro de buiatria, realizado em Belo Horizonte MG em outubro de 2009

JABBAR, A. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* from human sputum samples through multiplex PCR. Pak. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Malden, v. 28, n. 4, p. 1275-1280, 2015.

JIA, K. et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* from clinical species using DNA microarrays. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Ontario, v. 24, n. 1, p. 156-160, 2012.

JIANG, G. et al. Pulmonary Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis* in China. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 8538, p. 1-3, 2015.

JORDÃO-JUNIOR, C. M. et al. Development of a PCR assay for the direct detection of *Mycobacterium bovis* in milk. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 51-55, 2005.

JORGE, K. S. G. **Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua Importância na ocorrência de tuberculose zoonótica, Brasil**. 2010. 88 f. Tese (Doutorado em Saúde e desenvolvimento na Região Centro-Oeste) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul.

KAHLA, B.I. et al. Isolation and molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* from raw milk in Tunisia. **African Health Sciences**, Grahamstown, v. 1, p. 2-5, 2011.

Kantor, I.N. et al. Human *Mycobacterium bovis* Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. **Tuberculosis**. Philadelphia, v. 88, p.358-65, 2008.

KICH, D. M.; KRELING, C. S.; POZZOBON, A. Análise da presença de *Mycobacterium bovis* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (pcr) em amostras de leite bovino *in natura* na região do Vale do Raquari, RS. **Revista Destaques Acadêmicos**, Lajeado, v. 4, p. 19-26, 2012.

KUBICA, T. et al. *Mycobacterium bovis* isolates with M. tuberculosis Specific characteristics. **Emerging Infectious Diseases**, Mailstop, v. 12, n. 5, p. 763-765, 2006.

LEITE, C. Q. F. et al. Isolation and Identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LEE, S.; LEE, W. Epidemiological patterns and testing policies for bovine tuberculosis in the domestic cattle in Korea from 1961 to 2010. **Japanese Journal of Veterinary Research**, Sapporo, v. 61, p. 19-23, 2013.

MALAMA, S. et al. Isolation of *Mycobacterium bovis* from human sputum in ambia: public health and diagnostic significance. **Infectious Diseases and Therapy**, London, v. 1, n. 114, 2013.

MELO, C. B. et al. Bacteria in dairy products in baggage of incoming travelers, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Mailstop, v. 20, n. 11, p. 1933-1934, 2014.

MELO, L. E. H. et al. Ocorrência e caracterização da tuberculose em caprinos leiteiros criados no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 9, p. 831-837, 2012.

MENDES, E. I. et al. Intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose em bovinos leiteiros do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, p. 1-8, 2011.

MENEZES, S. S. M. Curd cheese: cultural tradition and social control strategy in the northeast. **Revista de Geografia**, Recife, v. 28, n. 1, p. 40-56, 2011.

MEZZADRI, F. P. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento DERAL - Departamento de Economia Rural. **Análise da conjuntura agropecuária leite - ano 2014**. Disponível em <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/bovinocultura_leite_14_15.pdf> Acesso em: 31 mai. 2016.

MICHEL, A. L.; MÜLLER, B.; VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? **Veterinary Microbiology**, Victoria, v. 140, n. 3, p. 371-381, 2010.

MISHRA, A. et al. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a Novel Nested PCR Assay : correlation with conventional techniques. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 11, p. 5670-5678, 2005.

MOHAMED, S. A. et al. Detection and differentiation between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in cattle milk and lymph nodes using multiplex real-time PCR. **Global Veterinaria**, Deira, v. 13, n. 5, p. 794-800, 2014.

MOSTOWY, S. et al. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **The Journal of infectious diseases**, Arlington, v. 186, n. 1, p. 74-80, 2002.

MUMTAZ, N. et al. Reliability of PCR for detection of bovine tuberculosis in Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, Punjab, v. 40, n. 5, p. 347-351, 2008.

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

NAWAZ, A. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* from sputum and blood samples of human using a Duplex PCR. **International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences**, Wilmington, v. 22, n. 1, p. 117-120, 2011.

NEILL, S. D.; SKUCE, R. A; POLLOCK, J. M. Tuberculosis--new light from an old window. **Journal of applied microbiology**, Bedford, v. 98, n. 6, p.1261–1269, 2005

OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2009. Disponível em <http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_Index.htm> Acesso em: 20 jan. 2015.

PANDOLFI, J. R. et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2007.

PARK, D. et al. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in patients coinfecting with human immunodeficiency virus. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the infectious. **Infectious Diseases Society of America**, Arlington, v. 51, n. 11, p. 1343-1346, 2010.

PEREIRA-SUÁREZ, A. L. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR in fresh cheese from local Markets in Hidalgo, Mexico. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 77, n. 5, p. 849-852, 2014.

PROAÑO-PÉREZ, F. et al. Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**, New York, v. 101, n. 1/2, p. 65-72, 2011.

RAMOS, D. F. et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 372, p. 365-372, 2014.

RAPOSO, A. S. S. **Contributo para o estudo epidemiológico da tuberculose bovina em animais domésticos e silváticos na Região de Portalegre**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa

REDDINGTON, K. et al. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. **PLoS ONE**, Califórnia, v. 6, n. 8, p. 1-8, 2011.

RIBÓN, W. Biochemical isolation and identification of mycobacteria. 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biochemical-testing/biochemical-isolation-and-identification-of-mycobacteria>>. Acesso em: 20 maio 2015.

ROCHA, A. et al. Genotyping did not evidence any contribution of *mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. **Tuberculosis**, Philadelphia, v. 91, n. 1, p. 14-21, 2011.

RODRIGUES, C.A. et al. Controle da tuberculose bovina. **Revista científica eletônica de medicina veterinária**, Garça, v. 6, n. 11, 2008

ROMERO, R. E. et al. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ontario, v. 63, n. 2, p. 101-106, 1999.

ROWE, M. T.; DONAGHY, J. *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, Cornwall, v. 61, n. 4, p. 317-326, 2008.

ROXO, E. Bovine tuberculosis: review. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, p. 91-97, 1996.

- RUGGIERO, A. P. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.
- SAIDU, A. S. et al. Public health implications and risk factors assessment of *Mycobacterium bovis* infections among abattoir personnel in Bauchi State , Nigeria. **Journal of Veterinary Medicine**, Cairo, v. 2015, p. 1-5, 2015.
- SALES, M. L. et al. Evaluation of molecular maker for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. **Folia Microbiológica**, Dordrecht , v. 59, p. 433-438, 2014a.
- _____. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolatesv. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p. 4607-4616, 2014b.
- SANOUE, A. et al. *Mycobacterium bovis* in burkina faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates. **PLoS neglected tropical diseases**. **PLoS neglected tropical diseases**, Califórnia, v. 8, n. 10, p. 4607-4616, 2014.
- SEBRAE. Boletim Setorial do Agronegócio.**Bovinocultura leiteira**. 2010. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/leite-e-derivados/Boletim%20Bovinocultura.pdf>. Acesso em: 08 Ago. 2012.
- SENTHIL, N. R.; RANJANI, M. R.; VASUMATHI, K. Comparative diagnosis of *Mycobacterium bovis* by Polymerase chain reaction and Ziel- Neelsen staining technique using Milk and nasal washing. **Journal of Research in Agriculture and Animal Science**, Haryana, v. 2, n. 5, p. 1-3, 2014.
- SHAR, N. P. et al. Occurrence of overlooked zoonotic tuberculosis: detection of *Mycobacterium bovis* in human cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1352-1358, 2014.
- SILVA, M. R. et al. Ocorrência de *Mycobacterium bovis* em queijo coalho na região de Parnaíba, Piauí – Brasil. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 12., 2013a. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/congresso2013/anais/artigos/qualidade/743.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2015.
- _____. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p.321–327, 2013b.
- SKUCE, R. A.; ALLEN, A. R.; MCDOWELL, S. W. J. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. **Veterinary Medicine International**. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/621210>>. Acesso em: 20 mai. 2015.
- SMITH, N. H. et al. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 670-681, 2006.
- SOUZA, A. et al. Importância da tuberculose bovina na saúde pública e animal. 2011. Disponível em:

<<http://www.unicruz.edu.br/seminario/artigos/saude/IMPORT%C3%82NCIA%20DA%20TUBERCULOSE%20BOVINA%20NA%20SA%20C3%9ADE%20P%C3%9ABLICA%20E%20ANIMAL%20.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2015.

STONE, M. J.; BROWN, T. J.; DROBNIEWSKI, F. A. Human *Mycobacterium bovis* infections in London and Southeast England. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 1, p. 164-165, 2012.

STRAIN, S. M.; MCNAIR, J.; MCDOWELL, S. W. J. Bovine tuberculosis : a review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle. 2011. Disponível em: <<https://www.daera-ni.gov.uk/sites/default/files/publications/dard/afbi-literature-review-tb-review-diagnostic-tests-cattle.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2015.

SWIFT, B. M. C.; REES, C. E. D. Detecting mycobacteria in cattle blood. **Veterinary Record**, London, v. 30, p. 522-523, 2013.

TAMIRU, F.; HAILEMARIAM, M.; TERFA, W. Preliminary study on prevalence of bovine tuberculosis in cattle owned by tuberculosis positive and negative farmers and assessment of zoonotic awareness in Ambo and Toke Kutaye districts , Ethiopia. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, Nairobi, v. 5, n. 10, p. 288-295, 2013.

TAYLOR, G. M. et al. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**, London, v. 3, n. 12, p. 1-11, 2007.

THOEN, C. O. et al. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. **Veterinaria Italiana**, Santiago, v. 45, n. 1, p. 135-181, 2009.

TIBATÁ, V.; GONZÁLEZ, C. Análisis transcripcional de la región genética RvD1 de *Mycobacterium bovis*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 6, n. 2, p. 62-66, 2004.

VELAYATI, A. A. et al. *Mycobacterium bovis* infection in children in the same family: transmission through inhalation. **Monaldi Archives for Chest Disease**, Pavia, v. 67, n. 3, p. 169-172, 2007.

VELOSO, F. P. et al. Prevalência e fatores de risco da tuberculose bovina no estado de Santa Catarina. **Biológico**, São Paulo, v. 77, supl. 1, p. 11-64, 2015.

VINNERÅS, B. et al. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in human urine. **Journal of the International Association on Water Pollution Research**, New York, v. 63, n. 6, p. 1075-1080, 2011.

WILDNER, L. M. et al. Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 40, n. 3, p. 207-229, 2011.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report. 2015. Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2015_executive_summary.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2016.

ZARDEN, C. F. O. et al. A complementary diagnosis of naturally occurring tuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Rio de Janeiro using a MPB70-ELISA, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Heidelberg, v. 45, n. 5, p. 1203-1206, 2013.

ZUMÁRRAGA, M. J. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* - infected dairy herds using PCR in bulk tank milk samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, Knoxville, v. 9, n. 2, p. 132-137, 2012.

APÊNDICE

QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO
PROJETO TUBERCULOSE BOVINA
Renata Duarte da Silva Cezar

Nº: _____ Data: _____

Nome da Propriedade: _____

Proprietário: _____ Telefone _____

Endereço: _____

- | | |
|---|---|
| 1) Qual o tamanho do rebanho? | d) Pardo Suíça |
| a) Abaixo de 50 animais | e) Outra. Qual? |
| b) Entre 51 e 100 animais | |
| c) Entre 101 e 200 animais | 9) Qual a fonte de água? |
| d) Acima de 200 animais | a) Parada |
| | b) Corrente |
| 2) Os animais para reposição são provenientes da propriedade? | 10) Os bebedouros são comuns para jovens e adultos? |
| a) Sim | a) Sim |
| b) Não | b) Não |
| 3) Qual a taxa anual de reposições dentro do rebanho? | 11) Qual o tipo de alimentação? |
| a) Abaixo de 50 animais | a) Capim |
| b) Entre 51 e 100 animais | b) Feno |
| c) Entre 101 e 200 animais | c) Ração |
| d) Acima de 200 animais | d) Palma |
| | d) Outra |
| 4) Quando importa animais realiza quarentena? | 12) Os animais recebem mineralização? |
| a) Sim | a) Sim |
| b) Não | b) Não |
| 5) Na aquisição de animais realiza exames? (Caso não ir para questão 7) | 13) Os comedouros são comuns para jovens e adultos? |
| a) Sim | a) Sim |
| b) Não | b) Não |
| 6) Qual? | 14) Qual o tipo de manejo reprodutivo utilizado na propriedade? |
| a) Brucelose | a) Monta natural |
| b) Tuberculose | b) Inseminação artificial |
| c) Diarréia Viral Bovina | c) Transferência de embriões |
| 7) Qual o sistema de criação? | 15) Vende animais para outras propriedades? |
| a) Intensivo | a) Sim |
| b) Extensivo | b) Não |
| c) Semi-Intensivo | |
| 8) Qual a raça explorada? | |
| a) Holandesa | |
| b) Girolanda | |
| c) Jersey | |

16) Qual o tipo de ordenha realizado na propriedade?

- a) Manual
- b) Mecânico

17) Número de ordenha diária: _____

18) A quem entrega o leite

- a) Cooperativa
- b) Laticínios
- c) Consumidor
- d) Não entrega

19) Qual a frequência de limpeza das instalações?

- a) Diária
- b) Semanal
- c) Mensal

20) A ordenha é realizada com bezerro ao pé?

- a) Sim
- b) Não

21) Realiza-se limpeza do úbere antes da ordenha?

- a) Sim
- b) Não

22) Os bezerros são alimentados com colostro?

- a) Sim
- b) Não

23) Realiza limpeza do úbere antes do fornecimento do colostro? (Caso não ir para questão 23)

- a) Sim
- b) Não

24) O colostro sofre algum tratamento térmico antes de ser fornecido ao bezerro?

- a) Refrigeração
- b) Congelamento
- c) Aquecimento térmico

25) O leite produzido na propriedade é comercializado?

- a) Sim
- b) Não

26) Numero de vacas em lactação _____

27) Produção média diária de leite _____ l

28) Resfria o leite?

- a) Não
- b) Sim

29) Se sim:

- a) Refrigerador/ tanque próprio
- b) Refrigerador/ tanque coletivo

30) Qual o destino do leite comercializado?

- a) Fabricação de queijos *in natura*
- b) Fabricação de iogurtes/achocolatados
- c) Venda *in natura*

31) Produz queijo na propriedade?

- c) Sim
- d) Não

32) Existe criação consorciada? (Caso não ir para questão 34)

- a) Sim
- b) Não

33) Existem casos registrados de tuberculose no rebanho?

- a) Sim
- b) Não

34) Já observou animais com sinais clínicos da tuberculose?

- a) Sim
- b) Não

35) Qual? _____

36) Os tratadores que lidam com esses animais doentes lidam com o restante do rebanho?

- a) Sim
- b) Não

ANEXO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFRPE

LICENÇA NÚMERO 028/2013

PROTOCOLO 23082.004671/201

LICENÇA Nº.
028/2013

USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO
PROTOCOLO Nº 23082.004671/201
RECEBIDO EM: 14/03/2013

A09

I- FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

Lista das DCBs disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf.

1. FINALIDADE

Ensino

Pesquisa

Treinamento

Jovem pesquisador/Pesquisador visitante

Início: 01/03/2013

Término: 31/12/2016

2. TÍTULO DO PROJETO/AULA PRÁTICA/TREINAMENTO

Pesquisa de *Mycobacterium bovis* em rebanhos bovinos provenientes da microrregião de Garanhuns –PE

Área do conhecimento: Medicina Veterinária

Lista das áreas do conhecimento disponível em:
<http://www.cnpq.br/areasconhecimento/index.htm>

3. RESPONSÁVEL

Nome completo	José Wilton Pinheiro Júnior
Instituição	Universidade Federal Rural de Pernambuco
Unidade	Acadêmica de Garanhuns


CEUA - UFRPE
 Aprovado em
 29/04/2013
 Validade
 29/04/2015