

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E MOLECULAR POR
SPOLIGOTYPING DA TUBERCULOSE A PARTIR DE BOVINOS E
BUBALINOS ABATIDOS EM ABATEDOUROS OFICIAIS E EM
VÍSCERAS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS LIVRES NO ESTADO
DA BAHIA - BRASIL**

ÉVELIN SANTIAGO VASCONCELOS DOS SANTOS

Salvador - BA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E MOLECULAR POR
SPOLIGOTYPING DA TUBERCULOSE A PARTIR DE BOVINOS E
BUBALINOS ABATIDOS EM ABATEDOUROS OFICIAIS E EM
VÍSCERAS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS LIVRES NO ESTADO
DA BAHIA - BRASIL**

ÉVELIN SANTIAGO VASCONCELOS DOS SANTOS

Médica Veterinária

Salvador - BA

2019

ÉVELIN SANTIAGO VASCONCELOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E MOLECULAR POR
SPOLIGOTYPING DA TUBERCULOSE A PARTIR DE BOVINOS E
BUBALINOS ABATIDOS EM ABATEDOUROS OFICIAIS E EM
VÍSCERAS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS LIVRES NO ESTADO
DA BAHIA - BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da
Bahia como requisito final para obtenção de título de
Doutora em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Joselito Nunes Costa

Co- orientador: Prof. Dr. Fernando Alzamora Filho

Co- orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

Salvador - BA

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Evelin Santiago Vasconcelos dos
AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E MOLECULAR POR
SPOLIGOTYPING DA TUBERCULOSE A PARTIR DE BOVINOS E
BUBALINOS ABATIDOS EM ABATEDOUROS OFICIAIS E EM
VÍSCERAS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS LIVRES NO ESTADO
DA BAHIA - BRASIL / Evelin Santiago Vasconcelos dos
Santos. -- Salvador, 2019.

99 f. : il

Orientador: Joselito Nunes Costa.

Coorientador: Fernando Alzamora Filho.

Tese (Doutorado - Medicina Veterinária) --

Universidade Federal da Bahia, Escola de medicina
Veterinária e Zootecnia, 2019.

1. Tuberculose. 2. Spoligotyping. 3.
Mycobacterium. 4. Feira-livre. 5. Bovinos. I. Costa,
Joselito Nunes. II. Alzamora Filho, Fernando. III.
Título.

Avaliação bacteriológica e molecular (Por spoligotyping) de Mycobacterium bovis a partir de bovinos e bubalinos abatidos em abatedouros e em vísceras comercializados nas feiras livres no estado da Bahia

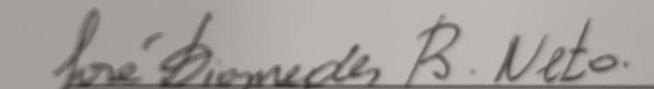
Evelin Santiago Vasconcelos

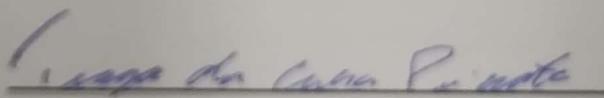
Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

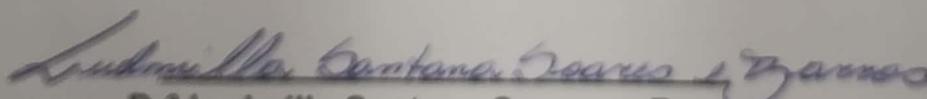
Salvador, em 04 de julho de 2019

Comissão Examinadora:


Dr. Maurício Costa Alves da Silva
UFBA


Dr. José Diomedes Barbosa Neto
UFPA


Dr. Tiago da Cunha Peixoto
UFBA


Dr. Ludmilla Santana Soares e Barros
UFRB


Dr. Joselito Nunes Costa
UFBA
Orientador

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ÉVELIN SANTIAGO VASCONCELOS DOS SANTOS – Nascida em 12 de maio de 1983 na cidade de Feira de Santana, residente em Santo Antônio de Jesus, casada e mãe de dois filhos. Graduada pela Universidade Federal da Bahia (2009), especialista em Gestão de Saúde e Gestão Hospitalar (2011) e mestre pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em Ciência Animal (2014) - bolsista FAPESB. É colaboradora de projetos de pesquisa na área doenças infecciosas. Foi docente de ensino superior em faculdade particular por 5 anos e atualmente atua como docente efetiva DE do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano (2018).

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são inúmeros!

Ao Senhor **DEUS**, fonte maior de força, por ter me presenteado com uma vida maravilhosa e por não ter me deixado cair nos momentos difíceis deste doutorado diante das adversidades;

A minha família pelo enorme carinho e pela incansável torcida;

A minha mãe por me ajudar a cuidar da minha família. Pela preocupação constante com o doutorado e dedicação intensa em absolutamente TODOS os momentos da minha vida, você é o meu porto seguro;

À minha filha, que ainda dentro do ventre contribuiu dando-me coragem e iluminando meus dias. Após nascer se tornou a minha companheirinha inclusive nas aulas e experimentos e das tantas, tantas noites em claro. Meu amor, minha menina;

Ao meu filho que ainda tão pequeno é o melhor ser humano que conheço. Você filho é um verdadeiro presente Deus, obrigada por não me deixar desanimar. Obrigada por tanta maturidade na minha ausência que foram tantas;

Ao meu esposo por ter sido incansável diante da sobrecarga que teve na minha ausência. Por cuidar lindamente da nossa família. Pela paciência, compreensão e torcida em todos os momentos. Pelo incentivo nos momentos que eu fraquejei. Por todo companheirismo em todas as fases na logística desta pesquisa e também por simplesmente existir na minha vida. Amo você;

A minha amiga de absolutamente todas as horas. **Laise** muito obrigada por todo apoio e pela sua especial amizade. Obrigada por fazer dos meus filhos os seus. Amo você!

Ao orientador Prof. Joselito Nunes Costa, pela orientação, oportunidade, disponibilidade e paciência. Obrigada pelo exemplo de pessoa e exemplo profissional. A cada reunião de orientação a minha admiração só aumentava. O senhor inspira e já inspirou muitas gerações;

À FioCruz em nome do Dr. Harrison Magdinier Gomes pelo apoio na análise molecular e exemplo de profissionalismo, pelos conselhos como pesquisador, meus mais sinceros agradecimentos. Obrigada pela possibilidade de poder me aprofundar no fascinante mundo da biologia molecular;

Ao professor Fernando Alzamora Filho por todo apoio na bacteriologia, pelo apoio na difícil logística do experimento e pelos ensinamentos. Sempre me encorajando nos momentos delicados. Seu apoio foi muito importante;

À equipe do Laboratório de Micobacterioses da Universidade Estadual de Santa Cruz – Ilhéus em nome dos discentes Bruno e Alana pela imprescindível cooperação e dedicação.

Vocês foram fundamentais;

À toda inspeção veterinária do estado da Bahia pela colaboração na aquisição da amostra;

A toda equipe dos estabelecimentos em questão e das feiras livres pela colaboração em cada detalhe das coletas;

Ao IF Baiano *campus* Itapetinga pelas adequações no trabalho que possibilitaram a conclusão do doutoramento.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas sugestões e contribuições apresentadas;

Aos colegas de doutorado e funcionários da UFBA;

À Universidade Federal da Bahia em especial toda a equipe do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos;

À FAPESB e CAPES, pelo importante auxílio financeiro;

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização do presente trabalho. A realização deste sonho é nossa. Meu muito obrigada!!!

*Dedico esta tese à minha família,
a qual tenho um amor incondicional e que faz cada dia da minha vida
melhor. Amo vocês demais!*

RESUMO

SANTOS, VASCONCELOS E.S. **AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E MOLECULAR POR *SPOLIGOTYPING* DA TUBERCULOSE A PARTIR DE BOVINOS E BUBALINOS ABATIDOS EM ABATEDOUROS OFICIAIS E EM VÍSCERAS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS LIVRES NO ESTADO DA BAHIA – BRASIL**, Salvador, 2019. 99p. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos)- Universidade Federal da Bahia- Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia.

O *Mycobacterium bovis* é o principal responsável pela tuberculose bovina e bubalina, doença zoonótica importante e com distribuição global. A investigação precisa dessa enfermidade, incluindo diagnósticos mais avançados, a exemplo do *Spoligotyping*, permite escolher as melhores estratégias de combate ao avanço da doença. Assim como ocorre em outros Estados, a compreensão da frequência e do padrão de distribuição da enfermidade na Bahia contribui para planejamento efetivo das ações de controle além de possibilitar o acompanhamento do andamento do programa nacional de controle e erradicação da TB e, neste contexto, os abatedouros frigoríficos exercem papel fundamental. Objetivou-se investigar a ocorrência de lesões sugestivas de tuberculose nas carcaças de bovinos e bubalinos inspecionadas em frigoríficos sob regime de inspeção oficial bem como identificar a presença de micobactérias nas mesmas e em vísceras (pulmão e fígado) comercializadas em feiras livres no estado da Bahia. Das 29 amostras de feira livre, 20 puderam ser analisadas, excluindo-se as autolisadas e contaminadas, e foi evidenciado crescimento em 25% (5/20) delas, mas não foi evidenciado BAAR, no entanto, o ambiente das feiras revelou-se com inapropriadas condições sanitárias. Foram investigadas 453.417 carcaças sob o serviço de inspeção estadual e federal dentre as quais 31 animais (0,007%) foram considerados suspeitos, de onde se coletou 49 lesões sugestivas de TB em animais oriundos de 17 municípios. Desses, 27 bovinos puderam ser analisados resultando em 74,1% (20/27) de crescimento em meio de cultura seletivo e 95% (19/20) foram BAAR. O DNA das colônias foi extraído por termólise. Todos os isolados foram submetidos ao *Spoligotyping* sendo 95% confirmados perfis de *M. bovis* (SB0120, SB0121, SB0852, SB0828, SB0295, SB0881, SB1648, SB6119, SB0140, SB1055) demonstrando-se a estirpe genômica SB0120 ser a mais prevalente e relacionada com casos de tuberculose humana indicando o potencial zoonótico desse perfil. O *Spoligotyping* permitiu atestar existência de infecções mistas, uma elevada diversidade dos padrões de estirpes dos isolados na Bahia e permitiu também a comparação com outros estados e países demonstrando nas amostras isoladas, linhagens nunca antes descritas no Brasil, sendo um dos isolados inédito na literatura. A análise da distribuição espacial mostrou-se uma ferramenta

importante para direcionamento das ações de defesa sanitária possibilitando recomendações mais específicas do programa nacional para controle e erradicação da tuberculose bovina no estado da Bahia.

Palavras chave: *M. bovis*, espoligotipos, mercados de rua.

ABSTRACT

SANTOS, VASCONCELOS E.S. BACTERIOLOGICAL AND MOLECULAR EVALUATION BY SPOLIGOTYPING OF TUBERCULOSIS FROM CATTLE AND BUFFALO SLAUGHTERED UNDER OFFICIAL INSPECTION SERVICE AND VISCERA COMMERCIALIZED IN STREET MARKET IN BAHIA - BRASIL, Salvador, 2019. 99p. Thesis (PhD in Animal Science in the Tropics) - Federal University of Bahia - School of Veterinary Medicine and Animal Science.

Mycobacterium bovis is the main responsible for bovine and buffalo tuberculosis, an important zoonotic disease with global distribution. The precise investigation of this disease, including more advanced diagnoses, like Spoligotyping, allows to choose the best strategies to combat the disease progression. As in other states, understanding the frequency and distribution pattern of the disease in Bahia contributes to effective planning of control actions, as well as monitoring the progress of the national TB control and eradication program and, in this context, slaughterhouses play a key role. The objective was to investigate the occurrence of lesions suggestive of tuberculosis in bovine and buffalo carcasses inspected in slaughterhouses under an official inspection regime, as well as to identify the presence of mycobacteria in the same and in viscera samples marketed in open fairs in the state of Bahia. Of the 29 free-trade samples, 20 could be analyzed, excluding autolysed and contaminated, and growth was shown in 25% (5/20) of them, but no evidence of BAAR was shown, however, the environment of the fairs was revealed with inappropriate sanitary conditions. A total of 453,417 carcasses were investigated under the state and federal inspection service, of which 31 animals (0.007%) were considered suspect, from which 49 lesions suggestive of TB were collected from animals from 17 municipalities. Of these, 27 cattle could be analyzed resulting in 74.1% (20/27) growth in selective culture medium and 95% (19/20) were BAAR. DNA from the colonies was extracted by thermolysis. All isolates were submitted to Spoligotyping with 95% confirmed profiles of *M. bovis* (SB0120, SB0121, SB0852, SB0828, SB0295, SB0881, SB1648, SB0140, SB0140, SB1055) showing the genotype strain SB0120

to be the most prevalent and related with cases of human tuberculosis indicating the zoonotic potential of this profile. Spoligotyping allowed to confirm the presence of mixed infections, a high diversity of isolate strains patterns in Bahia and also allowed comparison with other states and countries, showing isolated strains in Brazil, one of the isolated isolates in the literature. The analysis of the spatial distribution has proved to be an important tool for directing health protection actions, allowing for more specific recommendations of the national program for the control and eradication of bovine tuberculosis in the state of Bahia, Brazil.

Keywords: *M. bovis*, espoligotipos, street markets.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ADAB	Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bp	pares de bases
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	dinucleotídeotri-fosfatos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)
ESAT-6	“Early Secretory Antigenic Target 6-kDa”
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
HE	Hematoxilina – eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (“Human Immunodeficiency Virus”)
HPC	<i>Cetyridinium chloride monohydrate</i>
IgG	Imunoglobulina G
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPB70	Antígeno micobacteriano MPB70
MPB83	Antígeno micobacteriano MPB83
mPCR Chain	Reação em Cadeia da Polimerase multiplex (“Multiplex Polymerase Reaction”)
MHC Complex”)	Complexo Principal de Histocompatibilidade (“Major Histocompatibility Complex”)
MIRU – VNTR	“Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeat” - Unidades Repetitivas Intercaladas de Micobactéria com Variáveis Números de Repetição em Sequência

MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBCC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAOH	Hidróxido de sódio
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
NK	<i>Natural Killer</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	“Purified protein derivative”
RD	Região de Diferença
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIT	“Spoligotype international type”
TB	Tuberculose
TCC	Teste Cervical Comparativo
TCD4	Receptores envolvidos na restrição de MHC e ativação das células T
TCD8	Receptores envolvidos na restrição de MHC e ativação das células T
ZN	<i>Ziehl-Neelsen</i>

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 TUBERCULOSE BOVINA E BUBALINA	17
2.1.1 Agente etiológico	19
2.1.2 Patogênese e manifestação clínica	21
2.1.3 Avaliação macroscópica de lesões suspeitas de tuberculose	23
2.1.4 Epidemiologia da tuberculose	25
2.1.5 Impacto na Saúde Pública	27
2.1.6 Diagnóstico da tuberculose bovina	29
2.1.6.1 Tuberculinização.....	31
2.1.6.2 Diagnóstico sorológico.....	32
2.1.6.3 Diagnóstico histopatológico.....	33
2.1.6.4 Diagnóstico bacteriológico	34
2.1.6.5 Diagnóstico molecular por PCR.....	36
2.1.6.6 Spoligotyping	38
2.1.7 Controle e prevenção	39
2.2 FEIRAS LIVRES.....	40
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 HIPÓTESES	42
CAPÍTULO I - TIPIIFICAÇÃO GENÉTICA POR <i>SPOLIGOTYPING</i> E AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE <i>Mycobacterium bovis</i> EM LESÕES SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE EM BOVINOS E BUBALINOS ABATIDOS SOB O REGIME DE INSPEÇÃO OFICIAL NO ESTADO DA BAHIA – BRASIL.....	43
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO	56

AGRADECIMENTO.....	57
REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E OCORRÊNCIA DE LESÕES DE TUBERCULOSE BOVINA E BUBALINA EM CARÇAÇAS INSPECIONADAS E EM AMOSTRAS DE VÍSCERAS DE FEIRAS LIVRES NO ESTADO DA BAHIA-BRASIL.....	61
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAL E MÉTODOS.....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
AGRADECIMENTO.....	75
REFERÊNCIA.....	75
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é apontado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) como o setor que mais contribui para o fortalecimento da economia respondendo por 25% do produto interno bruto (BRASIL, 2018). A pecuária tem se expandido neste contexto significativamente nas últimas décadas e representa um fundamental setor na economia do país. No censo agropecuário mais recente em 2017, o Brasil possuía um rebanho bovino de 214.899.796 e bubalinos 1.381.395 cabeças, abrigando o Nordeste 27.736.607 e 130.065 destes, respectivamente. A Bahia foi detentora de 10.037.814 de bovinos e 21.729 de bubalinos o que corresponde cerca de 36,2% e 16,7% do efetivo da região (IBGE, 2018).

O setor pecuário enfrenta inúmeros desafios sanitários dentre os quais a febre aftosa, tuberculose (TB) e brucelose lideram a prioridade de prevenção devido ao impacto no comércio internacional, no entanto entre essas a tuberculose é a única que não possui vacina, o que dificulta a eficiência do seu controle (EMBRAPA, 2014), tornando-se assim uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, afetando uma ampla diversidade de espécies que inclui bovinos e bubalinos. A doença é causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) (VAN INGEN et al., 2012; VISAVET, 2018). De acordo com Morato (2007) é uma doença transmissível de grande importância em saúde pública e saúde animal, pois determina um quadro de doença com elevada gravidade no ser humano, e acarreta acentuadas perdas econômicas.

No que se refere aos prejuízos econômicos indiretos determinados por esta enfermidade, destacam-se a redução de 10 a 20% da produção de leite e do ganho de peso, alterações reprodutivas, condenação de carcaças e custos com tratamentos nos seres humanos. Muitas variáveis favorecem a transmissão desta doença no rebanho, tais como a elevada densidade, principalmente, entre os leiteiros, presença de um animal portador no rebanho e a resistência do microrganismo patogênico às condições ambientais favoráveis (OLIVEIRA et al., 2007). O tamanho do rebanho colabora na transmissão visto que quanto maior número de animais, maior a taxa de repovoamento, o que aumenta o risco do novo indivíduo introduzido ser positivo para tuberculose. A compra de novos animais, em especial, de propriedades de risco soma-se a essas outras variáveis (RAMÍREZ-VILLAESCUSA et al., 2010; SKUCE et al., 2012; BESSELL et al., 2012). Smith (2011) atribui o fato de a doença ser relatada em todo o mundo exatamente à movimentação animal.

O rastreamento de focos de tuberculose a partir de abatedouros como ferramenta adicional ao programa de controle da doença é uma estratégia interessante especialmente porque a inspeção sanitária permite também identificar casos de TB sem manifestação clínica. O Estado da Bahia apresenta uma vasta rede de abatedouros com inspeção oficial e desta forma, pode adotar essa metodologia para estudar a dispersão da doença e fornecer dados epidemiológicos para o controle dessa enfermidade nos rebanhos. Portanto, um sistema de vigilância desse modo é parte fundamental para o desenvolvimento da bovinocultura no Estado, o que aumenta a sua produtividade e competitividade no agronegócio brasileiro. Acrescenta-se, ainda, o fato do controle da TB nos bovinos tender a redução dos casos da enfermidade em seres humanos causada por *M. bovis*.

Apesar de muito já se ter pesquisado sobre a tuberculose esse tema torna-se cada vez mais desafiador. Considerando-se questões econômicas, sociais, epidemiológicas, ocupacionais e especialmente o relevante impacto da infecção na saúde única é importante a comprovação da referida doença por meio do isolamento, identificação e caracterização molecular do agente nos rebanhos bovino e bubalino. Considerando-se ainda a necessidade permanente da vigilância no Estado e diante do cenário relatado, propôs-se esta tese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TUBERCULOSE BOVINA E BUBALINA

Sendo considerada uma doença infecciosa de evolução crônica e com diagnóstico oficial exaustivo a tuberculose bovina (TB) possui significativa importância no Brasil e no mundo. Apresenta-se como uma relevante zoonose integrante da lista da OIE (Organização Mundial da Saúde Animal), e nos bovinos e bubalinos é causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis*, que pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBCC). Apesar de se saber que a doença está presente em todo o território nacional, ainda não se conhece verdadeiramente a sua prevalência e distribuição (RIBEIRO et al., 2003).

No aspecto econômico faz-se interessante destacar que a tuberculose é responsável pela diminuição da credibilidade e competitividade dos produtos oriundos de regiões contaminadas. Ademais, torna o produto resultante da pecuária vulnerável a barreiras sanitárias impostas pelo mercado internacional, gerando importantes prejuízos. Desta forma, um sistema de vigilância em abatedouros é essencial para contribuir com um programa de controle e erradicação e, por isso, os órgãos de pesquisa devem estar atentos a disponibilizar

tecnologias que amparem tais programas. Devido à cronicidade da doença, a inspeção em abatedouros permite ainda identificar casos sem manifestação clínica colaborando com dados epidemiológicos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), (2018) a tuberculose continua sendo em humanos uma das dez principais causas de morte e a principal causa letal por um único agente infeccioso estando, em muitos casos, a resposta dos países a este desafio acontecendo de forma inadequada. Produtos de origem animal contaminados e relações ocupacionais podem ser responsáveis pela disseminação da TB zoonótica, de ocorrência mundial com destaque na saúde pública. Nos países em desenvolvimento, é ainda mais pertinente esta questão pelo fato de nesses locais existirem poucas informações sobre o problema. No ano de 2001, o MAPA instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) devido a importância da TB bovina no Brasil com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal (BRASIL, 2001)

Quando infectado pelo *M. bovis*, o quadro clínico no ser humano é indistinguível do quadro causado pelo *M. tuberculosis* (POLLOCK e NEILL, 2002; WEDLOCK, 2002; DE LA RUA-DOMENECH, 2006; FIGUEIREDO et al., 2010). O relatório mais recente calcula que mais de 10 milhões de pessoas desenvolveram a doença no ano de 2017 estando entre estes, 8,5% enquadrados com tuberculose resistente a medicamentos. Neste mesmo ano a enfermidade causou cerca de 1,3 milhão de mortes entre as pessoas soropositivas para o HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (WHO, 2018).

Embora grandes avanços tenham ocorrido na ciência na área de diagnóstico, Ruggiero et al. (2007) destacaram a inexistência de um exame sensível, reprodutível e rápido para rotina da investigação da tuberculose em bovinos, sendo fundamental o investimento em pesquisas para a solução desse ponto crítico no combate à enfermidade. Portanto, a necessidade de sistemas de diagnósticos mais rápidos é evidente. Sendo uma doença negligenciada os estudos epidemiológicos são de importância crucial na identificação de sua fonte, controle e prevenção (GHAVIDEL et al., 2018). Nesse sentido a genotipagem molecular tem contribuído para melhor compreensão das infecções por *M. bovis*, o que proporciona aumento na eficiência dos programas de controle da doença (CAZOLA et al., 2015).

2.1.1 Agente etiológico

O gênero *Mycobacterium* é formado por bacilos aeróbios estritos, imóveis, álcool ácido resistentes, não formadores de esporos e desprovidos de cápsulas ou flagelos (SOUSA, 2000; PFYFFER, 2007), medem de 0,5 a 7,0 μm de comprimento e cerca de 0,3 μm de largura (BRASIL, 2006). Dentre as espécies de importância epidemiológica destacam-se aquelas pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (MTBC), que compreende: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii* e *M. microti*, (HUARD et al., 2003; COUSINS et al., 2003; PRODINGER et al., 2005; SKORIC et al., 2007; UEYAMA, 2013), ainda o *M. mungi* (ALEXANDER, 2010), *M. orygis* (VAN INGEN et al., 2012), *M. suricattae* (PARSONS et al., 2013) e *M. pinnipeddi* (UEYAMA, 2013) sendo este complexo responsável pela maioria dos casos de tuberculose humana e animal (MURAKAMI et al., 2009).

O principal agente etiológico envolvido na TB bovina é certamente o *M. bovis*, muito embora outros agentes do complexo possam ser capazes de infectar esta espécie como *M. caprae* ou *M. tuberculosis* (RODRIGUEZ et al., 2011; ROMERO et al., 2011). Ocepik et al. (2005) afirmam que apesar de raro, o *M. tuberculosis* pode ser transmitido via aerógena de humanos para bovinos e ainda segundo Grange (2001) os seres humanos portadores do bacilo *M. bovis* também, podem reinfetar os bovinos, principalmente em contato próximo das vias respiratórias.

Outro aspecto relativo ao *M. bovis* é que este já foi isolado de várias outras espécies que podem atuar como reservatórios da infecção, importantes na epidemiologia da doença (VISANET, 2018). A circulação das bactérias é apontada em sistemas multi-hospedeiros, incluindo espécies selvagens como texugos (*Meles meles*), javali (*Sus scrofa*) ou veado (*Cervus elaphus*) (ZANELLA et al., 2008; RICHOMME et al., 2010; PAYNE et al., 2013). Os texugos são considerados por Gallagher e Clifton-Hadley (2000) como super excretoras quando em estágio terminal da doença eliminando grandes quantidades do bacilo através da urina. Os cães apesar de poderem ser infectados, não desempenham papel significativo na propagação da doença para bovinos (THOMAS, 2018).

Somente em 1970, Karlson e Lessel propuseram a classificação do *M. bovis* (assim denominado) como espécie individual (FERREIRA NETO e BERNARDI, 1997). Anteriormente, o bacilo bovino era considerado uma variante do *M. tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. Embora seja primariamente um patógeno animal, ele também pode infectar e causar doença ao ser humano,

sendo assim uma importante ameaça à saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento (PRODINGER et al., 2002; HADDAD, MASSELOT e DURAND, 2004; BIET et al., 2005; BOSE, 2008).

Relativo aos aspectos bioquímicos, a parede celular das micobactérias é química e estruturalmente bastante complexa, particularmente rica em componentes lipídicos. Estes exercem influência na morfologia da bactéria conferindo uma barreira contra a ação dos agentes físicos e químicos do meio ambiente, como também influencia na patogenia das respectivas infecções (HONG e HOPFINGER, 2004; DUCATI, BASSO e SANTOS 2004). A abundante quantidade de ácido micólico dificulta a captação de nutrientes retardando o seu desenvolvimento (COLLINS et al., 1994; NEILL, BRYSON e POLLOCK., 2001; CORNER, GORMLEY e PFEIFFER, 2012) além de serem os principais responsáveis pela sua propriedade de álcool-ácido resistência, observada através da coloração *Ziehl-Neelsen* (ZN) (PFYFFER, 2007). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2006) destaca, no entanto, que características, a exemplo da tintorial, superpõem-se nos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* o que exige atenção para o diagnóstico diferencial entre esses agentes.

Também são características peculiares ao *M. bovis* um período de geração longo, demandando de 16 a 20 horas dependendo da oferta de oxigênio e de nutrientes, ultrapassando 12 semanas para crescer de maneira apropriada em meio de cultura adequado (CORNER, GORMLEY e PFEIFFER, 2012). A temperatura ótima de crescimento consoante a espécie pode variar entre 30°C e 45°C, e a gama de pH suportada é limitada entre 6 e 8, sendo o pH ótimo de 6,7 a 6,9 (PFYFFER, 2007). A espécie não é capaz de metabolizar glicerol em piruvato como fazem as outras espécies do MTBC. Desse modo, *M. bovis* cresce muito melhor na presença de piruvato como fonte de carbono (JORGE, 2011), como indicado pela análise da sequência genômica dessa espécie confirmando que os genes requeridos para a formação do piruvato não são funcionais (BARRERA et al., 2007; JORGE, 2011).

O bacilo, quanto à constituição gênica possui, no seu genoma 4.345.492 pares de base (pb) de comprimento com 3.952 genes capazes de codificar proteínas, sendo menor que o genoma de *M. tuberculosis* (4.411.532 pb para o isolado humano H37Rv) e um conteúdo médio de Guanina somado à Citosina de 65,63%. O sequenciamento do seu genoma foi concluído em 2003. *M. bovis* e *M.tuberculosis* possuem estreita relação filogenética cujos genomas, ambos descritos por completo, apresentam mais de 99,9% de similaridade tendo como principais eventos unidirecionais, as deleções (GARNIER et al., 2003; WHELAN et al.,

2010). Apesar desta alta equivalência, com uso de marcadores moleculares é possível distinguir os membros do MTBC (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014).

Alguns estudos chegaram a sugerir haver variação na suscetibilidade à infecção por *M. bovis* podendo esta variação acontecer dependendo da raça de bovino inclusive podendo variar com seu tipo produtivo do animal (AMENI et al., 2007; RICHARDSON et al., 2014). Além disso, alguns autores relatam que pode variar em virulência o genótipo dos isolados de campo de *M. bovis* nos bovinos (WRIGHT et al., 2013; WATERS et al., 2014).

Foi identificado em análises de genômica comparativa entre uma estirpe de *M. tuberculosis* e outra de *M. bovis* mais de 140 genes com presença facultativa e que estão relacionados com diferenças no fenótipo, hospedeiro preferencial e virulência. Diversos desses genes ocorrem em regiões de diferenciação (RD) que foram eliminadas em determinadas espécies (PYM et al., 2002). Na formação dos loci RD estão envolvidas alterações como erros na replicação de DNA, movimento de elementos genéticos móveis, ou recombinação entre fragmentos adjacentes de DNA homólogo, com perda da sequência interveniente (HUARD et al., 2006). No caso da cepa vacinal de *M. bovis* BCG ocorre a deleção da RD1, demonstrando um papel importante desta região na virulência das cepas patogênicas do complexo (PYM et al., 2002).

A bactéria é sensível a agentes desinfetantes como fenólicos, formólicos, álcoois e, em especial, ao hipoclorito de sódio, sendo eficientes dependendo da correta utilização. Também são destruídos pela pasteurização (ARAÚJO et al., 2005; COSTA, 2008) luz solar direta em ambiente seco, assim como calor úmido a 60°C (ROXO, 1996; DUCATI, BASSO e SANTOS, 2004). No que diz respeito à resistência, o agente se caracteriza por conseguir sobreviver na presença de ácidos, álcalis e desinfetantes, a exemplo do amônio quaternária e clorexidine (ARAÚJO et al., 2005; COSTA, 2008), além de resistir bem no ambiente, principalmente em locais úmidos e ao abrigo da luz solar, a exemplo de pastos, estábulos, no esterco por até 2 anos, na água por até 1 ano, e 10 meses nos produtos de origem animal contaminados. Ela também se mostra moderadamente resistente ao calor, à dessecação e a uma das principais drogas antituberculosas, a pirazinamida (ABRAHÃO, 1999; PARSONS et al., 2002; BELAS et al., 2011).

2.1.2 Patogênese e manifestação clínica

Diversos fatores influenciam na manifestação da tuberculose no hospedeiro dentre os quais a resposta imune, via de infecção e virulência do microrganismo que determinam ainda

a sobrevivência e multiplicação do mesmo no animal (COLLINS, 2001; AYELE et al., 2004). Geralmente a doença nos bovinos possui um período de incubação longo, com quadros pouco uniformes e uma evolução demorada (DUARTE et al., 2007). Causa uma importante broncopneumonia (CONSTABLE et al., 2016). Embora a literatura relate acometimento da doença em animais acima de 36 meses (GRISI FILHO et al., 2011) bezerros também podem ser acometidos podendo se tornar uma fonte importante de infecção (ALZAMORA FILHO et al., 2014). Esporadicamente, pode assumir um caráter agudo e curso progressivo rápido (RUGGIERO et al., 2007). Marcondes et al. (2006) comentam que já foi demonstrado em modelos animais que um bacilo em suspensão pode causar a infecção. A inalação de aerossóis contaminados com o microrganismo é responsável (OLIVEIRA et al., 2008; LAVAGNOLI et al., 2010) por aproximadamente 90% das infecções em bovinos e bubalinos (CORREIA e CORREIA, 1992; BEER, 1998; MARQUES, 2008). Com relação à manifestação sistêmica, a enfermidade pode assumir forma miliar, quando ocorre de maneira abrupta e maciça ou protraída, acometendo os diversos tecidos pelas vias linfática ou sanguínea, sendo esta última a mais comum (BRASIL, 2006).

Microrganismo intracelular facultativo (SKORIC et al., 2007) quando inalado é fagocitado geralmente por macrófagos alveolares onde poderá se multiplicar dando forma a lesões denominadas tubérculos ou poderá ser eliminado (MARCONDES et al., 2006). Não havendo destruição do bacilo e havendo multiplicação, eles serão atraídos por fatores quimiotáticos liberados pelos próprios bacilos. Essa multiplicação cessa cerca de 2 a 3 semanas após a inalação do agente infeccioso e é caracterizada por resposta imune mediada por células e reação de hipersensibilidade tardia. Neste momento, o hospedeiro destrói seus próprios tecidos através da necrose de caseificação para conter o crescimento intracelular da bactéria. Com mediação dos linfócitos T ocorre a migração de novas células de defesa, culminando com a formação de granulomas (CORREIA e CORREIA, 1992; BEER, 1998). Embora a via de entrada mais importante seja a inalatória, a via oral também deve ser considerada (DOMINGO, VIDAL e MARCO, 2014).

A lesão caracteriza-se por nódulos de diâmetro entre 1,0 a 3,0 cm em média, podendo ser confluentes, aspecto purulento ou caseoso, de cor branca, cinza ou amarelado, de consistência firme e inodoro. Os locais mais comumente encontrados com lesões durante a necropsia ou inspeção de carcaças em abatedouros frigoríficos são os pulmões e os linfonodos retrofaríngeos, bronquiais e mediastínicos (BRASIL, 2006; OIE, 2009), além de serosas e fígados, contudo, pode causar lesões em todos os órgãos, já havendo sido descrita no sistema nervoso central, articulações, diafragma, subcútis, ovários, útero e genitália masculina.

Normalmente são firmes, com centro caseoso e quando calcificados rangem ao corte com faca como se contivessem areia (CORREIA e CORREIA, 1992).

No aspecto da microscopia do granuloma tuberculoso, trata-se de uma estrutura complexa e de composição principalmente celular, consistindo geralmente de um centro necrótico, circundado por densas camadas de células, como os linfócitos (T e B), neutrófilos e fagócitos mononucleares em diversos estágios de desenvolvimento, sendo, por último, circundado por uma firme cápsula de tecido fibroso (AYELE et al., 2004; HOPE; VILLARREAL-RAMOS, 2008).

Tratando-se da resposta imune adquirida é essencial a produção do Interferon (IFN- γ) produzido do perfil Th1 estimulado pela apresentação de antígenos às células T CD4+ e CD8+ no aspecto de moléculas MHC II e I, respectivamente, valendo destacar função de proteção das células TCD4+ no granuloma (HOGAN et al., 2007). Estas células são produtoras de IFN- γ no granuloma, agindo no controle do crescimento bacteriano intracelular, enquanto os linfócitos T CD8+ agem, principalmente, na lise dos macrófagos infectados (POLLOCK & NEILL, 2002). Outras citocinas estão envolvidas neste cenário. A interleucina 12 (IL-12), também potencializa a produção de IFN- γ , tanto estimulando as *células natural killer* (NK), quanto induzindo a polarização Th1 que eleva a produção desta citocina. Também citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) Na regulação do processo infeccioso, a IL-10 inibe a resposta celular através da subregulação da produção de IL-12 (ABBAS; LICHTMAN e PILLAI, 2008; HOPE; VILLARREAL-RAMOS, 2008).

2.1.3 Avaliação macroscópica de lesões suspeitas de tuberculose

Os achados macroscópicos de lesões sugestivas de tuberculose bovina acontecem durante o abate dos animais. No Brasil, a inspeção das carcaças é regulamentada pelo RIISPOA “Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal” da Divisão de Normas Técnicas do Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, segundo decreto de 29 de março de 1952 alterado pelos decretos de 1962, 1994 e 1997 (BRASIL, 1997). Em março de 2017 passou por um extenso trabalho de atualização que teve início em 2007 com envolvimento de diversos setores da sociedade, inclusive tendo passado por consulta pública recebendo mais de 3,6 mil sugestões de alterações.

A revisão do RIISPOA inclui itens que antes não tratava o regulamento, como questões relativas ao meio ambiente, à sustentabilidade e ao bem-estar animal. Trata também de assuntos administrativos e de legislação internacional e atualizou valores de multas em situações diversas. Passou ainda a contemplar novas tecnologias, incluindo a biologia molecular além de outras padronizações de procedimentos técnicos. O novo decreto contém 542 artigos contra 952 do anterior. O artigo que trata sobre o destino dos bovinos com tuberculose passou a ser o Art. 171 que descreve os diferentes destinos que devem ser dados às carcaças, tais como: pode ser condenada completamente, pode ser destinada à esterilização pelo calor e pode ainda ser liberada após condenadas às áreas atingidas. Nos casos de partes da carcaça ou dos órgãos serem contaminados por material tuberculoso, estas partes devem também ser condenadas (BRASIL, 2017).

O papel do abatedouro frigorífico é fundamental tanto no rastreamento de focos da doença como na identificação das lesões macroscópicas sugestivas de TB durante a rotina de inspeção, funcionando como barreira de proteção para o consumidor. O RIISPOA determina que os animais levados ao abate, que estejam com provas de tuberculinização positivas, devem ser separados e sacrificados apenas no final da matança (BRASIL, 1997).

Esta primeira informação é reforçada por Jorge (2011) no Mato Grosso do Sul que afirma que a identificação de um único bovino com lesão tuberculosa no abatedouro contribui para localização de um foco. A inspeção permite, inclusive, a identificação de animais que não apresentam sinais clínicos da doença. Com a implantação do programa de controle e erradicação da tuberculose bovina estes estabelecimentos tornam-se essenciais para o controle, atuando como importantes “sentinelas epidemiológicos”, colaborando na estratégia de vigilância e erradicação da doença (WEDLOCK et al., 2002, COSTA 2008; LOPES, 2008).

Tratando do tema a nível internacional, o procedimento de monitoramento em frigoríficos demonstrou em países como Austrália, Estados Unidos, Canadá e Cuba ser de fundamental importância na erradicação da enfermidade em virtude da eficiência na identificação e na rastreabilidade da origem de animais com lesões compatíveis com tuberculose (RODRIGUEZ, 2005; COSTA et al., 2010).

Apesar do papel de destaque desses estabelecimentos, Corner (1994) ressalta que, no que diz respeito à epidemiologia para se identificar a real prevalência seria necessário somar a estes casos de lesão macroscópica, os casos sem lesões aparentes. O autor lembra que, em razão da não visibilidade de algumas lesões, os índices devem ser bem superiores, girando em torno de 53% de impossibilidade de detecção de tuberculose na rotina da inspeção. Deve-se

ainda estar atento para o fato do exame *post mortem* ser “inspetor dependente”, isto é, depende do critério da inspeção e dos sítios observados (MCKINLEY et al., 2018). O exame deve ser o mais preciso possível. Esta informação está relacionada com o que afirmam Shitaye et al. (2006) e Wilsmore e Taylor (2008) quando mencionam que a inspeção passa a ser mais criteriosa nos casos de abates sanitários de animais positivos aos testes intradérmicos.

Neste contexto ainda Baptista, Moreira e Santos (2004) reafirmam que os índices observados em abatedouros são subestimados. Para que se aproxime de uma prevalência mais real Corner (1994) argumenta que fazendas com amostras representativas ou abrangendo a totalidade dos animais podem proporcionar boas estimativas da frequência. O autor relata que o exame cuidadoso de seis pares de linfonodos do pulmão, da cabeça e do mesentério pode estabelecer o diagnóstico em 95% dos bovinos com lesões macroscópicas. É importante lembrar que em infecções recentes não haverá lesões macroscópicas e que o diagnóstico definitivo da tuberculose é com auxílio de métodos laboratoriais.

2.1.4 Epidemiologia da tuberculose

São descritas inúmeras espécies como hospedeiros deste agente além dos humanos e bovinos como os búfalos, texugos, veados, gambás, cães, entre outros, (BRONWEN et al., 2018; OIE, 2018) sendo alguns hospedeiros terminais enquanto outros desenvolvem uma doença autolimitante. Os animais silvestres desempenham importante papel na epidemiologia da tuberculose, especialmente em locais onde a doença está controlada ou erradicada, representando uma ameaça para a reintrodução, uma vez que reservatórios silvestres não são controlados (BIET et al., 2005; OIE, 2018).

Campos (2008) afirma que a enfermidade possui distribuição em todos os continentes. Furlanetto et al. (2012) reforça a idéia que é predominante em países que possuem sistema de criação de forma intensiva ou ainda que possuam ações de controle sanitário recentes. Outros fatores interferem na disseminação da doença como: manejo, idade, raça, introdução de novos animais, presença de animais de corte e leite no mesmo rebanho e tamanho dos rebanhos entre outros (OMER et al., 2001; PERREZ et al., 2002).

Baseado no teste de tuberculinização, um estudo brasileiro no ano de 2004 evidenciou que a prevalência variou de 0,4% a 3,6% nas regiões Sudeste e Norte, respectivamente (ROXO, 2005; KANTOR; RITACCO, 2006). Outro estudo, no estado da Paraíba no período

de 2008 a 2009, revelou foco de 0,57% das propriedades analisadas e 0,25% de animais positivos também através de tuberculização (FIGUEIREDO et al., 2010). No estado do Espírito Santo foram examinados 32.052 bovinos e foi demonstrado 0,51% animais reativos ao agente (LAVAGNOLI et al., 2010). No Mato Grosso, Néspoli (2012) estimou a prevalência de 1,3% de tuberculose nos rebanhos.

Já em estudo realizado a partir de carcaças por Araújo et al. (2005), em abatedouros-frigoríficos, o autor revelou uma prevalência de tuberculose bovina de 0,17% em Minas Gerais; 5,16% no Pará e 0,64% no Rio Grande do Sul. O autor atribui esta diferença de achados ao grau de desenvolvimento regional, principalmente no que se refere ao estabelecimento de medidas sanitárias no rebanho.

Dados divulgados pelo MAPA reafirmam a distribuição da tuberculose pelo território nacional. A pesquisa contemplou os estados da Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rondônia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Sergipe, São Paulo e Tocantins (Tabela 1).

Tabela 1. Prevalência de focos (propriedades com pelo menos dois animais positivos) e prevalência de animais (fêmeas acima de 24 meses) positivos para tuberculose, ao teste de tuberculização por Unidade Federativa.

UF	Trabalho de campo	Prevalência focos	Prevalência animais
BA	2008 a 2010	1,6	0,21
DF	2003	0,36	0,05
ES	2012 a 2014	7,6	0,7
GO	2013 a 2014	3,43	0,3
MG	2013	4,25	0,56
MS	2009	1,3	0,035
MT	2009	1,3	0,12
PE	2014	2,87	0,62
PR	2005 a 2007	2,15	0,42
RO	2009 a 2010	2,3	0,12
RS	2013	2,8	0,7
SC	2012	0,5	0,06
SE	2012	0,22	1,03
SP	2011	9	1,3
TO	2015	0,009	0,162

Fonte: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/tb-3-estudos-prevalencia.pdf>

2.1.5 Impacto na Saúde Pública

O alemão Alexander Von Humboldt sugeriu no século XVIII uma conexão entre o ambiente, o ser humano e os animais (WULF, 2016). No século seguinte um outro alemão, Virchow, usou o termo zoonose para descrever infecção aos humanos pela *Trichinella spiralis* a partir do consumo de carne suína, estabelecendo dessa forma uma relação mais próxima das medicinas humana e veterinária (SCHULTZ, 2008). O envolvimento dessas áreas traz um conceito de Saúde Única, que apesar de negligenciado, objetiva a prevenção com envolvimento de aspectos diversos em ações multidisciplinares (WIELER, 2014; JANES et al., 2012). A tuberculose bovina por ser uma zoonose se encaixa na proposta desse conceito como "Saúde Única" (OIE, 2018).

Neste aspecto, o *M. bovis* possui uma ampla capacidade de infectar diversas espécies de mamíferos, sendo uma das maiores entre todos os patógenos conhecidos. O ser humano pode, portanto, contrair a doença de diferentes animais e igualmente transmitir-lhes a infecção (LILENBAUM, 2000; PINTO, 2003). A doença em pessoas quando causada pelo *M. bovis* é denominada de tuberculose zoonótica. Já o *M. tuberculosis* possui um espectro mais restrito de hospedeiros, além do ser humano (NEILL, SKUCE e POLLOCK, 2005), podendo ser o agente ocasional em bovinos que vivem em contato próximo com seres humanos (MURAKAMI et al., 2009). Existe ainda casos de co-infecção no ser humano pelos dois microrganismos (LAGO; NAVARRO, 2013).

A primeira comprovação global da transmissão da doença dos bovinos ao ser humano ocorreu decorrente da ingestão de alimentos e foi relatada por Ravenel em 1902 que isolou *M. bovis* em gânglios de uma criança falecida de meningite tuberculosa nos EUA. Este isolamento se deu por inoculação em bovinos, os quais em menos de 30 dias vieram a óbito. Os resultados da necropsia afirmaram que a causa da morte tinha sido tuberculose (SOUZA et al., 1999). Muitos anos após a identificação relatada, a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é importante para entender e controlar a propagação do *M. bovis* entre os bovinos e controlar a transmissão para humanos em áreas onde ambos os tipos de tuberculose coexistem (RAMOS et al., 2018). Apesar do número de casos identificados ser pequeno na carga total de tuberculose humana, acabar com a epidemia da tuberculose até 2030 é uma meta da Estratégia da TB da OMS e neste contexto de erradicação, é fundamental combater a referida doença (WHO, 2018).

Wedlock et al. (2002) salientam que em torno de 5 a 10% da incidência da doença em humanos são decorrentes da infecção por *M. bovis*. No início do século XX, foi

primeiramente descrita este tipo de infecção, onde se estimou que fosse causa de 10-18% de todos os casos da doença, existindo uma associação entre o número de casos humanos e a população bovina local. Naquele momento, calculou-se que 70 a 80% do total de tuberculose dos gânglios cervicais em crianças e 20% dos casos de tuberculose renal no ser humano foram causados pelo *M. bovis* (ABRAHÃO, 1999). No Brasil, a primeira publicação na literatura nacional sobre o tema foi em 1938, momento em que o agente foi isolado por Torres e Pacheco (SOUZA et al., 1999). Pesquisa realizada em San Diego nos Estados Unidos da América apontou a crescente incidência da doença causada pelo *M. bovis*, com 45% de todos os casos de TB cultura positiva em crianças entre 1994 e 2005 (RODWELL et al., 2008).

Em alguns países a tuberculose zoonótica pode chegar a 10% dos casos (OIE, 2018). Como média mundial El-Sayed et al. (2015) apontam 3,1%. Na América Latina, os registros são escassos e estimativas indicam 2% dos quadros pulmonares e 8% dos casos extrapulmonares (KANTOR; RITACCO, 1994; LATINI et al., 1990; USABIAGA, 2001). Nos países onde não existe o controle da tuberculose bovina, a infecção pelo *M. bovis* ocorre principalmente em jovens pela ingestão ou manipulação de leite cru contaminado (HARDIE; WATSON, 1992; NEIL et al., 1992), sendo que na Europa, a reativação endógena de infecções adquiridas na infância ou na juventude representam o fator mais comum deste tipo de doença (HARDIE; WATSON, 1992).

De acordo com Carvalho et al. (2015), o desconhecimento em relação à real prevalência da TB zoonótica advém de diversos fatores, principalmente em decorrência do diagnóstico bacteriológico em humanos geralmente estar limitado à baciloscopia e ao cultivo em meio *Lowenstein-Jensen* que contém glicerol, no qual o *M. bovis* apresenta crescimento disgônico porque utiliza preferencialmente o piruvato como uma fonte de carbono (GORMLEY et al., 2014). Nos países em desenvolvimento, é pertinente esta questão pelo fato de nesses locais existirem poucas informações sobre o problema, necessitando de maiores investimentos nos aspectos relevantes à saúde pública veterinária em relação à infecção humana por *M. bovis*, principalmente com relação aos grupos ocupacionais (WHO, 2009).

Rocha et al. (2011) entendem que *M. bovis* e *M. tuberculosis* provocam doença indistinguível clínica, radiológica e patologicamente. Um fator agravante é que laboratorialmente, devido a aparente similaridade também no tratamento e prognóstico, é muito comum ocorrerem falhas no diagnóstico diferencial entre as micobactérias, principalmente nos países onde se julgava erradicada a tuberculose bovina (ORDÓÑEZ et al., 1999; PINTO, 2003). Essa discriminação se torna possível pelo emprego de meios de cultivo específicos como o *Stonebrink* isento de glicerol permitindo crescimento do *M. bovis*

(KANTOR; RITACCO, 1994; LATINI et al., 1990; USABIAGA, 2001). Ueyama (2013), ainda relata a falta de métodos simples de diferenciação e como relatado por Lago e Navarro (2013) a falta de disponibilidade de meios com piruvato.

Vale lembrar que, entretanto, existem razões para diferenciação dos agentes, a exemplo da resistência do *M. bovis* à pirazinamida (droga antituberculose de 1ª linha) (PARSONS et al., 2002; WHO, 2018) e reintrodução da doença por esta espécie em países nos quais ela estava praticamente erradicada. Ainda é importante reforçar que a falha no tratamento favorece o aumento de cepas multidroga resistentes. A Organização Mundial de Saúde afirma que o problema da resistência ainda é uma crise de saúde pública. A estimativa mais recente é que, no mundo em 2017, 558 mil pessoas desenvolveram tuberculose resistente à rifampicina, e destas, 82% eram TB multidroga resistentes (WHO, 2018).

Na análise da tuberculose nos humanos sem diagnóstico diferencial para espécie envolvida têm-se os dados a seguir: em 2009 a incidência global da doença foi de 9,4 milhões, com mortalidade de 1,3 milhões de pessoas sendo cerca de 85% dos casos na Ásia e África. Dentre este total, 1 a 1,2 milhões estavam coinfectados pelo HIV (11 a 13%). Estes valores correspondem a uma redução significativa, relativamente aos últimos anos. Três anos depois o relatório da OMS reuniu dados de 178 dos 197 Estados-membros da organização e relata que no Brasil foi registrado mais de 71 mil casos de tuberculose (WHO, 2013). O dado mais atual aponta que no mundo 10,0 milhões de pessoas entre estas, mais de 1,0 milhão de crianças, desenvolveram a doença em 2017 e cerca de 1,3 milhão de mortes aconteceram em pacientes HIV positivos (WHO, 2018).

A relevância da TB no contexto da saúde pública é contínua, sendo destaque desde o início da Comunidade Econômica Europeia nos anos de 1964 onde as medidas iniciais para controlar esta doença já foram propostas naquela ocasião (VISANET, 2018). Em todo o mundo, a tuberculose é uma das 10 principais causas de morte e a principal causa por um único agente infeccioso (acima de HIV / AIDS) e ainda milhões de pessoas continuam a adoecer com tuberculose a cada ano (WHO, 2018).

2.1.6 Diagnóstico da tuberculose bovina

O diagnóstico da tuberculose bovina apesar de inúmeras pesquisas neste cenário, ainda é um grande desafio. Bon et al. (2018) reafirmam a necessidade de desenvolvimento de novos testes aplicáveis ao diagnóstico da enfermidade no rebanho bovino antes de renovar os esforços para eliminá-la. Em uma ampla revisão sistemática da literatura científica sobre

métodos de diagnósticos para tuberculose bovina, foram identificados 14 tipos distintos de testes na atualidade. Foi observado neste estudo também que os valores de corte para definir uma resposta positiva aos testes muitas vezes eram variáveis. Os autores apontaram fatores muito difíceis de controlar que influenciam no desempenho dos testes: processos biológicos, como patogênese da doença (afetando sensibilidade) e interferência por colonização de micobactérias ambientais (afetando especificidade) (DOWNS et al., 2018)

Os métodos para diagnóstico da TB podem ser categorizados em diretos e indiretos. Os primeiros são capazes de identificar a presença da bactéria ou parte dela tendo, neste caso, como exemplos, a bacteriologia e os ensaios moleculares. Os métodos indiretos investigam a resposta ao agente etiológico no hospedeiro, seja ela imunológica humoral ou celular, sendo exemplificados, respectivamente pelos testes imunoenzimáticos e pela tuberculinização (BRASIL, 2006).

Ao referir-se ao tema da importância de qualidade e padronização de meios de diagnóstico, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento atribui em parte este fato à responsabilidade da eficácia de um programa nacional de combate a qualquer doença (BRASIL, 2001), além de ser fundamental uma rede laboratorial que possa disponibilizar o suporte técnico e um diagnóstico rápido, específico e sensível (COSIVI et al., 1998). Os testes no Brasil estão em sintonia com os padrões internacionais, porém o MAPA pretende atualizar e melhorar o padrão de diagnóstico à medida que novos testes forem surgindo (BRASIL, 2001). Parra et al. (2008) afirmam ser necessário desenvolver sistemas de diagnóstico que são diretamente aplicáveis de amostras biológicas colhidas nos abatedouros.

Apesar do grande avanço da ciência na área de diagnóstico, Ruggiero et al (2007) apontam não haver um exame ideal para rotina do diagnóstico da tuberculose em bovinos, sendo fundamental ampliação do investimento na área de pesquisa para a solução desse ponto crítico no combate à enfermidade. Eles também consideram que os achados clínicos não devem ser desprezados e sim interpretados conjuntamente com os resultados laboratoriais. Outro aspecto levantado por Cosivi et al. (1998) e Roring et al. (2000) é que nenhum dos métodos de diagnóstico pode ser empregado isoladamente, devendo sempre se fazer uso de complementariedade de técnicas, a fim de se obter uma informação eficaz e completa.

A evidência clínica da doença nos bovinos raramente é encontrada, mesmo em casos avançados de infecções crônicas. Os sinais clínicos são bastante variados e, por muitas vezes, não estão presentes (OIE, 2009). Os animais podem apresentar dispnéia, tosse, mastite, caquexia progressiva e infertilidade, entre outros (SMITH, 2006; BRASIL, 2006). Pode-se à palpação perceber aumento de linfonodos chegando, até mesmo, a causar obstrução de vias

aéreas, trato digestório ou vasos sanguíneos. O envolvimento do trato digestório algumas vezes se manifesta por diarreia intermitente intercalada por períodos de constipação. Caquexia acentuada e dispnéia podem ocorrer durante a fase terminal (OIE, 2009). Alguns ainda apresentam debilidade, anorexia, sinais respiratórios, apetite seletivo e temperatura oscilante (SMITH, 1993; RADOSTITS et al., 2002). Torna-se importante mencionar o papel do exame clínico como diagnóstico complementar nos casos de animais anérgicos ao teste da tuberculina na busca, segundo Radostitis et al. (2002) e Smith (2006), por tosse seca, curta e repetitiva embora Ramos et al. (2015) afirmem que em países com programa de erradicação eficiente, os animais infectados são identificados mais cedo e, dessa forma, as infecções sintomáticas se tornam menos comuns.

2.1.6.1 Tuberculinização

O exame oficial preconizado pelo PNCBET para o diagnóstico *in vivo* da tuberculose é a tuberculinização, uma reação de hipersensibilidade tardia, imunologicamente específica, mediada por linfócitos T sensibilizados que possibilita a identificação de animais infectados, estando descrito sua realização e interpretação no regulamento técnico (BRASIL, 2006). Os indivíduos previamente expostos ao bacilo normalmente mostram-se reagentes (MONAGHAN et al., 1994). Embora o teste tuberculínico seja usado para o controle e erradicação da tuberculose bovina, resultados confiáveis não são alcançados em alguns animais infectados (PARDO, LANGONI e MENDONCA, 2001). Além disso, devido a diversos fatores, incluindo a movimentação dos animais e a frequência de realização de testes nos rebanho, alguns animais nunca serão testados durante sua vida útil (MITCHELL et al., 2006)

O método consiste na inoculação de um extrato da cultura do agente no animal suspeito (RADOSTITS et al., 2002) com formação de edema mais ou menos pronunciado (NEIL et al, 1994). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017) descreve que podem ser realizados três testes: teste da prega caudal, usado somente para triagem em gado de corte; teste cervical simples, utilizado como prova de rotina em gado de leite; e/ou teste cervical comparativo, que pode ser utilizado como prova confirmatória naqueles animais que reagiram aos outros testes ou como prova única em animais de rebanhos com risco de reações inespecíficas. Os animais positivos aos testes de tuberculina devem ser sacrificados.

O exame indireto pelo uso do PPD (Derivado Protéico Purificado) apresenta algumas limitações podendo levar a interpretações errôneas, a exemplo de falsos positivos para reações

inespecíficas pelo contato prévio com outras micobactérias ambientais ou interpretação de falso negativo decorrente de infecção recente, já que a resposta imunológica pode aparecer até 50 dias após o contato, mau estado geral de saúde, imunossupressão pós-parto ou até mesmo anergia (MONOGHAN et al., 1994). As reações cruzadas com outros patógenos não relacionados dá-se pelo *Corynebacterium* ou *Nocardia spp.* (ROMERO et al., 1999). Deve-se também estar atento para a dessensibilização que ocorre após a tuberculinização, visto que os animais apresentam sua capacidade de responder a novos testes diminuída, sendo recobrada após um período de 42 a 60 dias. Resultados falso-negativos podem ocorrer ainda por variações inerentes ao próprio teste ou por variações na leitura e interpretação do mesmo (MONOGHAN et al., 1994).

O programa determina que bovinos e bubalinos devam ser identificados, devem possuir idade igual ou superior a seis semanas e o teste deve ser realizado por médico veterinário habilitado ou médico veterinário oficial (BRASIL, 2017). A distribuição de tuberculinas será controlada pelo serviço veterinário oficial, podendo ter acesso às mesmas, apenas médicos veterinários habilitados, instituições de ensino ou pesquisa e os responsáveis técnicos de Granjas de Reprodutores Suínos Certificadas (GRSC) (BRASIL, 2017). É preciso reconhecer que apesar das limitações, ainda não existe um ensaio mais satisfatório *in vivo* que a tuberculinização. Por conseguinte, é altamente provável que esta técnica continue a ser o teste de triagem para o gado de criação ainda por um tempo considerável (GOOD et al., 2018).

2.1.6.2 Diagnóstico sorológico

Dentre as possibilidades de diagnósticos sorológicos existe a quantificação da citocina denominada interferon gama (IFN- γ). Estes testes sanguíneos podem ser mais específicos para a infecção por *M. bovis* do que os testes baseados em tuberculina (DOWNS et al., 2016). Este ensaio baseia-se na resposta imune de células em cultura de sangue total estimuladas com antígenos do bacilo através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (WOOD et al., 1990). A ausência de detecção de IFN- γ caracteriza a negatividade do animal para infecção pelo *M. bovis*, uma vez que os linfócitos de bovinos não infectados não produzem esta citocina de forma específica (WOOD e JONES, 2001). Este ensaio tem sido avaliado como um diagnóstico primário em muitos países (WOOD, 2001), inclusive no Brasil. Trata-se de um método sensível que pode detectar a infecção em várias espécies de animais e mais

precocemente que os testes tuberculínicos, possuindo sensibilidade e especificidade de 85% e 93%, respectivamente (WEDLOCK et al, 2002; RUA-DOMENECH et al., 2006).

Como vantagens importantes estão à estimulação de linfócitos *in vitro* que, conseqüentemente, não alteram o estado imunológico do animal, além de não ser necessário esperar 60-90 dias para repetir o teste quando o teste inicial não for conclusivo, uma limitação distinta dos testes cutâneos (LILENBAUM, 2000). O teste para a detecção da infecção em bovinos já está disponível comercialmente com a denominação BOVIGAN. Ele utiliza como antígenos o PPD bovino e o aviário, embora outros antígenos, a exemplo da ESAT-6 e do CFP-10 já tenham sido usados (WOOD e JONES, 2001). Por outro lado, o ensaio INF γ tem algumas limitações em relação à infraestrutura de laboratório e técnicos especializados, além do custo dos *kits* comerciais. Deve-se estar atento também para o intervalo de tempo a partir da colheita da amostra até o processamento do material, podendo, no entanto, ser usado a partir de um ponto de vista estratégico para os programas de controle (LOPES et al., 2012).

Em geral, a resposta de anticorpos séricos acontece em estágios mais avançados da doença (POLOCK et al., 2005). Neste sentido, o ensaio de ELISA para diagnóstico da tuberculose, pode ser utilizado como um exame complementar aos demais ensaios, especialmente na identificação de animais anérgicos (WHO, 1994). O método imunoenzimático permite detectar a presença de anticorpos IgG (SANT'ANNA, 2001) contra antígenos micobacterianos no soro de portadores de TB medindo a referida ligação. Os antígenos normalmente utilizados são a PPD isoladas ou associadas a antígenos purificados a partir de *M. bovis* estando os purificados representados pelo complexo AG85 que retrata a maior parte das proteínas secretadas. O fato de anticorpos dirigidos contra os antígenos poderem estar presentes em indivíduos não infectados leva a resultados falso positivos (MEDEIROS et al., 2010). A proteína MPB70 que representa aproximadamente 10% da PPD tem sido identificada como uma célula B alvo em bovinos tuberculosos e também como uma proteína razoavelmente específica. A homóloga da MPB70, a MPB83 também tem sido utilizada (WIKER, 2009).

2.1.6.3 Diagnóstico histopatológico

O exame histopatológico mostra-se importante como ferramenta complementar aos achados macroscópicos e pode ser aplicado principalmente em regiões de alta prevalência da doença por ser de conclusão mais rápida para um diagnóstico presuntivo (CORNER, 1994). Eles exigem grandes concentrações de bactérias além do fato de outros microrganismos

produzirem lesões semelhantes às ocorridas na tuberculose bovina por *M. bovis* (HAAGSMA, 1995; ZANINI et al., 2001).

De forma preliminar, pode ser realizado coloração pela técnica de *Ziehl-Neelsen* (ZN), método microscópico direto do esfregaço de amostras frescas com o objetivo de pesquisar a presença de bacilos álcool-ácidos resistentes. É considerada uma técnica barata, prática, rápida e útil, mas que se apresenta inespecífica e pouco sensível (20-70%), uma vez que é necessário um grande número de organismos na amostra para a positividade do esfregaço (LISLE et al., 2002; AYELE et al., 2004). A técnica torna-se mais eficaz quando realizada diretamente da cultura.

Na coloração por hematoxilina-eosina (HE) ocorre acúmulo de macrófagos com formação de células gigantes de Langhans, circundadas por linfócitos, plasmócitos, fibrose periférica e necrose caseosa central, o granuloma (NEILL et al., 1994). Coelho (2002) classifica o granuloma em completo ou incompleto, sendo que o primeiro deve apresentar todos os elementos ditados acima e o incompleto será assim chamado quando não houver necrose caseosa, células gigantes ou macrófagos. Será típico quando existirem células gigantes e, atípico, quando estas faltarem.

2.1.6.4 Diagnóstico bacteriológico

É consenso entre os pesquisadores que o método diagnóstico definitivo da tuberculose é o isolamento do agente, chamado também de "padrão-ouro" (ARANAZ et al., 1996; ALMEIDA, SOARES e ARAÚJO, 2004; BRASIL, 2017) que pode ser realizado a partir de lesões ou secreções de animais suspeitos. É essencial para definir as condições ideais para a cultura, que se leve em conta, a concentração de bacilos na amostra e os riscos de contaminação, uma vez que estes fatores podem influenciar a seleção de procedimentos de descontaminação e a duração da incubação (GORMLEY, et al., 2014).

O cultivo do *M. bovis* deve ser executado em laboratório do grupo de risco nível III (BRASIL, 2006) em estufa a 37°C, incubados em meio inclinado com pH entre 6,8 e 7,0. As bactérias do gênero *Mycobacterium* crescem em meios que contém verde malaquita para inibir contaminantes e compostos de ovo e amido enriquecidos com asparagina. O glicerol favorece o crescimento de todos os outros microrganismos do gênero, porém, dificulta o do *M. bovis*. Em meios de cultura à base de ovo, o crescimento revela colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo-pálida, com borda irregular e superfície granular.

As micobactérias também crescem em meios à base de ágar; nestes as colônias são volumosas no centro, brancas, finas, ásperas e planas (CORNER, 1994), a exemplo do Middlebrook 7H11 e B83 (HAAGSMA, 1995). No meio *Stonebrink -Leslie*, as colônias se apresentam brancas e pequenas com bordas irregulares e superfície granular, sendo observadas a partir do 28º dia de incubação, sendo este meio o mais recomendado para o isolamento do *M. bovis* (MOTA, LOBATO e ASSIS, 2001). O procedimento chega a requerer entre 3 e 12 semanas de incubação, com um tempo médio de divisão entre 12-24 horas (AYELE et al., 2004) e de acordo com Corner (1994) sem influência da adição de 5% de CO₂, visto que ele observa ainda que concentrações maiores podem ser até prejudiciais ao crescimento. Recomenda-se a semeadura nos meios de cultura *Lowestein-Jensen* e *Stonebrink-Lesslie* (RUGGIERO et al., 2007).

Apesar de ser método padrão, o isolamento traz alguns questionamentos, a exemplo da baixa sensibilidade, dispensa tempo para finalizar o diagnóstico e necessitar de uma grande quantidade de bacilos viáveis. É interessante verificar ainda que a quantidade e viabilidade dos bacilos, ainda é uma etapa influenciada pelos métodos drásticos de descontaminação do material que, além de destruir os contaminantes, também podem causar a morte de algumas bactérias, o que pode comprometer o isolamento (HAAGSMA, 1995; WARDS *et al.*, 1995; ZANINI *et al.*, 2001). Um dos principais métodos de descontaminação na Medicina Veterinária é o método de Petroff que utiliza hidróxido de sódio (NaOH). Mencionado por Ambrosio et al. (2008), outras substâncias também têm sido utilizadas para o mesmo fim: Ácido sulfúrico, ácido oxálico (OA), cloreto de benzalcônio (AC), fosfato trissódico e laurel sulfato de sódio, cloreto de sódio, e o equivalente de cloreto de 1 - hexadecilpiridínio (HPC) ou cloreto de cetilpiridínio (CPC).

Após executada a técnica do isolamento, segue a identificação completa do agente. Almeida, Soares e Araújo et al. (2004) relatam que o reconhecimento deve ser realizado por meio de provas bioquímicas, análise química dos grupos funcionais de ácidos micólicos que se encontram na parede das micobactérias ou técnicas de biologia molecular, os quais segundo Lisle et al. (2002) requerem um tempo adicional para sua total realização. Especificamente para bioquímica, podem-se levar mais quatro semanas na verificação das provas, além do fato da técnica demandar um crescimento abundante de cultura pura e madura, o que não é comum tratando-se de *M. bovis* (COLLINS et al., 1994). Como resultado, espera-se sensibilidade à hidrazida, positividade para atividade de urease, hidrolisar moderadamente o Tween 80 e negatividade nos testes de catalase e arilsulfatase (AYELE et al., 2004). Ainda, o aumento da quantidade de niacina e redução de nitrato a nitrito são

observados quando a bactéria cultivada é *M. tuberculosis*, mas não ocorre quando se trata do *M. bovis*, permitindo, a diferenciação. Também o teste de sensibilidade ao antibiótico pirazinamida contribui para diferenciação entre eles, sendo *M. bovis* resistente a este antimicrobiano (PARSONS et al., 2002; BELAS et al., 2011).

2.1.6.5 Diagnóstico molecular por PCR

Tem sido descrito diversos testes de diagnóstico molecular para a tuberculose (FUVERKI et al., 2008; FURINE et al., 2013). Tais descrições contemplam métodos comerciais ou não. Em virtude da longa demanda de tempo para isolamento e identificação do agente, os procedimentos moleculares tornam-se cada vez mais promissores. No aspecto da bacteriologia ainda há de se considerar as perdas dos bacilos viáveis nos processos de descontaminação (PINTO et al., 2002; SALAZAR, 2005; FRAGUÁS, 2008) onde a biologia molecular assume o papel de metodologia diagnóstica auxiliar.

Ruggiero et al. (2007) entendem que a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) surge sem intenção de substituir a clássica investigação bacteriológica, mas tem o objetivo precípuo de auxiliar os exames laboratoriais de tuberculose, esclarecendo a natureza das lesões sugestivas, especialmente de carcaças sequestradas em frigoríficos. A redução do tempo de exame dessas lesões colabora para o controle da doença no ser humano e nos animais auxiliando na identificação dos fatores de risco, que desempenham importante papel na epidemiologia da doença.

O uso da reação em cadeia da polimerase teve início em 1986 por Mullis e Faloona, tendo sido reconhecida como importante avanço científico por permitir inúmeras vezes e em pouco tempo a amplificação *in vitro* de uma sequência alvo de ácido nucleico através do uso da enzima Taq polimerase, tornando possível a identificação do DNA bacteriano (ANDRADE, 1993). Os *primers* agem como iniciadores e garantem a especificidade da reação. Os fragmentos amplificados são evidenciados por eletroforese em gel com uso de corantes ou isótopos radioativos ou fluorescentes e, ainda, empregando-se métodos enzimáticos ou de quimiluminescência (ABRAHÃO, 1999; ANDRADE, 1993; COLLINS et al., 1994).

Os autores relatam que a PCR se mostra superior ao cultivo do microrganismo no reconhecimento do agente e as colônias podem ser identificadas no mesmo dia em que o crescimento nos meios de cultura são detectados. Isso ocorre em contra ponto às provas bioquímicas, possibilitando sua utilização como ferramenta auxiliar à inspeção sanitária ou

certificando que caso seja necessário o sacrifício de animais com suspeita de tuberculose, esse procedimento seja realizado com a confirmação do diagnóstico (ZANINI et al., 2001). A literatura varia quanto à sensibilidade relatando de 50 a 100% relacionados a falhas da execução da técnica, contudo a especificidade é alta variando de 95 a 100% (NOORDHOEK et al., 1994). Altwegg (1995) relata que a PCR por ser um método sensível, é capaz de detectar a micobactéria mesmo em procedimentos ineficientes de extração de DNA especialmente quando se trata de cultura pura de microrganismos.

Com o avanço da ciência, a técnica também passou a ser realizada diretamente das amostras mostrando-se ser um método auxiliar mais rápido, sensível, específico e que dispensa a grande quantidade e viabilidade dos bacilos se realizado direto da amostra. Para atingir o objetivo da identificação da micobactéria dois pontos são relevantes: a escolha correta dos *primers* e a qualidade da técnica de extração do DNA (ZUMÁRRAGA et al., 2001). No que se refere à extração e purificação do DNA cromossomal do bacilo, Acha e Szyfres (2001) acreditam ser uma etapa limitante ao uso da PCR em amostras clínicas devido à complexidade da parede celular. Ainda, dentre as dificuldades na biologia molecular neste contexto, a contaminação merece destaque. Relatos de contaminação cruzada chegam até 65%, podendo ser reduzidas a menos de 1% em laboratórios bem controlados e fiscalizados (KANDUMA, MCHUGH e GILLESPIE, 2003).

Ribeiro (2006) menciona ser fortemente perceptível a anuência de pesquisadores na aplicação de PCR no diagnóstico e tipificação da tuberculose bovina, no entanto, quando se trata de extrair DNA diretamente sobre homogeneizados de tecidos a sensibilidade do método é reduzida, e este fato limita sua difusão como método diagnóstico de rotina.

Quando se precisa fazer diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis*, a PCR *multiplex* se mostra uma técnica interessante (ARRÁIZ, 2007; CORSET, 2007; KEE et al., 2009). Hernandez et al. (2003) destacam ainda a economia de tempo e de reagente. Parsons et al. (2002) explicam em quais situações deve-se pesquisar tal diferença especialmente entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*: quando é importante fazer a distinção entre as fontes zoonóticas ou fontes humanas da doença e também para fins epidemiológicos e de tratamento.

Em meio a inúmeros protocolos de amplificação de DNA, Warren (2006) utiliza técnica baseada em regiões de diferença (RD1, RD1mic, RD2seal, RD4, RD9 e RD12) que foi desenvolvida para a diferenciação de *M. canettii*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis* e *M. bovis BCG*. O tamanho da respectiva amplificação dos produtos resultantes da PCR *multiplex* corresponde à presença dos diferentes

membros do complexo *M. tuberculosis*. Ueyama (2013), atenta para as interpretações baseadas nestes estudos. PCR *multiplex* em tempo real também são utilizados baseados nestas RD (HALSE et al., 2011).

Como opção à PCR simples ou *multiplex* existem diversos ensaios moleculares a exemplo do *nested*-PCR que é mais sensível e baseia-se na re-amplificação de um fragmento amplificado em uma primeira reação com *primers* internos (ZANDEN, 2002). Outra alternativa é o estudo de uma proteína de choque térmico (*heat-shock*) de 65 KDa com PCR e análise do polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP) (TAYLOR et al., 1997). Ainda não muito disseminada, existe a técnica do microarranjo do DNA (DNA microarray) que imobilizam sequências de DNA (GINGERAS, GHANDOUR e WANG, 1998) ou espectrometria de massa (LAGO; NAVARRO, 2013) dentre outras.

2.1.6.6 *Spoligotyping*

Spoligotyping é um método baseado na reação em cadeia da polimerase para genotipagem de estirpes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBCC). Os padrões da técnica podem ser representados em termos absolutos, e os resultados facilmente compartilhados entre pesquisadores permitindo a alimentação de grandes bancos de dados nacionais e internacionais. Após a padronização do método, milhares de isolados foram analisados, possibilitando uma visão global da diversidade das estirpes do complexo. O método é rápido, facilmente reprodutível e possui alto rendimento para pesquisas de epidemiologia molecular (ZHANG et al., 2010; SMITH, 2011) Os membros do complexo MTBC são muito semelhantes dentro da sua família no que diz respeito à sequência de nucleotídeos divergindo de acordo com Smith (2006) apenas em 0,05% em seu genoma, apesar de diferentes em aspectos como patogenicidade, morfologia, resistência e outros.

Segundo Cazola et al. (2015) os dados da genotipagem molecular permitem compreender a distribuição das estirpes em uma determinada área e como os focos múltiplos ocorrem. A técnica baseia-se na amplificação por PCR do DNA no locus de região de repetição direta (*direct repeat* - DR), exclusivo do genoma de micobactérias do CMT, para detectar a presença ou ausência de espaçadores nesse locus identificando o polimorfismo, a ordem dos espaçadores é aproximadamente a mesma em todos os isolados. A detecção é realizada pela hibridação dos espaçadores a uma membrana, usando um *miniblotter* (ARANAZ et al., 1996; KAMERBEEK et al., 1997). A determinação do spoligotipo mais comum de *M. bovis* é a fundamental para encontrar a fonte da infecção e

controlar a doença (GHAVIDEL et al., 2018). Ramos et al. (2014) acrescentam que a técnica revela possíveis ligações entre animais doentes, detectando surtos e ainda permite uma maior compreensão da evolução e estrutura populacional do *M. bovis*.

Esse método é adequado inclusive para regiões de baixa prevalência de focos de tuberculose, permitindo ainda o reconhecimento da movimentação do agente etiológico o que é essencial para um efetivo controle e erradicação da doença (ZANINI et al., 2001; RODRIGUEZ, 2005). O *Spoligotyping* dispõe de inúmeras vantagens como não requerer investimento excessivo, não necessitar de um programa específico para interpretação dos dados, permite a análise de um grande número de estirpes e um bom nível de diferenciação para a análise epidemiológica, é de fácil diferenciação das espécies do complexo *M. tuberculosis* pela simples análise visual da membrana. Outra vantagem é a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* pela ausência ou presença, respectivamente, dos espaçadores 39 a 43 (RORING et al., 2002; RODRIGUEZ, 2005).

2.1.7 Controle e prevenção

No Brasil, o método habitual de controle da TB consiste na realização da prova de tuberculina e no abate sanitário. O PNCEBT também determina a aquisição de animais de propriedades livres da doença, adoção de instalações bem ventiladas com exposição direta à luz solar, incluindo higiene de bebedouros e cochos de alimentação. Também está descrito a restrição do consumo do leite de vacas reagentes, controle da saúde dos trabalhadores das propriedades, permanente monitoramento dos rebanhos bovinos através da detecção de lesões tuberculosas pela inspeção sanitária durante o abate dos animais, além do controle de trânsito dos mesmos (BRASIL, 2006). Corner (1994) ressalta que para o estabelecimento dos programas de controle é importante ser considerado o grau de incidência da doença nos rebanhos, não deixando de ressaltar a possibilidade do diagnóstico equivocado colaborando com a negligência dos casos. Medidas sanitárias integradas envolvendo os diferentes segmentos da saúde humana e veterinária podem proporcionar uma ampla abordagem da epidemiologia da tuberculose e atenuar a incidência da doença nos animais e no ser humano (JORGE, 2011).

2.2 FEIRAS LIVRES

O fenômeno da feira-livre é bastante antigo e possui importância econômica na região onde está situada como também importância social e cultural. De acordo com Verdana (2004), as feiras já existiam na Grécia e na Roma desde a antiguidade com o intercâmbio de variadas mercadorias entre povos de diferentes regiões, normalmente situadas em locais de informalidade.

No Brasil, Almeida (2009) relata o surgimento das feiras-livres trazidas pelos portugueses desde o período colonial. Segundo Sayuri (2010) o significado desta modalidade vai além do econômico tendo se tornado pontos turísticos para quem visita os municípios brasileiros. É um tipo de mercado varejista ao ar livre, de periodicidade semanal organizada normalmente pelas prefeituras com objetivo de ficar disponível para a população e voltada para a distribuição local de gênero alimentício e produtos básicos. Os comerciantes possuem lugar fixo com horários de funcionamento fiscalizados (MASACARENHAS e DOLZANI, 2008)

No interior das feiras a relação comercial pode ser bastante informal além de técnicas tradicionais de exposição e venda, com possibilidades de barganha e permutas dos produtos exibidos (MORAIS e ARAÚJO, 2006). Este ambiente proporciona uma relação diferenciada entre o consumidor e o feirante. Entre os comerciantes muitas vezes este espaço possibilita uma convivência muito aproximada além das questões técnicas.

Entre os produtos alimentícios comercializados estão as carnes e vísceras comestíveis de diferentes espécies animais. Estes alimentos possuem exigência para seu estoque, armazenamento e comercialização. Conforme Portaria nº 304 de 1996, do MAPA, o centro da musculatura da peça deve ser mantido a temperatura não superior a 7 °C, para que possa estar adequado à comercialização (BRASIL, 1996). Diniz et al. (2013) ao analisarem o comércio de carnes em feiras livres relataram a inexistência de fiscalização sanitária além do fato dos feirantes revelarem realizar abate clandestino. Os autores observaram ainda inadequadas condições de transporte, conservação e exposição das carnes. Outros fatores que podem atingir a saúde do consumidor também foram notados como a negligência dos feirantes em relação às medidas de higiene pessoal e manipulação dos alimentos. A comercialização de carnes na feira livre representa riscos à saúde do consumidor, o que constitui um problema sanitário e de saúde pública, que deve sofrer intervenção por parte dos órgãos fiscalizadores (SILVA FILHO et al., 2018)

Ribeiro et al. (2003) reafirmam a importância das feiras no que diz respeito à disponibilidade de alimentos para consumidor e geração de emprego e renda especialmente no aspecto da agricultura familiar. Os autores afirmam não haver apoio governamental nestes locais. Estudos realizados na Bahia em ambientes de feiras não diferem da realidade nacional, reafirmando as precárias condições de infraestrutura, higiene, organização, qualidade de vida, e saneamento básico. Os autores relatam a existência de lixo e fezes a céu aberto, armazenamento inadequado de vísceras, precárias condições de trabalho, circulação de animais, pouquíssima disponibilidade de água e destacam possibilidade de transmissão de zoonoses (MARTINS e LUCENA, 2002; ALMEIDA e PENA, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de lesões sugestivas de tuberculose nas carcaças de bovinos e bubalinos inspecionadas em abatedouros frigoríficos sob regime de inspeção oficial, bem como identificar a presença de micobactérias nas mesmas e em amostras de vísceras comercializadas em feiras livres no estado da Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a ocorrência de lesões sugestivas de tuberculose nas carcaças de bovinos e bubalinos inspecionadas em frigoríficos sob regime de inspeção oficial;
- ✓ Proceder através do cultivo, o isolamento de micobactérias a partir de lesões sugestivas de TB detectadas durante a inspeção de bovinos e bubalinos abatidos em abatedouros frigoríficos no estado da Bahia e a partir de amostras de vísceras comercializadas em feiras livres;
- ✓ Identificar os isolados e avaliar a diversidade genética do *M. bovis* das amostras analisadas nas regiões da Bahia em estudo, através de técnica molecular de *Spoligotyping* contribuindo para diminuir a escassez de dados e colaborar na melhor compreensão da epidemiologia das infecções causadas por este agente;

✓ Realizar análise de distribuição espacial mapeando os municípios detectados como foco de TB das regiões estudadas para assim poder contribuir na implementação de medidas de intervenção mais focais para prevenção e controle da doença no estado.

4 HIPÓTESES

A tuberculose bovina e bubalina ainda está disseminada no estado da Bahia e a detecção de amostras em abatedouro frigoríficos é uma excelente ferramenta para o programa nacional de controle e erradicação da doença. Existe uma diversidade genética de *Mycobacterium bovis* desconhecida na Bahia, sendo a técnica do *Spoligotyping* bastante elucidativa para conhecimento da epidemiologia molecular dessa bactéria. Pode-se desta forma, contribuir subsidiando as estratégias de controle e de erradicação da doença no estado. Nas feiras livres há circulação de micobactérias em vísceras comercializadas diretamente ao consumidor final, destacando-se a importância zoonótica desta enfermidade.

CAPÍTULO I

Artigo será submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Qualis A2

**TIPIFICAÇÃO GENÉTICA POR *SPOLIGOTYPING* E AVALIAÇÃO DA
DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE *Mycobacterium bovis* EM LESÕES SUGESTIVAS DE
TUBERCULOSE EM BOVINOS E BUBALINOS ABATIDOS SOB O REGIME DE
INSPEÇÃO OFICIAL NO ESTADO DA BAHIA – BRASIL**

**GENETIC TIPPING BY SPOLIGOTYPING AND EVALUATION OF SPACE
DISTRIBUTION OF *Mycobacterium bovis* IN SUGGESTIVE INJURIES OF
TUBERCULOSIS IN CATTLE AND BUFFALO SLAUGHTERED UNDER THE
OFFICIAL INSPECTION SERVICE IN THE STATE OF BAHIA – BRAZIL**

Evelin S.V. dos Santos¹ *, Fernando Alzamora Filho², Bruno R. dos Santos², Alana Venâncio da Silva², Harrison Magdinier Gomes³, and Joselito N. Costa⁴

¹Universidade Federal da Bahia, Instituto Federal de Ciência e Tecnologia Baiano, s/n, km 02, Av. Júlio José Rodrigues - Clerolandia, Itapetinga - BA, 45700-000* Autor para Correspondência E-mail: evelin_vet@hotmail.com

² Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16 - Salobrinho, Ilhéus - BA, 45662-900, Brasil.

³Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Dept. Mycobacteriosis, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, Cruz das Almas, BA 44380-000, Brasil.

RESUMO

O *Mycobacterium bovis* é o principal agente responsável pela tuberculose bovina e bubalina. A investigação precisa dessa enfermidade, com conhecimento da sua distribuição geográfica incluindo diagnósticos mais avançados como o *Spoligotyping*, possibilita a adesão de melhores estratégias de combate a doença. Neste contexto, os abatedouros frigoríficos exercem papel fundamental. Sendo assim, o presente trabalho objetivou investigar a presença de micobactérias, genotipar suas estirpes e avaliar a distribuição espacial dos casos de tuberculose a partir de lesões sugestivas nas carcaças de bovinos e bubalinos inspecionadas em frigoríficos sob regime de inspeção oficial no estado da Bahia. Foram investigados 453.417 animais dentre os quais 31 (0,007%) casos foram suspeitos de tuberculose os quais eram provenientes de 17 municípios baianos. Resultaram 74,1% de crescimento em meio de cultura seletivo e destes, 95% foram categorizados como BAAR. Todos os isolados foram submetidos à espoligotipagem e 95% confirmados como *M. bovis* (SB0120, SB0121, SB0852, SB0828, SB0295, SB0881, SB1648, SB6119, SB0140, SB1055) demonstrando-se a estirpe genômica SB0120 ser a mais prevalente, e está relacionado com casos de tuberculose

humana por *M. bovis* indicando o potencial zoonótico desse perfil. O estudo possibilitou atestar a diversidade registrada nos padrões dos isolados da Bahia, além da existência de infecções mistas e permitiu ainda identificar linhagens nunca antes descritas no estado com destaque para um padrão inédito no Brasil (SB6119 e SB0852 respectivamente). O perfil EG-BA13 não se encontra descrito em nenhum banco de dados. A análise da distribuição espacial mostrou-se uma ferramenta importante para direcionamento das ações de defesa sanitária possibilitando ações mais específicas do programa nacional para controle e erradicação da tuberculose no estado da Bahia.

Palavras-chave: SB0120; spoligotipos; análise espacial

ABSTRACT

Mycobacterium bovis is the main agent responsible for bovine and bubaline tuberculosis. The precise investigation of this disease, with knowledge of its geographical distribution including more advanced diagnoses such as Spoligotyping, enables the adhesion of better strategies to fight the disease. In this context, slaughterhouses play a fundamental role. Thus, the present work aimed to investigate the presence of mycobacteria, genotype their strains and evaluate the spatial distribution of tuberculosis cases from suggestive lesions in carcasses of bovine and buffalo inspected in slaughterhouses under official inspection regime in the state of Bahia, Brazil. A total of 453,417 animals were investigated, of which 31 (0.007%) cases were suspected of tuberculosis coming from 17 Bahia municipalities. 74.1% growth resulted in selective culture medium and 95% of these were categorized as BAAR. All isolates were subjected to spoligotyping and 95% confirmed as *M. bovis* (SB0120, SB0121, SB0852, SB0828, SB0295, SB0881, SB1648, SB6119, SB0140, SB1055) showing the genomic strain SB0120 to be the most prevalent, and is related to cases of human tuberculosis by *M. bovis* indicating the zoonotic potential of this profile. The study made it possible to attest the diversity registered in the patterns of the isolates of Bahia, besides the existence of mixed infections and also to identify strains never before described in the state, highlighting an unprecedented pattern in Brazil (SB6119 and SB0852 respectively). The EG-BA13 profile is not described in any database. The spatial distribution analysis proved to be an important tool for directing health defense actions, enabling more specific actions of the national program for tuberculosis control and eradication in the state of Bahia, Brazil.

Keywords: SB0120; spoligotypes; spatial analysis

INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é apontado pelo Ministério da Agricultura como o setor que mais contribui para o fortalecimento da economia, respondendo por 25% do produto interno bruto (BRASIL, 2018). No censo agropecuário mais recente, o Brasil consta com um rebanho bovino de 214.899.796 e bubalinos 1.381.395 cabeças, abrigando a Bahia, 10.037.814 e 21.729 das categorias citadas, respectivamente (IBGE, 2018). A pecuária tem se expandido neste contexto significativamente nas últimas décadas, representando um fundamental setor na economia do país apesar dos desafios sanitários que enfrenta, dentre os quais a tuberculose (TB) que detém importante impacto no comércio internacional exigindo que seu produto possua elevada qualidade e baixo risco sanitário. O fato dessa enfermidade não possuir vacina acentua a dificuldade na eficiência do seu controle (EMBRAPA, 2014).

A doença acarreta em acentuadas perdas econômicas é causada por micobactérias que pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e afeta uma ampla diversidade de espécies incluindo os bovídeos e o ser humano (VanIngen, 2012; Visavet, 2018). A TB continua sendo uma zoonose de grande importância em saúde pública, pois determina um quadro de doença com elevada gravidade no ser humano estando adequada na proposta do conceito de "Saúde Única". O dado mais atual aponta que no mundo 10 milhões de pessoas já tenham sido afetadas ranqueando a referida doença entre as 10 principais causas de morte e a principal causa por um único agente infeccioso (WHO, 2018). A diferenciação entre o agente causador em humanos (*M. bovis* e/ou *M. tuberculosis*) é importante para entender e controlar a propagação do *M. bovis* entre os bovinos e controlar a transmissão para humanos em áreas onde ambos os tipos de tuberculose coexistem (Ramos et al., 2018).

A caracterização genética e demográfica da enfermidade contribui para o melhor entendimento de como a doença é distribuída. O papel do abatedouro frigorífico é fundamental tanto no rastreamento de focos da doença como na identificação das lesões macroscópicas sugestivas de TB durante a rotina de inspeção, funcionando como barreira de proteção para o consumidor. Jorge (2011), afirma que a identificação de um único bovino com lesão no abatedouro contribui para localização de um foco. Uma combinação que tem se mostrado eficiente para o diagnóstico da doença, neste contexto, é o isolamento bacteriológico clássico, com posterior identificação por métodos moleculares.

Embora grandes avanços tenham ocorrido na ciência na área de diagnóstico, Ruggiero et al. (2007) destacaram a inexistência de um exame sensível, reprodutível e rápido para rotina da investigação da TB em bovinos, sendo fundamental o investimento em pesquisas

para a solução desse ponto crítico no combate à enfermidade. Portanto, a necessidade de sistemas de diagnósticos mais rápidos é evidente. Sendo uma doença negligenciada os estudos epidemiológicos são de importância crucial (Ghavidel et al., 2018). Nesse sentido a genotipagem molecular, a citar o *Spoligotyping*, tem contribuído para melhor compreensão das infecções por *M. bovis*, distribuição das estirpes em uma determinada área e como os focos múltiplos ocorrem, o que proporciona aumento na eficiência dos programas de controle da doença (Cazola et al., 2015).

A técnica do *Spoligotyping* baseia-se na amplificação por PCR do DNA no locus de região de repetição direta (*direct repeat - DR*), exclusivo do genoma de micobactérias do CMT, para detectar a presença ou ausência de espaçadores nesse locus identificando o polimorfismo, a ordem dos espaçadores é aproximadamente a mesma em todos os isolados. A detecção é realizada pela hibridação dos espaçadores a uma membrana, usando um *minibloter* (Kamerbeek et al., 1997). A determinação do spoligotipo mais comum de *M. bovis* é fundamental para encontrar a fonte da infecção e controlar a doença (Ghavidel, et al., 2018). Ramos et al. (2014) acrescentam que a técnica revela possíveis ligações entre animais doentes, detectando surtos e ainda permite uma maior compreensão da evolução e estrutura populacional do *M. bovis*.

Diante do contexto apresentado, a combinação da realização de inquéritos epidemiológicos a partir de abatedouros com a genotipagem do *M. bovis* funcionam como um importante indicador da prevalência da TB e podem contribuir para um melhor conhecimento da dinâmica da infecção, fato essencial para melhoria na gestão eficaz dos sistemas de controle da referida enfermidade. Desta forma, o presente trabalho objetivou investigar a presença de micobactérias, genotipar suas estirpes através da técnica de *Spoligotyping* e avaliar distribuição espacial dos casos de tuberculose a partir de lesões sugestivas nas carcaças de bovinos e bubalinos inspecionadas em abatedouros frigoríficos sob regime de inspeção oficial no estado da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

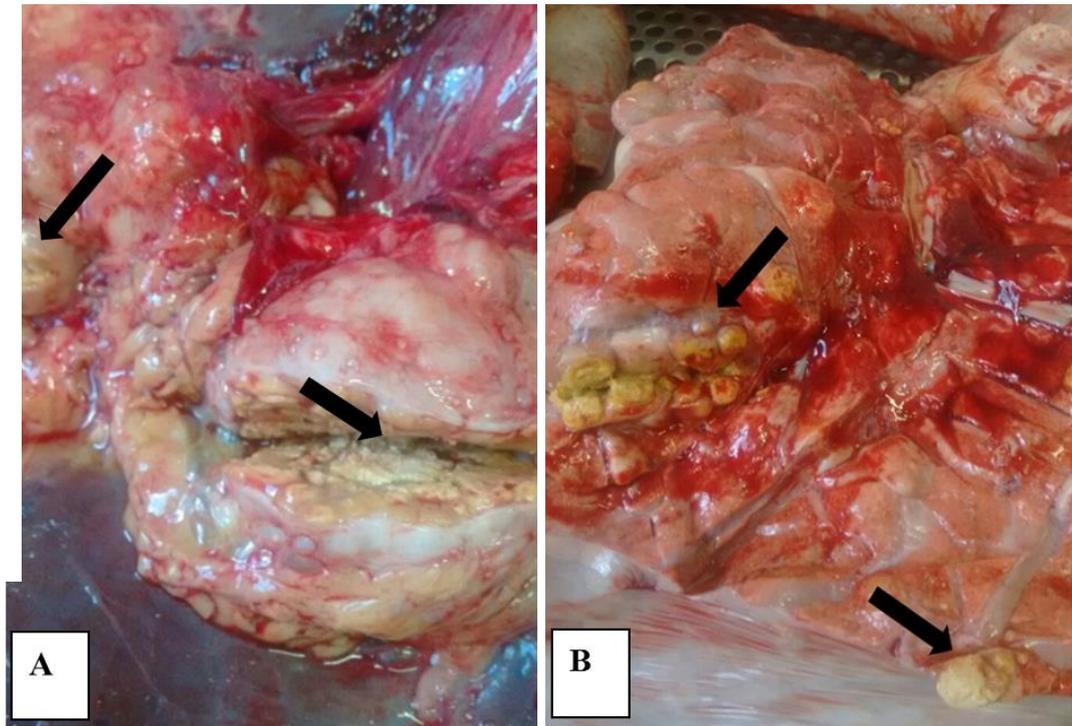
Durante o período de janeiro de 2016 a outubro de 2018 foram inspecionadas um total de 453.417 carcaças entre bovinos e bubalinos. Participaram do estudo 11 abatedouros-frigoríficos com serviço de inspeção oficial (estadual e federal) e o abate ocorreu conforme as normas do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Foram objetos deste estudo lesões suspeitas de tuberculose, oriundas de 17

municípios, nas quais se procedeu à análise bacteriológica em duplicata. Nas que foram observados crescimento característico de *Mycobacterium*, foi realizada a coloração por Ziehl – Neelsen (ZN) (Brasil, 2008) e o DNA extraído por lise térmica (Shi, 2018). Em seguida o DNA resultante foi conduzido ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (LABMAM) na Fundação Oswaldo Cruz – FioCruz no Rio de Janeiro para análises moleculares por *Spoligotyping*.

A tipificação pelo *Spoligotyping* foi realizada como o descrito por Kamerbeek et al. (1997). A amplificação da região direta foi realizada num volume final de 25µL com 0,2mM contendo dNTP (10mM Tris-HCl, pH 8.0; 50mM KCl), 1.5mM MgCl₂, 20pmol de primers para cada iniciador (Dra biotinilado e DRb) e 1 U de Taq DNA polimerase e 10ng de DNA. O ciclo da PCR foi compreendido por desnaturação a 96°C por três minutos, 30 vezes do ciclo de amplificação, 96°C por um minuto, 55°C por um minuto e 72°C por trinta segundos. Utilizou-se como controle positivo o DNA de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* Moureau H37Rv e água ultra-pura como controle negativo. Os produtos da PCR foram hibridados em membrana contendo 43 oligonucleotídeos de sequências espaçadoras conhecidas. Após incubação com estreptavidina-peroxidase, os espaçadores foram detectados por quimioluminescência. A nomenclatura adotada para os espoligotipos obtidos foi a mesma que se encontra disponível no Mbovis.org (<http://www.mbovis.org/>) e os perfis comparados com os disponíveis no mesmo site e também no SITVIT-WEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/) e em bases de dados. O novo espoligotipo determinado foi nomeado pelos autores. Os mapas foram confeccionados no software de geoprocessamento QGIS versão 2.14.3 - Essen, com o processamento dos dados do projeto juntamente com bases cartográficas (shapefiles) fornecidas pelo IBGE. O Sistema de Referência de Coordenadas utilizado foi o EPSG:31999 - SIRGAS/UTM zone 24S.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante inspeção de 452.619 carcaças de bovinos e 798 de bubalinos no estado da Bahia, verificaram-se que 31 bovinos foram apontados pela inspeção oficial como suspeitos de tuberculose e apresentaram lesões macroscópicas características (Fig. 1) o que representou uma frequência aproximada para o período analisado de (0,007%) dado que comprova a persistência da doença no estado sendo um potencial problema de saúde pública. Nenhum bubalino apresentou lesão suspeita de tuberculose.



Lesões macroscópicas características de tuberculose bovina encontradas em abatedouro frigorífico. Notar múltiplos granulomas constituídos por massa amarelada (necrose caseosa), friável com região central mineralizada e, por vezes, encapsulada.

Dos 31 bovinos suspeitos em quatro deles não foi possível proceder à análise por motivo de perda no armazenamento ou extensa contaminação. Considera-se assim sob apreciação das análises mencionadas abaixo 27 animais. Os casos suspeitos de tuberculose representaram uma positividade de crescimento em meio de cultura seletivo para micobactérias de 74,1% (20/27) considerando que uma lesão positiva daqueles que forneceram mais de uma amostra já o enquadram como animal positivo. As culturas observadas foram submetidas à coloração de ZN e 95% (19/20) evidenciaram BAAR (bacilo álcool ácido resistente).

No que diz respeito à análise por *Spoligotyping* os resultados obtidos foram bastante esclarecedores. Dos 19 casos que apresentaram característica morfotintorial de BAAR, puderam ser confirmadas como *Mycobacterium bovis* pela análise molecular 95% (18/19) dos isolados (Tab. 1). Os perfis estudados pelo *Spoligotyping* apresentaram deleções nos espaçadores 3, 9, 16 e 39-43, caracterizando o agente patogênico. Quando a análise pudesse gerar dúvidas na interpretação, a técnica foi repetida.

Tabela 1. Caracterização molecular por *Spligotyping* de isolados obtidos a partir de lesões em bovinos suspeitos de tuberculose a partir de carcaças oriundas de abatedouro frigorífico no estado da Bahia, Brasil

ANIMAL	AMOSTRA	PERFIL SPOLIGOTIPO*
01	AD01	██████████
02	AD05	██████████**
03	AD06	██████████
03	AD06LJ	██████████
03	AD07	██████████
03	AD07LJ	██████████
06	AD16LJ	██████████
07	AD18	██████████
07	AD20	██████████
08	AD21	██████████
08	AD21LJ	██████████
09	AD27	██████████
10	AD23	██████████
10	AD24	██████████
10	AD24LJ	██████████
10	AD25	██████████
10	AD25LJ	██████████
14	AD31	██████████
15	AD32	██████████
16	AD33	██████████
16	AD33LJ	██████████
17	AD34	██████████
17	AD34LJ	██████████
18	AD35	██████████
18	AD35LJ	██████████
19	AD36	██████████
19	AD36LJ	██████████
21	AD38	██████████
23	AD40	Inconclusivo
22	AD39	██████████
27	AD44	██████████
28	AD45	██████████

*Quadros pretos e brancos indicam respectivamente a presença e ausência do espaçador específico na posição 1-43, no *locus* de repetição direta. ** Novo perfil espilogotipo encontrado

Os animais nos casos em que mais de uma amostra foi colhida, a análise foi realizada em todas elas (32 amostras) o que possibilitou a detecção de infecções mistas (animais 03, 07, 08, 10, 16 e 17). Além dos espilogotipos diferentes em lesões distintas de um mesmo animal, ocorreu de um mesmo granuloma também revelar linhagens diferentes incluindo o animal 10 que abrigou 3 perfis distintos de estirpes (Tab. 1). As infecções mistas podem revelar reinfecção, especialmente em casos de falha de imunidade ou contaminação laboratorial o que pode dificultar relações epidemiológicas (Warren et al., 2004).

O animal 2 apresentou um padrão de estirpe ainda não descrito anteriormente. Esse resultado pode significar a descoberta de um novo perfil de espilogotipo ainda não conhecidos

nos bancos de dados internacionais. Apenas uma única amostra revelou um padrão duvidoso 3,2% (1/32) – animal 23 (Tab. 1) não sendo possível elucidá-los contra 8,8% de genotipagem não esclarecida quando realizada por Furlaneto et al., (2013) demonstrando uma boa clareza dos resultados apresentados por este trabalho. Embora o *Spoligotyping* seja um método de tipagem bastante esclarecedor, a associação deste com outras técnicas moleculares são mais elucidativas a exemplo da tipagem por MIRU-VNTR (Supply et al., 2006). A escolha depende de uma série de fatores como infraestrutura disponível e recurso humano tecnicado (Furine et al., 2013).

Foi possível identificar cinco clusters e 11 spoligotipos (SB0120, SB0121, SB0852, SB0828, SB0295, SB0881, SB1648, SB6119, SB0140, SB1055 e EG-BA13; este último denominado provisoriamente) (Tab. 2) além de três grupos monofiléticos do microrganismo estudado, a BOV-1, BOV e BOV-2.

Tabela 2. Padrão *M.bovis.org*, descrição octal, continente de ocorrência, frequência dos isolados e procedência de bovinos positivos no *Spoligotyping* para tuberculose no estado da Bahia, Brasil

Padrão do spoligotipo*	Descrição octal spoligotipo	Continentes localizados o isolado**	Isolados (%)	Municípios de origem bovino
SB0120	67677377777600	Amé, Ási, Áfr, Oce, Eur	10(32,2)	Jequié, Pedro Alexandre, Coronel João Sá, Ipirá e São Filipe
SB0121	67677367777600	Amé, Áfr e Eur	9(29,0)	Mutuípe, Serrinha, Santa Bárbara, Jequié, Pedro Alexandre, Coronel João Sá e Santa Luz
SB0852	67677377777200	Amé, Eur	2(6,4)	Santa Bárbara e Jequié
SB6119	67676367777600	Amé, Eur	2(6,4)	Mutuípe
SB0295	67677367777200	Amé, Eur	2(6,4)	Santa Bárbara e Coronel João Sá
SB0140	66407377777600	Amé, Áfr, Eur, Oce	1(3,2)	Serrinha
SB0828	676773777773600	Eur	1(3,2)	Araci
SB1648	676763777773600	Eur	1(3,2)	Araci
SB1055	61677377777200	Amé	1(3,2)	Coronel João Sá
SB0881	676773674037600	Amé, Eur	1(3,2)	Dom Macedo Costa
EG-BA13***	--	--	1(3,2)	Vera Cruz

* Nome internacional atribuído pelo Mbovis.org. ** Dados do SitvitWeb. *** Novo spoligotipo encontrado e que foi nomeado pelos autores. – Não existem informações registradas

Com base nos resultados apresentados, a tuberculose bovina encontra-se presente no estado da Bahia e para seu controle é necessário um diagnóstico preciso. Para tal, o isolamento bacteriológico clássico associado a métodos moleculares complementares tem se mostrado bastante sensível e eficiente. Medeiros et al. (2019) reafirmam a crescente percepção da necessidade de se associar métodos de diagnósticos para esclarecimento desta doença. A técnica do *Spoligotyping* é um método de tipagem que fornece informações importantes sobre a dinâmica da transmissão e auxilia adequadamente no controle da mesma. Razo et al. (2018) sugerem que entre as técnicas moleculares esta seja a mais prática e eficiente para monitoramento da TB, especialmente, nos países em desenvolvimento.

Apesar do avanço científico na área molecular, Franco et al. (2017) afirmam que mais estudos são necessários para elucidar a diversidade genotípica do *M. bovis*. O *Spoligotyping* é apontada por Carvalho et al. (2016) como uma técnica sofisticada sendo colaborativa nos programas de vigilância, especialmente, em regiões de baixa prevalência, como é o caso no presente trabalho. O MAPA admite que apesar dos testes de diagnóstico da tuberculose no Brasil estarem em sintonia com os padrões internacionais, pretende atualizar e melhorar o padrão de diagnóstico à medida que novos testes forem surgindo (BRASIL, 2001). Neste cenário o *Spoligotyping* de acordo com Ghavidel et al. (2018) é a técnica mais utilizada no mundo e ainda possui a facilidade de comparação de dados internacionais a partir de bancos *online*.

Na sua atualização até abril de 2019, o banco de dados internacional para a nomenclatura de espoligotipos denominado *Mbovis.org*, registrou no mundo 1986 padrões do *Mycobacterium bovis* sendo descritas 39 linhagens no Brasil. O padrão internacional mais prevalente é o SB2562. A variabilidade de espoligotipos encontrado no presente estudo demonstra uma grande movimentação de estirpes que envolve os cinco continentes ocupando as primeiras posições o SB0120 e SB0121 respectivamente. Estes dados corroboram com um amplo levantamento realizado por Ghavidel et al. (2018) das estirpes mais encontradas em animais do mundo inteiro. Os autores atribuem essa ampla distribuição à alta sustentabilidade ambiental, alta transmissão e potencial agressivo destes dois perfis.

O espoligotipo SB0120, foi o mais prevalente 32,2% (10/31) com um cluster com 10 isolados observado em cinco municípios (Jequié, Pedro Alexandre, Coronel João de Sá, Ipirá e São Filipe) (Tab. 2). Já foi descrito no Brasil anteriormente nos estados da Paraíba e Distrito Federal (Parreiras et al., 2012), São Paulo (Rocha et al., 2013; Rodriguez, 2005) e Bahia (Costa et al., 2010) tendo importância em outras regiões do mundo. Esta linhagem possui grande diversidade de hospedeiros, está disseminada em todos os continentes e especialmente

em diversos países da Europa, sendo descrito na França com prevalência de 26% (Haddad et al., 2001). Além disso, este espoligotipo está relacionado com casos de tuberculose humana por *M. bovis* (Gibson et al., 2004), indicando o potencial zoonótico desse perfil. Estudo realizado por Alzamora Filho et al. (2014) na Bahia não identificou a referida cepa.

O espoligotipo SB0121 formou o outro cluster deste estudo com nove isolados e uma frequência de 29% (9/31). Embora não seja o de maior índice, está localizado de forma mais disseminada no estado revelando-se nos municípios de Mutuípe, Serrinha, Santa Bárbara, Jequié, Pedro Alexandre, Coronel João de Sá e Santa Luz (Tab. 2). Foi anteriormente detectado por Alzamora Filho et al. (2014) na Bahia como o mais frequente evidenciando a grande prevalência dessa linhagem já que este foi o segundo espoligotipo aqui mais encontrado. Os autores detectaram esse perfil nos municípios de Euclides da Cunha, Ipirá, Pojuca e Serrinha. Foi descrito como predominante em diversos estados no Brasil como em Minas Gerais (Parreira et al., 2012), São Paulo (Rocha et al., 2013), Rio Grande do Sul (Ramos et al., 2014) e em toda grande área da região Centro Oeste (Carvalho et al., 2016). Ainda no continente Americano é o mais frequente no México (Zumárraga et al., 2013). É amplamente relatado na Europa e com menos frequência em países na África (Ghavidel et al., 2018).

Os perfis SB6119 (Mutuípe), SB0852 (Santa Bárbara e Jequié) e SB0295 (Santa Bárbara e Coronel João Sá) tiveram dois isolados cada evidenciando individualmente 6,4% (2/31) dos achados (Tab. 2). O primeiro foi descrito no Brasil somente uma vez em Brasília (DF) (Sitvit Web) além da descrição do presente estudo o que sugere uma movimentação de bovinos entre o estado da Bahia e o Distrito Federal. SB0852 foi descrito pela primeira vez Brasil pelo presente trabalho e relatado na França e Estados Unidos (Sitvit Web). O SB0295 tem sido descrito como o segundo mais frequente nos estados de Mato Grosso e Goiás (Carvalho et al., 2016). Paraíba, Distrito Federal, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina (Parreiras et al., 2012), São Paulo (Rocha et al., 2013) e Bahia nos municípios de Alagoinhas e Glória (Alzamora Filho et al., 2014). Além dos estados citados, foi reportado no continente Europeu (Sitvit Web). Esses achados do presente trabalho sugerem trânsito de animais entre estados ou comércio entre países.

O espoligotipos SB0140 (Serrinha), SB0828 (Araci), SB1648 (Araci), SB0881 (Dom Macêdo Costa), SB1055 (Coronel João Sá) e EG-BA13 (Vera Cruz) foram identificados em uma amostra cada 3,2% (1/31) (Tab. 2). Na Bahia já havia sido revelados o primeiro em Santo Antônio de Jesus (Alzamora Filho et al., 2014) e o SB1055 por Costa et al. (2010) como isolado de maior frequência. O SB0881 é o terceiro mais encontrado no Brasil apesar deste

ser o primeiro registro na Bahia e em bovinos, o SB0140 foi o espoligotipo mais representativo entre Argentina e Chile em estudo realizado por Zumárraga et al. (2013). No México ocupa a terceira posição (Razo et al., 2018) e foi relatado nos quatro continentes exceto continente asiático apesar do registro de 1855 isolados (Sitvit Web). O SB0828 e o SB1648 só havia sido relatados na Europa e, em apenas um único relato no Brasil cada, ambos no estado na Bahia município de Baianópolis (Alzamora Filho et al., 2014). Os achados no presente trabalho foram distantes em 839 km para estas estirpes em território baiano. Um novo espoligotipo obtido foi classificado provisoriamente como espoligotipo EG-BA13 no município de Vera Cruz.

Na análise sobre a ocorrência de uma doença, informações limitadas sobre situação espacial é uma significativa lacuna. O presente trabalho através de interpolação identificou as áreas com maior concentração de casos de tuberculose. A área do estado mais prevalente foi à região Nordeste. Os municípios que foram descritos como foco de tuberculose na área estudada e que merecem atenção especial para controle da doença foram: Serrinha, Vera Cruz, Mutuípe, Araci, Santa Bárbara, Jequié, Pedro Alexandre, Coronel João Sá, Ipirá, São Filipe, Santa Luz e Dom Macêdo Costa (Fig. 3). O município de Baixa Grande foi à procedência do animal 23, considerado inconclusivo.

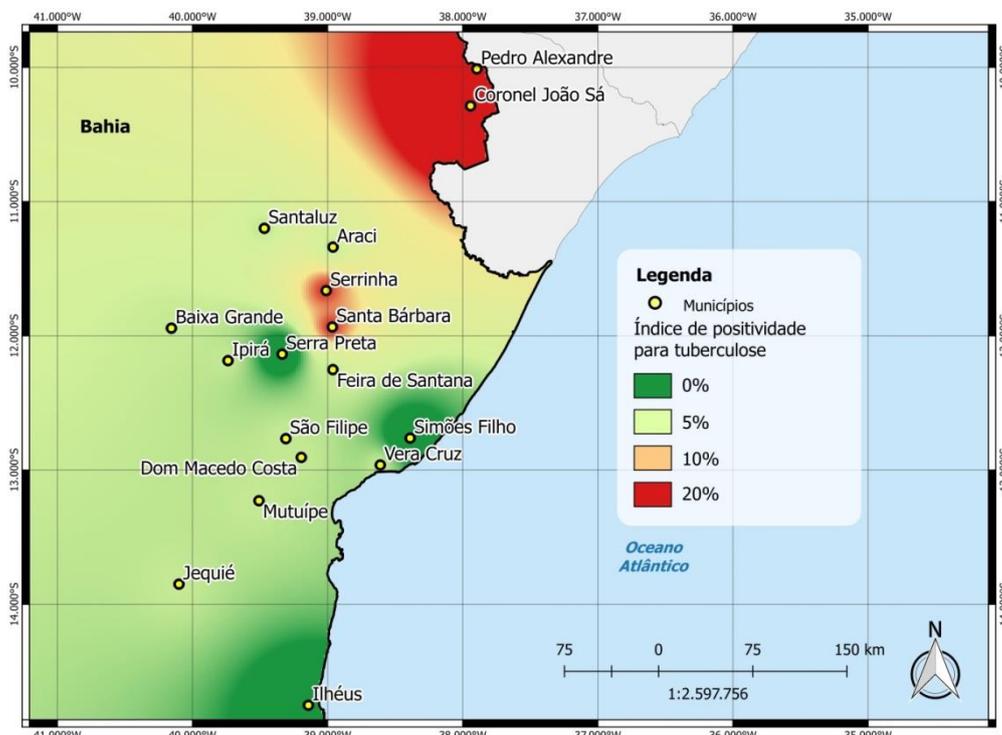


Figura 3. Distribuição geográfica da positividade confirmada por *Spoligotyping* para tuberculose de bovinos através de interpolação pelo método IDW demonstrando a intensidade da doença nas regiões analisadas

A utilização de mapas com o objetivo de analisar a distribuição espacial das doenças têm sido campo de estudo da epidemiologia. Ainda que o mapa de pontos seja importante para a visualização dos casos, a utilização da interpolação permite visualização da intensidade da doença. Ávila et al. (2013) realizaram estudo de caracterização espaço temporal da tuberculose bovina no Estado da Bahia e nenhuma evidência significativa de aglomeração espacial da doença no estado foi detectada em estudo baseado na tuberculinização. Os autores afirmam ainda que os esforços atuais do programa têm se focado na adoção de medidas visando a identificação geográfica de focos. No presente estudo dentre os municípios listados, Coronel João Sá revelou possuir maior variedade de estirpes com quatro delas (SB1055, SB0120, SB0121 e SB0295), seguido de Santa Bárbara, Mutuípe e Jequié com três perfis cada (Fig. 4). Vale lembrar que Coronel João Sá é muito próxima da divisa com Sergipe onde pouco se tem revelado sobre tuberculose bovina podendo haver possível rota de trânsito de animais infectados. O povoamento deste município inclusive surgiu em consequência do gado vindo de Sergipe.

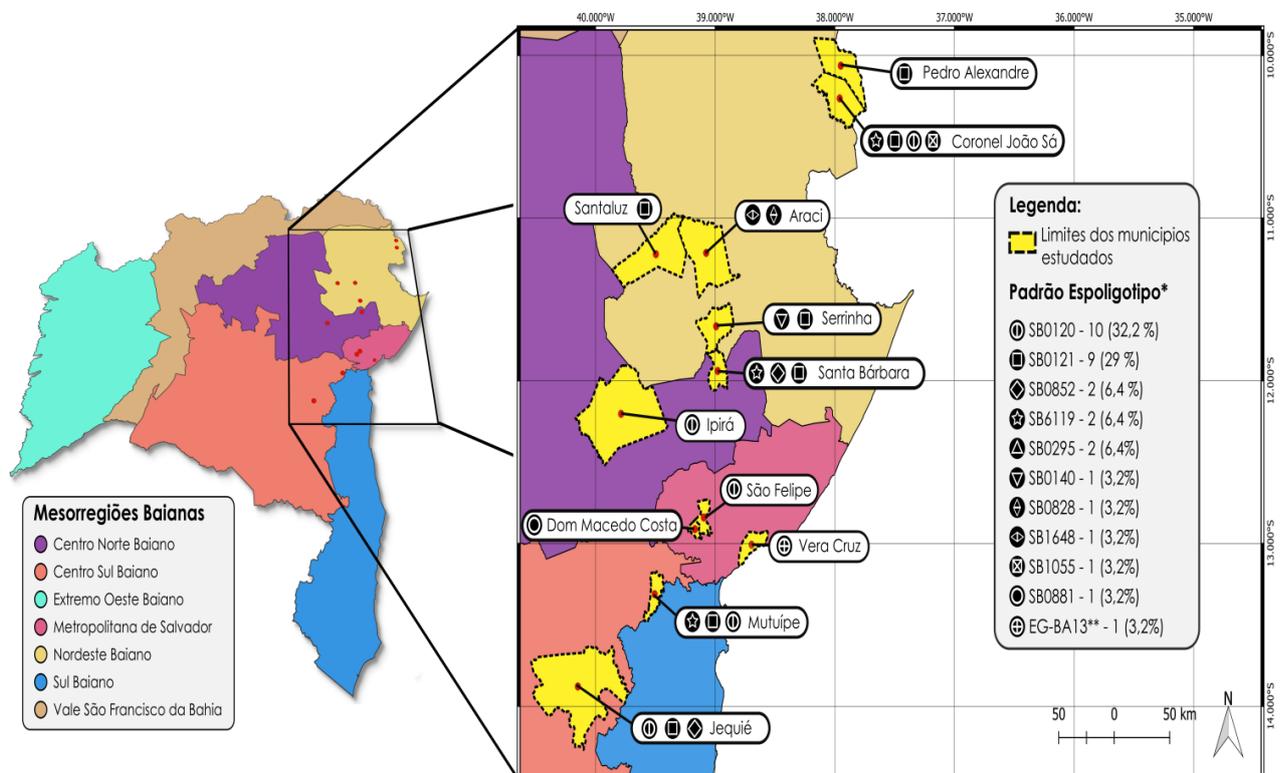


Figura 4. Diversidade genética de isolados de *Mycobacterium bovis* distribuídas por município no estado da Bahia

Esses resultados demonstram que na Bahia existe compartilhamento de espoligotipos entre municípios distantes, com outros estados brasileiros bem como com países nos diversos continentes. A origem (MCKINLEY et al., 2018) e o trânsito de bovinos a partir de propriedades, regiões ou países com TB representa um potencial fator crítico para a transmissão da doença (Skuce et al., 2012). Apenas um dos perfis encontrado (SB1055) não foi descrito na Europa, revelando uma relação próxima entre as estirpes do estudo e do continente europeu. Este fato talvez possa ser explicado devido à introdução de raças européias em países da América Latina. As relações econômicas entre América e Europa se aproximaram a partir da metade do século XIX, quando a importação de bovinos era principalmente de origem européia. Para as estirpes localizadas geograficamente muito distantes onde pode não ter havido relações comerciais, especula-se ser possibilidade da homoplasia originando novas linhas genéticas, surgindo espoligotipos semelhantes aos observados em outra localidade sem relação epidemiológica (Zumárraga et al., 2013).

Independente do contexto epidemiológico, Ramos et al. (2014) e Mears et al. (2015) reafirmam ser primordial a realização de técnicas moleculares que permitam a diferenciação de isolados. Assim poderia se determinar através dessas ferramentas a origem e ligação entre os diferentes surtos, mostrariam a relação entre a tuberculose doméstica e a selvagem e ainda identificariam a fonte da infecção. A diversidade genética dos isolados de *M. bovis* provenientes de carcaças de bovinos na Bahia sugere que há movimentação de animais e este pode ser um importante fator para a transmissão da tuberculose bovina. Demonstrou-se neste estudo a maior diversidade de perfis no estado, até o momento. Além disso, a combinação com a visualização espacial destaca a distribuição geográfica de cepas de *M. bovis* podendo contribuir assim com o programa de controle e erradicação da tuberculose na área pesquisada.

CONCLUSÃO

A técnica de *Spoligotyping* permitiu verificar que há diversidade genética entre as estirpes presentes no estado da Bahia, inclusive a ocorrência de infecções mistas, embora predomine o perfil SB0120. Esta investigação fornece informações importantes que contribuem para esclarecer a epidemiologia molecular da doença no estado. A análise da distribuição espacial dos casos na região do estudo mostrou-se uma ferramenta importante para direcionamento das ações de controle possibilitando ações mais específicas de controle do programa nacional para erradicação da tuberculose.

AGRADECIMENTO

Agradecimento à Capes e Fapesb pelo incentivo ao fomento.

REFERÊNCIAS

ALZAMORA FILHO F., VASCONCELLOS S.E.G., GOMES H.M., CAVALCANTE M.P., SUFFYS P.N. & COSTA J.N. Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em abatedouros-frigoríficos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 103-108, 2014

ÁVILA L.A., PEREZ A.M., FERREIRA NETO S.J., FERREIRA F., TELLES O.E., DIAS A.R., AMAKU M. & GONÇALVES V.S.P. 2009. [Cluster detection analyses for temporal-spatial characterization of bovine tuberculosis in Bahia, Brazil.] **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 11, p. 1313-1318, Nov. 2013. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013001100005&lng=en&nrm=iso>. access on 27 Apr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013001100005>.

BRASIL. _____. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) - Manual Técnico. Brasília: MAPA/DAS/DSA, p. 188, 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 18 mai 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília-DF, 436p, 2008.

BRASIL. **Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agromais/agropecuaria-brasileira.html>> Acesso em 21 de julho de 2018

CARVALHO RCT, VASCONCELLOS SEG, ISSA MDA, SOARES FILHO PM, MOTA PMPC, ARAÚJO FRD, et al. (2016) Digitação Molecular de *Mycobacterium bovis* de bovinos criados no Centro-Oeste do Brasil. **PLoS ONE** 11 (9): e0162459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162459>

CAZOLA, D. D. O., DOS SG JORGE, K., ZUMÁRRAGA, M. J., SOUZA-FILHO, A. F., ARAÚJO, F. R., & OSÓRIO, A. L. A. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 141-147, 2015, doi: 10.1590/S0100-736X2015000200008

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/gado-de-corte/busca-de-noticias/-/noticia/2334398/tuberculose->

bovina-sequenciamento-genomico-permite-avancos-na-deteccao-da-doenca>. Acesso: 17 de maio de 2018

FURLANETO, I. P., CONCEIÇÃO, E. C. B., COSTA M. L., ANA ROBERTA FUSCO DA, MONTEIRO, A. R. F., BATISTA, J. J., GONÇALVES, N. V., GOMES, H. M., & LIMA, K. V. B. (2013). Genotipagem por *spoligotyping* de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos de lâminas de *Ziehl-Neelsen* em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 4(1), 33-41. <https://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232013000100005>

GHAVIDEL, M., MANSURY, D., NOURIAN, K., & GHAZVINI, K. The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing; a systematic review. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 310-315, 2018

GIBSON A.L., HEWINSON G., GOODCHILD T., WATT B., STORY A., INWALD J. & DROBNIOWSKI F.A. 2004. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. **J. Clin. Microbiol.** 42:431-434.

HADDAD N., OSTYN A., KAROUI C., MASSELOT M., THOREL M.F., HUGHES S.L., INWALD J., HEWINSON R.G. & DURAND B. 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* 39(10):3623-3632.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>. Acesso em 21/11/2018.

JORGE, K.S.G. **Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica**. 2011, 69p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande: Mato Grosso do Sul

KAMERBEEK J., SCHOULS L., KOLK A., VAN AGTERVELD M., VAN SOOLINGEN D., KUIJPER S., BUNSCHOTEN A., MOLHUIZEN H., SHAW R., GOYAL M. & VAN EMBDEN J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n.4, p. 907-914, 1997

KAMERBEEK J., SCHOULS L., KOLK A., VAN AGTERVELD M., VAN SOOLINGEN D., KUIJPER S., BUNSCHOTEN A., MOLHUIZEN H., SHAW R., GOYAL M. & VAN EMBDEN J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n.4, p. 907-914, 1997

MCKINLEY, T. J., LIPSCHUTZ-POWELL, D., MITCHELL, A. P., WOOD, J. L., & CONLAN, A. J. Risk factors and variations in detection of new bovine tuberculosis breakdowns via slaughterhouse surveillance in Great Britain. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198760, 2018

MEARS J, ABUBAKAR I, T. COHEN, MCHUGH TD, SONNENBERG P. Efeito do desenho do estudo e configuração em estimativas de agrupamento de tuberculose usando

Mycobacterial Interpretadas intercaladas repetidas Tandem Number Repeats (MIRU-VNTR): uma revisão sistemática. **BMJ Open**. 2015; 5 (1): e005636

PARREIRAS PM, ANDRADE GI, NASCIMENTO TF, OELEMANN MC, GOMES HM, ALENCAR AP, et al.(2012) *Spoligotyping* and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 107: 64–73. pmid:22310537

PEREIRA, Alessandra Gonçalves Lisbôa et al . Análise espacial de casos de tuberculose e associação com fatores socioeconômicos: uma experiência no município do Rio de Janeiro. **Cad. saúde colet.**, Rio de Janeiro , v. 26, n. 2, p. 203-210, jun. 2018 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-462X2018000200203&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 04 maio 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-462x201800020013>.

QGIS (2016a). Guia de usuario de QGIS. http://docs.QGIS.org/2.8/es/docs/user_manual/ [consulta: 21 de Julio 2017]

RAMOS D.F., SILVA A.B.S., FAGUNDES M.Q., VON-GROLL A., SILVA P.E., DELLAGOSTIN O.A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the south of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 657-660, 2014, pmid:25242955

RAZO, P. C. A., RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ E., PONCE S. I. R, MILIÁN SUAZO F. ROBBE-AUSTERMAN S, STUBER T, et al. (2018) Epidemiologia molecular da tuberculose bovina no México através do sequenciamento do genoma completo e *spoligotyping*. **PLoS ONE** 13 (8): e0201981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201981>

RIBEIRO, A.R.P.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V.; FARIA, E.S.; SILVA, J.A. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, 2003.

ROCHA VCF, FIGUEIREDO SC, ROSALES CAR, GRISI-FILHO JHH, KEID LB, SOARES RM, et al. (2013) Molecular Discrimination of *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis** 13: 17–21. pmid:23199273

RODRIGUEZ C.A.R. 2005. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos**. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. São Paulo. 86p.

RUGGIERO, A. P, A.A. IKUNO, V.C.A. FERREIRA, E. ROXO **Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico** 1Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Departamento de Medicina Preventiva, Campus Universitário “Darcy Ribeiro”, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.1, p.55-65, jan./mar., 2007

SHI, J., ZHENG, D., ZHU, Y., MA, X., WANG, S., LI, H., & XING, J. (2018). Role of MIRU-VNTR and *spoligotyping* in assessing the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Henan Province, China. **BMC Infectious diseases**, 18(1), 447. doi:10.1186/s12879-018-3351-y

SKUCE, ROBIN A.; ALLEN, ADRIAN R.; MCDOWELL, STANLEY WJ. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. **Veterinary Medicine International**, v. 2012, 2012

SMITH, NOEL H., UPTON, PAUL. Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www. Mbovis. org. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 873-876, 2012

SUPPLY P, ALLIX C, LESJEAN S, CARDOSO-OELEMANN M, RUSCHGERDES S, WILLERY E, SAVINE E, DE HAAS P, VAN DEUTEKOM H, RORING S, BIFANI P, KUREPINA N, KREISWIRTH B, SOLA C, RASTOGI N, VATIN V, GUTIERREZ MC, FAUVILLE M, NIEMANN S, SKUCE R, KREMER K, LOCHT C, VAN SOOLINGEN D 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol** 44: 4498-4510.

VAN INGEN J, RAHIM Z, MULDER A, BOEREE MJ, SIMEONE R et al. (2012) Characterization of *Mycobacterium* *mycoides* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 18: 653-655. 10.3201/eid1804.110888PubMed: 22469053 [PMC free article] [PubMed]

VISAVET Health Surveillance Centre
<https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/bovine-tb/> Acesso em 12 mai 2018

WARREN, R. M., THOMAS C. V., ELIZABETH M. S., MADALENE R., NULDA B., NICOLAAS C. G. VAN P., AND PAUL D. VAN H. Patients with Active Tuberculosis often Have Different Strains in the Same Sputum Specimen **All AJRCCM Issues**>Vol. 169, No., 2004 <https://doi.org/10.1164/rccm.200305-714OC>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)
 2018. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ Acesso 15 out 2018

ZUMÁRRAGA, M.J., ARRIAGA, C., BARANDIARAN, S., COBOS-MARÍN, L., WAARD, J., ESTRADA-GARCIA, I., FIGUEIREDO, T., FIGUEROA, A., GIMÉNEZ, F., GOMES, H.M., GONZALEZ-Y-MERCHAND, J.A., MACÍAS, A., MILIÁN-SUAZO, F., RODRÍGUEZ, C.A.R., SANTILLÁN, M.A., SUFFYS, P.N., TRANGONI, M.D., ZÁRRAGA, A.M. & CATALDI, A. 2013. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American Countries. **Research in Veterinary Science**. 94:9-21.

CAPÍTULO II

**Artigo será submetido à revista Semina Ciências Agrárias
Qualis B1**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DA OCORRÊNCIA DE LESÕES DE
TUBERCULOSE BOVINA E BUBALINA EM CARÇAÇAS INSPECIONADAS E EM
AMOSTRAS DE VÍSCERAS DE FEIRAS LIVRES NO ESTADO DA BAHIA –
BRASIL**

**MICROBIOLOGICAL EVALUATION AND OCCURRENCE OF CATTLE
TUBERCULOSIS AND BUFFALO INJURIES IN INSPECTED CARCASSES AND
SAMPLES OF FREE TRADE FAIRS IN THE STATE OF BAHIA – BRAZIL**

Evelin S.V. dos Santos¹ *, Fernando Alzamora Filho², Bruno R. dos Santos², Alana Venâncio da Silva²,
and Joselito N. Costa³

1Universidade Federal da Bahia, Instituto Federal de Ciência e Tecnologia Baiano, s/n, km 02, Av. Júlio José Rodrigues - Clerolandia, Itapetinga - BA, 45700-000* Autor para Correspondência E-mail: evelin_vet@hotmail.com

2 Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16 - Salobrinho, Ilhéus - BA, 45662-900, Brasil.

3 Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, Cruz das Almas, BA 44380-000, Brasil.

RESUMO

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa crônica com uma ampla diversidade de hospedeiros. Essa doença reduz a produtividade animal e traz enormes prejuízos à saúde pública. Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a ocorrência de lesões sugestivas de tuberculose detectadas durante a inspeção de bovinos e bubalinos abatidos em abatedouros frigoríficos, bem como em vísceras comercializadas em feiras livres no estado da Bahia. Foram avaliadas pelo serviço de inspeção do estado da Bahia 453.417 carcaças, provenientes de 11 matadouros frigoríficos, das quais 49 lesões sugestivas de TB foram detectadas em bovinos. Nenhum bubalino apresentou lesões suspeitas. O pulmão foi o órgão de predominância das lesões dos 27 bovinos provenientes de 17 municípios. No isolamento bacteriano 74,1% (20/27) das amostras apresentaram crescimento de colônias características. A coloração de *Ziehl-Neelsen* revelou BAAR em 95% (19/20) dos isolados e confirmados por *Spoligotyping* como *M. bovis* 95% (18/19) deles. Das amostras obtidas de vísceras comestíveis de feiras livres, em 20 puderam ser concluído o exame bacteriológico com 25% (5/20) de isolamento, contudo pelo ZN não foi evidenciado BAAR. O ambiente das feiras revelou-se com inapropriadas condições sanitárias. A detecção das lesões sugestivas reveladas neste estudo através de abatedouros é um componente fundamental no papel da vigilância destes estabelecimentos que defendem a qualidade higiênico-sanitária do produto final

funcionando como barreira de proteção para o consumidor bem como colaboram na identificação dos focos da doença.

Palavras chave: feiras de rua, inspeção, micobactérias.

ABSTRACT

In order to evaluate the occurrence of lesions suggestive of tuberculosis detected during the inspection of cattle and buffaloes slaughtered in slaughterhouses and in samples marketed in open fairs in the state of Bahia, this study was conducted. The identification of lesions in the carcass or viscera may indicate the presence of infections in the herds. This disease reduces animal productivity and causes enormous damage to public health. A total of 453,417 carcasses were collected, 49 lesions suggestive of tuberculosis, the lung being the most prevalent region. No buffalo showed suspicious lesions. Twenty-seven bovines from 17 municipalities with isolation were analyzed results in 74.1% (20/27) of them. They were 95% positive BAAR (19/20) and confirmed by *Spoligotyping* as *M. bovis* 95% (18/19). From the samples obtained from edible viscera from free fairs, in 20 the bacteriological examination with 25% (5/20) of isolation could be concluded but the ZN staining did not show any BAAR. Thus, it was concluded that bovine tuberculosis persists in Bahia, the inspection plays a fundamental role in disease surveillance and more studies should occur from samples of free fairs.

Key words: fair free, inspection, mycobacterias.

INTRODUÇÃO

Doença infecciosa de evolução crônica e com diagnóstico oficial demorado a tuberculose bovina (TB) possui significativa importância no Brasil e no mundo. Apresenta-se como uma relevante zoonose integrante da lista da OIE (Organização Mundial da Saúde Animal), e nos bovinos é causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis*, que pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (VAN INGEN, 2012; CONSTABLE et al., 2016; VISAVET, 2018). Apesar da robustez e resistência dos bubalinos a inúmeras doenças eles também são suscetíveis ao referido bacilo (Barbosa et al., 2014). Mesmo disseminada pelo território nacional, ainda não se conhece verdadeiramente a sua prevalência e distribuição (RIBEIRO et al., 2003; MEDEIROS et al., 2010).

Recentes estudos praticados em parceria do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Agências de Defesa e Universidade de São Paulo em parte do rebanho brasileiro referente à tuberculose bovina, obtiveram cobertura em 13 estados da Federação, revelando prevalência de rebanhos infectados que variou de 0,36% no Distrito Federal a 9,0% em São Paulo (BAHIENSE et al., 2016; BARBIERI et al., 2016; DIAS et al., 2016; GALVIS et al., 2016; GUEDES et al., 2016; LIMA et al., 2016; NÉSPOLI et al., 2016; QUEIROZ et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016; ROCHA et al., 2016; SILVA et al., 2016; VELOSO et al., 2016; VENDRAME et al., 2016). Ainda assim em 2018, autores sugerem mais estudos referente à identificação de micobactérias em outras regiões especialmente no Nordeste do Brasil (RAMOS et al., 2018).

Dentre os desafios sanitários enfrentados pelo setor pecuário a febre aftosa, tuberculose e brucelose lideram a prioridade de prevenção devido ao impacto no comércio internacional, no entanto entre essas enfermidades a tuberculose é a única que não possui vacina, o que dificulta a eficiência do seu controle (EMBRAPA, 2014). De acordo com Morato (2007) é uma doença transmissível de grande importância em saúde pública e saúde animal e acarreta acentuadas perdas econômicas como redução de 10 a 20% da produção de leite e do ganho de peso, alterações reprodutivas, condenação de carcaças e custos com tratamentos no ser humano.

Conforme relatado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2018), a tuberculose continua sendo em humanos uma das dez principais causas de morte com mais de 10 milhões de pessoas infectadas e a principal causa letal por um único agente infeccioso estando em muitos casos, a resposta dos países a este desafio acontecendo de forma inadequada. Produtos de origem animal contaminados e relações ocupacionais podem ser responsáveis pela disseminação da TB zoonótica. Nos países em desenvolvimento, é ainda mais pertinente esta questão pelo fato de nesses locais existirem informações insuficientes sobre o problema.

É consenso entre os pesquisadores que o método diagnóstico definitivo da TB é o isolamento do agente, o "padrão-ouro" (ARANAZ et al., 1996; ALMEIDA, SOARES e ARAÚJO, 2004; BRASIL, 2017) que pode ser realizado a partir de lesões de animais suspeitos. É essencial para definir as condições ideais para a cultura, que se leve em conta, a concentração de bacilos na amostra e os riscos de contaminação, uma vez que estes fatores podem influenciar a seleção de procedimentos de descontaminação e a duração da incubação (GORMLEY et al., 2014).

O rastreamento de focos de tuberculose a partir de abatedouros como ferramenta adicional ao programa de controle da doença é uma estratégia interessante, especialmente,

porque a inspeção sanitária permite também identificar casos de TB sem manifestação clínica. O Estado da Bahia apresenta uma vasta rede de abatedouros com inspeção oficial e através dessa metodologia pode estudar a dispersão da doença e ainda fornecer dados epidemiológicos para o controle dessa enfermidade nos rebanhos. Portanto, um sistema de vigilância desse modo é parte fundamental para o desenvolvimento da bovinocultura no estado, melhorando a competitividade no agronegócio brasileiro. Acrescenta-se ainda o fato do controle da TB nos bovinos tender a redução dos casos da enfermidade em seres humanos causada por *M. bovis*.

A qualidade da carne depende de inúmeros fatores além da saúde do animal bem como da higiene no processo produtivo (PEREIRA, 2009). Neste contexto condições inadequadas dos locais de abate e a ineficiente fiscalização da comercialização dos produtos podem afetar ainda mais a qualidade destes alimentos (LEITE et al., 2009). A venda de carne "*in natura*" vem sendo apontada como fonte primária de infecção, trazendo importantes consequências à saúde, tanto dos manipuladores como dos consumidores (ALMEIDA et al., 2010) incluindo neste aspecto as vísceras comestíveis que são amplamente comercializadas. As feiras livres são uma modalidade que abarca os riscos citados acima possuindo uma importante função econômica, social e cultural especialmente em pequenos municípios onde grande parte das vezes é o principal modo de comercialização de carne varejistas (DINIZ et al., 2013, RIBEIRO et al., 2005, ALMEIDA et al., 2011, SILVA FILHO et al., 2018).

Apesar de muito já se ter pesquisado sobre a TB esse tema torna-se cada vez mais desafiador. Considerando-se questões econômicas, sociais, epidemiológicas, ocupacionais e especialmente, o relevante impacto da infecção na saúde animal e humana objetivou-se com esse trabalho avaliar a ocorrência de lesões sugestivas de TB detectadas durante a inspeção de bovinos e bubalinos abatidos em abatedouros frigoríficos e em amostras comercializadas em feiras livres no estado da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em 11 abatedouros-frigoríficos sob inspeção oficial nas esferas estaduais e federais do estado da Bahia, sendo todos eles importantes estabelecimentos de abate de animais. Em ambas as esferas, a comunicação foi realizada através do setor de inspeção. O estudo ocorreu durante o período de janeiro de 2016 a fevereiro de 2019 e foram inspecionadas um total de 453.417 carcaças entre bovinos e bubalinos oriundos das mais diversas regiões do estado.

Foram objetos deste estudo carcaças e vísceras de bovinos e bubalinos indicadas pela inspeção como suspeitas de tuberculose após avaliação sistemática e que apresentavam lesões nodulares de tamanhos e formas variadas contendo exsudato purulento, caseoso ou calcificado. O abate seguiu as normas do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) e resultou de animais aparentemente sadios na inspeção *ante mortem* não havendo distinção entre estes. Quando ocorria suspeita, a decisão sanitária era tomada conforme determinado no mesmo regulamento (BRASIL, 1997).

Também envolveu a área do nosso estudo as feiras livres de 12 cidades do estado: Caldeirão Grande, Elísio Medrado, Laje, Santa Terezinha, Amargosa, Maetinga, Caraíbas, Serrinha, Feira de Santana, Santa Bárbara, Santo Antônio de Jesus e Itabuna. Os locais foram determinados pela facilidade de acesso as feiras livres e, quando possível, a escolha se deu em municípios onde já se tinha confirmação de bovinos positivos. Neste caso se materializou como objeto do estudo 29 fragmentos de pulmão e/ou fígado comercializados dando-se preferência a estes já que essas vísceras possuem maior probabilidade da ocorrência da tuberculose (Figura1). A coleta foi realizada através da compra das vísceras adquiridas como consumidor final nos balcões das feiras livres.

Figura 1. Pulmão bovino comercializado em feira livre para consumo humano.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

O material resultante das coletas ficou acondicionado em coletores, identificados e armazenados à -20°C sendo encaminhadas ao Laboratório de Micobacterioses da Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus (LAMVET-UESC) para armazenamento e

análise bacteriológica. O processamento laboratorial não excedeu 60 dias após a coleta da amostra.

As amostras foram descontaminadas pelo método de *Hexadecyl Pyridinium chloride* 1,5% (HPC) (AMBROSIO et al., 2008) com posterior semeadura em meio de *Lowenstein-Jensen* (LJ) e *Stonebrink- Leslie* (SL) em duplicata; os tubos foram examinados semanalmente quanto à presença de colônias com as características desejadas para verificação do isolamento de micobactérias, quando permaneceram incubados em estufa com demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a 37°C por 90 dias (RODRIGUEZ, 2005; BRASIL, 2008).

As amostras contaminadas foram novamente processadas para o cultivo, sendo submetido a novo procedimento de descontaminação. As que permaneceram contaminadas durante o período de incubação não foram consideradas na análise da frequência de amostras positivas. O tempo desde a incubação até o aparecimento do primeiro crescimento identificável do microorganismo foi registrado em fichas.

Nos tubos que apresentaram colônias com crescimento característico de micobactérias, as lâminas obtidas foram coradas por *Ziehl-Neelsen* (ZN) para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistente (BAAR) de acordo com as recomendações do Manual Nacional de Vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008). Foram então avaliadas em microscópio óptico de luz e interpretadas como positivo ou negativo para micobactéria, conforme sugerido por Varello et al. (2008). Nas positivas no ZN o DNA foi extraído por lise térmica (SHI, 2018). Em seguida o DNA foi conduzido ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (LABMAM) na Fundação Oswaldo Cruz - FioCruz no Rio de Janeiro para confirmação molecular por *Spoligotyping* (KAMERBEEK et al., 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi detectada pelos fiscais lesões sugestivas de tuberculose (Figura 2) em 31 bovinos (0,007%). A inspeção ocorreu em 452.619 carcaças de bovinos e 798 de bubalinos. A detecção de tuberculose em bubalinos foi evidenciada (PEREIRA et al. 2017) no 0,5%, no Amapá (MOTA et al. 2002) 20,4% no estado do Amazonas e 7,2% no Pará (BARBOSA et al. 2014), diferente do presente estudo onde não foi observado nenhum animal com lesão sugestiva. Deve-se considerar que o número de carcaças bubalinas

inspeccionadas foi bastante inferior ao número de bovinos neste estudo. Ressalta-se que dados de pesquisas com tuberculose em búfalos são escassos no Brasil e na Bahia.

Os animais condenados pela inspeção forneceram 49 lesões suspeitas, três (3) perdidas no armazenamento, sendo então submetidas ao exame bacteriológico 46 amostras. Destas, uma apresentou excessiva contaminação nos dois meios de cultura contabilizando assim 45 amostras com bacteriologia concluída. Muitos trabalhos demonstram grandes taxas de contaminação durante análise microbiológica, a exemplo do estudo de Costa et al. (2010) que apresentou mais de 50% das amostras contaminadas. Este problema não foi vivenciado na vigente pesquisa, visto que o índice de contaminação foi de 8,7% apenas. O autor indica ainda que condições de armazenamento e o tempo de trânsito para o laboratório também sejam fatores essenciais para o sucesso da técnica.

O percentual de animais suspeitos de tuberculose obtidos neste levantamento certamente está relacionado com a baixa prevalência de tuberculose bovina detectada no Estado da Bahia pela ADAB, que segundo último levantamento oficial, quando foram tuberculinizados 19.813 bovinos, apenas 24 (0,12%) animais apresentaram-se positivos (BAHIENSE et al., 2016). Ainda assim, os autores reafirmam a necessidade que a Bahia implemente um sistema de vigilância para detecção e saneamento dos focos de tuberculose bovina. Devem-se considerar questões como o abate clandestino, especialmente, de animais de descarte ou a eliminação de bovinos positivos na unidade de criação que subestimam a real prevalência da enfermidade.

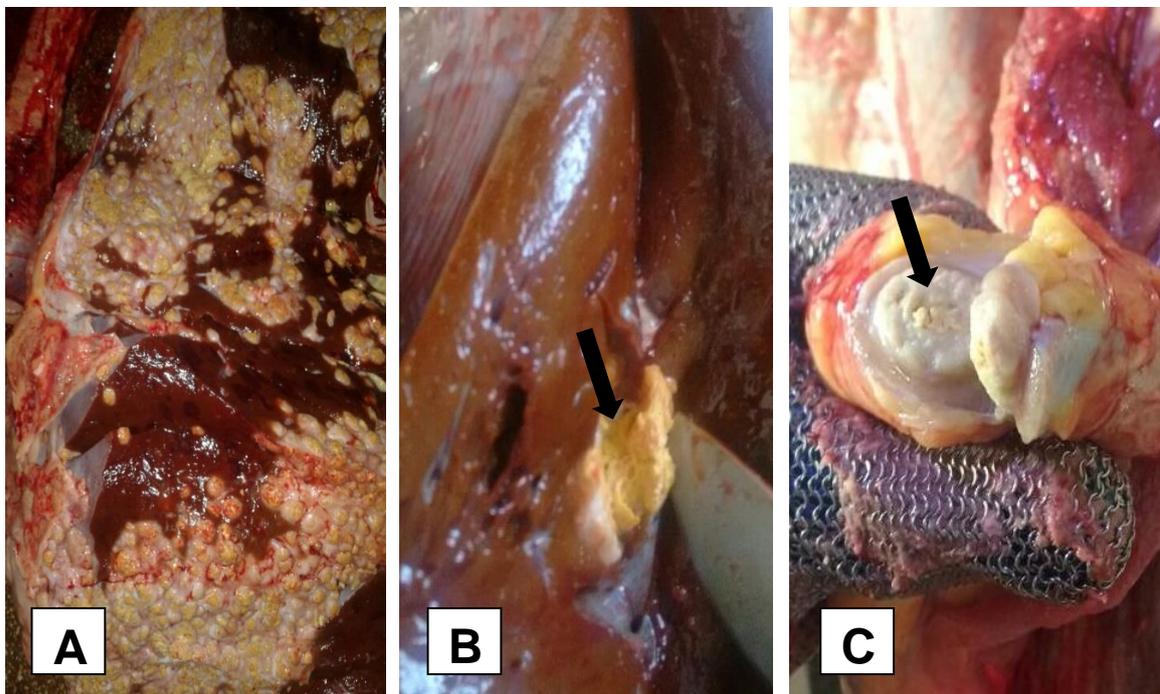
Deve-se ajuizar também o fato de que a maioria dos animais que foram avaliados neste trabalho era em especial bovinos e bubalinos de corte, nos quais a enfermidade é sabidamente menos prevalente. A associação entre tuberculose bovina e produção leiteira tem sido observada por diversos autores (GALVIS et al., 2016; PORPHYRE et al. 2008; RAMÍREZ-VILLAESCUSA et al., 2010) contexto que possivelmente resultaria em índices maiores da doença.

A prevalência de lesões suspeitas de tuberculose em carcaças de bovinos abatidos observada nesta pesquisa foi inferior à descrita por Lopes (2008), que detectou 0,16% de lesões suspeitas em 28.675 bovinos abatidos em abatedouro, no município de Aracruz-ES. Salazar (2005) no Mato Grosso examinou 57.641 bovinos, dos quais 27 (0,05%) foram condenados. Na Bahia, estudo realizado por França et al. (2013) apontaram frequência para o período analisado de 0,12%, dado superior ao observado por este levantamento. Batista (2016) avaliou 562.910 carcaças de bovinos quando detectaram 30 animais com lesões e Santos (2014) em 33.205 identificaram 13 lesões sugestivas no estado. Estes dados

demonstram a persistência da enfermidade no estado da Bahia ainda que em baixos percentuais.

A detecção das lesões sugestivas reveladas neste estudo através de abatedouros é um componente fundamental no papel da vigilância destes estabelecimentos que garantem a qualidade higiênico-sanitária do produto final funcionando como barreira de proteção para o consumidor bem como colaboram na identificação dos focos da doença. Tendo em vista que um eficiente serviço de inspeção, juntamente com um consolidado programa de erradicação, inúmeros países tem conseguido reduzir a prevalência da TB. Conforme indicam Costa (2008), Lopes (2008), More et al. (2015), Cazola et al. (2015) e Mckinley et al. (2018) o uso de estabelecimentos tipo abatedouro é uma importante ferramenta neste sistema de vigilância apesar da variação de detecção já que o sistema é inspetor dependente o que subjetiva o critério da análise. Deve-se considerar também segundo Baptista, Moreira e Santos (2004), os casos de TB que não apresentam lesões macroscópicas detectáveis no exame *post mortem*.

Figura 2. Lesões macroscópicas características de tuberculose bovina encontradas em abatedouro frigorífico na Bahia. Notar múltiplos granulomas constituídos por massa amarelada (necrose caseosa), friável com região central mineralizada e, por vezes, encapsulada.



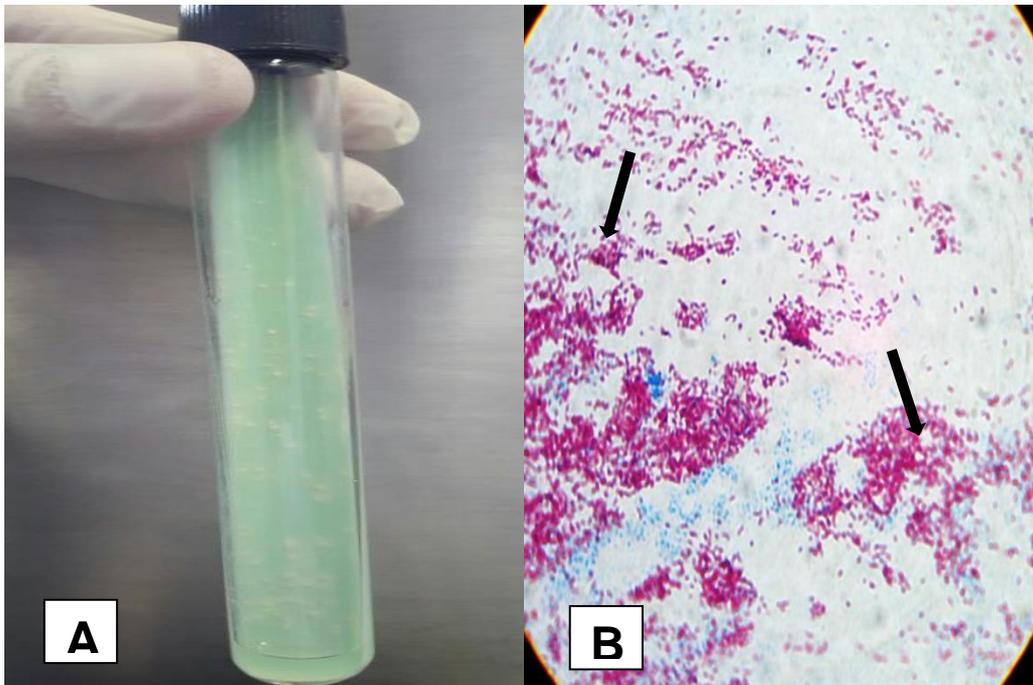
Fonte: Arquivo pessoal (2017)

A= hepatite granulomatosa multifocal disseminada; B= hepatite granulomatosa focal (seta); C= linfadenite granulomatosa (seta).

No presente estudo. Os sítios com lesões sugestivas de TB em ordem de frequência foram: 40% (16/40) pulmão, 32,5% (13/40) linfonodos, 15% (06/40) fígado, 5% (2/40) musculatura e 2,5%(1/40) língua, abomaso e intestino cada. Na bacteriologia, 73,3% (33/45) apresentaram crescimento de colônias com superfície granular e coloração creme amarelada, pequenas, arredondadas variando entre 13 a 90 dias o tempo de crescimento (Figura 3).

De fato, a localização da lesão macroscópica sugestiva de TB é bem variável sendo mais comum em bovinos no parênquima pulmonar, linfonodos e fígado (ALZAMORA-FILHO et al., 2014; SILVA et al., 2014) similar aos resultados observados no presente trabalho. A principal via de transmissão é a aerógena, o que pode explicar a maior ocorrência de lesões nos pulmões (PAES e FRANCO, 2016), não obstante as lesões possam ser encontradas em outros órgãos como aqui verificado, nos casos em que a tuberculose encontra-se disseminada na forma miliar (OLIVEIRA et al., 2012). Foi observado ainda, que um mesmo animal revelou amostra positiva ou negativa ao isolamento, em função do órgão analisado. Esta diferença pode ter ocorrido pelo processo de descontaminação ou pela presença/viabilidade do bacilo na lesão pesquisada.

Figura 3. Crescimento bacteriano em meio de cultura seletivo de micobactérias a partir de amostras de carcaças sugestivas de tuberculose bovina e coloração de *Ziehl Nelsse* (ZN). Notar bacilos álcool ácido resistentes (setas).



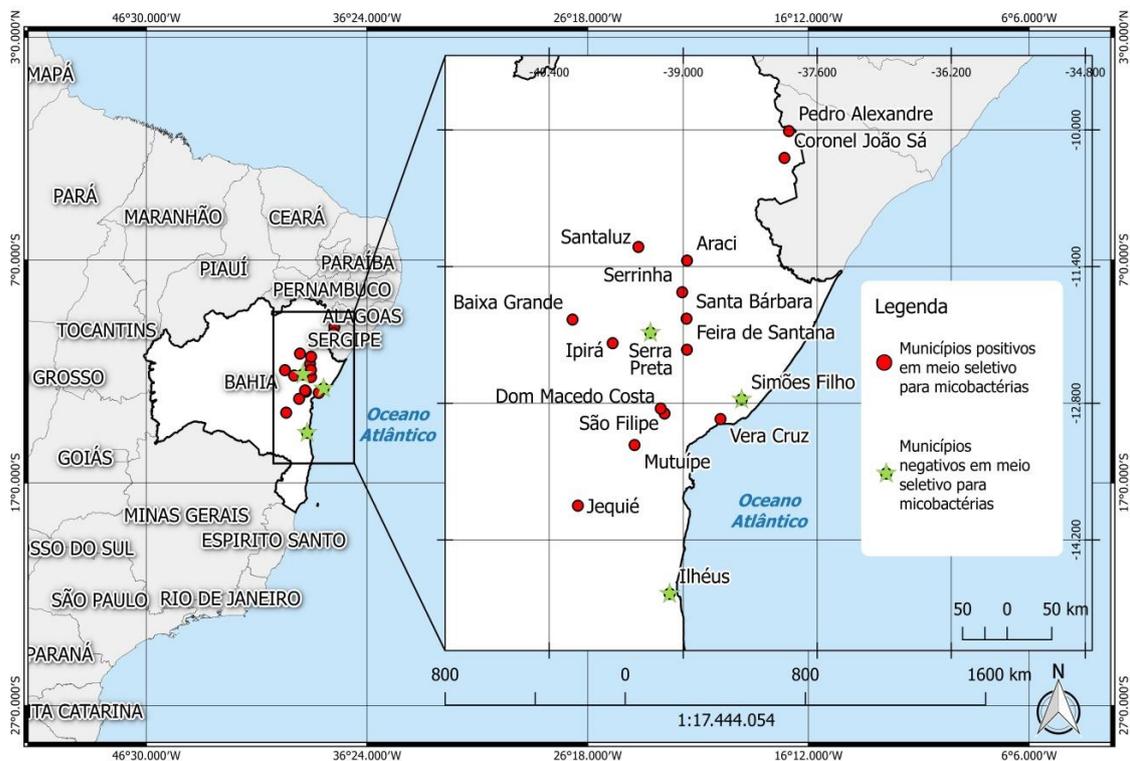
Fonte: Arquivo pessoal (2018)

A= Colônias de micobactérias em meio *Stonebrink – Leslie*;

B= Coloração de ZN evidenciando BAAR obj.10x

Realizando a análise por animal e não mais por amostra, dos 31 indicados pela inspeção, 28 foram avaliados, ficando um animal sem ser possível concluir a investigação devido à extensa contaminação. Considera-se assim sob apreciação 27 animais com lesões sugestivas. Os bovinos suspeitos foram oriundos de 17 municípios de diversas mesorregiões do estado: Serrinha, Vera Cruz, Mutuípe, Feira de Santana, Araci, Santa Bárbara, Jequié, Ilhéus, Simões Filho, Pedro Alexandre, Coronel João Sá, Ipirá, Baixa Grande, Santa Luz, Serra Preta e Dom Macêdo Costa (Figura 4). Constatou-se no presente trabalho uma prevalência heterogênea de rebanhos infectados, indicando que a TB é distribuída pelo interior, o que também foi revelado por Bahiense et al. (2016). É importante ressaltar que, a presente pesquisa ocorreu nas regiões da Bahia apontadas pelos autores acima como as de menores prevalências no estado. A positividade de isolamento para micobactérias foi de 74,1% (20/27) dados superiores aos relatados na literatura em lesões sugestivas que variaram de 60,0% (NASSAR et al., 2007) a 68,75% (SILVA et al., 2018).

Figura 04 – Mapa representando origem dos bovinos com isolamento positivo para micobactérias a partir de amostras de suspeitas de tuberculose apontadas pela inspeção oficial no estado da Bahia.



Fonte: Arquivo pessoal (2018)

As colônias obtidas foram coradas pela técnica de ZN para confirmar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (figura 3B), sugerindo que estes pertencem ao Complexo *Mycobacterium*, representando assim 95,0% (19/20) de bacilos confirmados (Quadro 1). A sensibilidade da técnica é questionada por diversos autores (SULIEMAN e HAMID, 2002; WATRELOT-VIRIEUX et al., 2006; PEREIRA et al., 2017), no entanto, quando realizada diretamente da cultura como nesta pesquisa, a sensibilidade aumenta consideravelmente como pôde ser visualizado através dos resultados apresentados. Vale ressaltar a partir desse dado, que as equipes de inspeção envolvidas demonstraram boa precisão na indicação das carcaças positivas para micobactérias.

Quadro 1. Relação do município de origem do animal indicado pela inspeção oficial como suspeito de tuberculose juntamente com avaliação bacteriológica e coloração de *Ziehl- Nielsen* listada por animal abatido no estado da Bahia.

Animal	Crescimento em S-L	Crescimento em L-J	BAAR	Origem do animal
1	(+)	(-)	Presença	Serrinha
2	(+)	(+)	Presença	Vera Cruz
3	(+)	(-)	Presença	Mutuípe
4	(-)	(-)	X	Feira de Santana
5	(-)	(+)	Ausência	Feira de Santana
6	(+)	(+)	Presença	Serrinha
7	(+)	(+)	Presença	Araci
8	(+)	(+)	Presença	Santa Bárbara
9	(+)	(-)	Presença	Santa Bárbara
10	(+)	(+)	Presença	Jequié
11	(-)	(-)	x	Ilhéus
12	(-)	(-)	x	Simões Filho
13	(-)	(-)	x	Simões Filho
14	(+)	(+)	Presença	Pedro Alexandre
15	(+)	(+)	Presença	Pedro Alexandre
16	(+)	(+)	Presença	Coronel João de Sá
17	(+)	(+)	Presença	Coronel João de Sá
18	(+)	(+)	Presença	Coronel João de Sá
19	(+)	(+)	Presença	Ipirá
20	Contaminou	Contaminou	---	Pedro Alexandre
21	Contaminou	(+)	Presença	São Filipe
22	Contaminou	(+)	Presença	Coronel João de Sá
23	(+)	(-)	Presença	Baixa Grande
24	(-)	(-)	x	Santaluz
25	(-)	(-)	x	Baixa Grande
26	(-)	(-)	x	Serra Preta
27	(+)	(+)	Presença	Santa Luz
28	(+)	(+)	Presença	Dom Macêdo Costa

Fonte: Arquivo pessoal (2018)

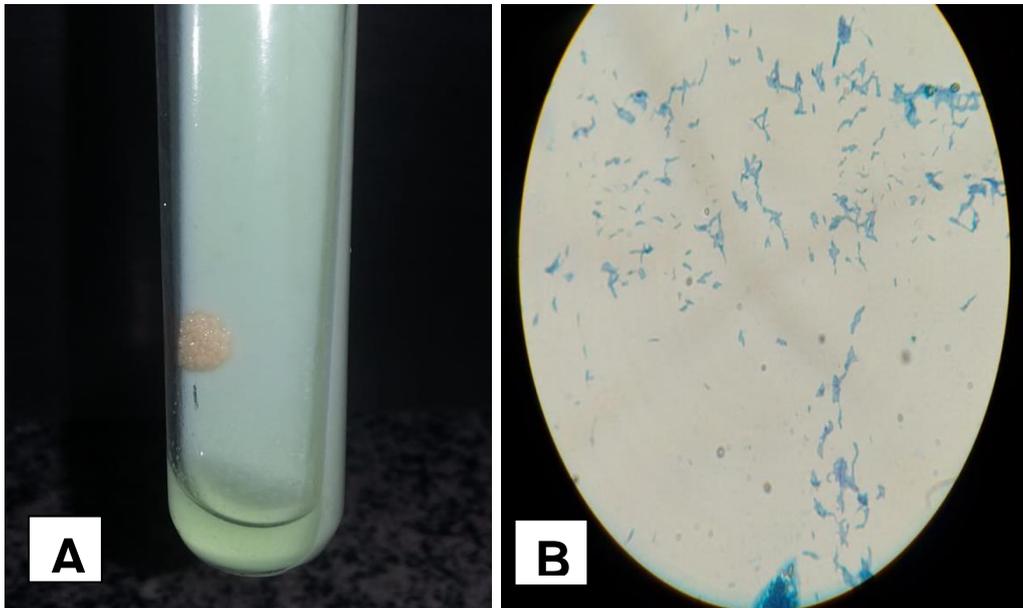
(+) = houve crescimento em meio de cultura;
(-) = não houve crescimento em meio de cultura;
S-L= *Stonebrink – Leslie*;
L-J = *Lowenstein-Jensen*.
x = não houve crescimento em meio de cultura
BAAR= bacilo álcool ácido resistente

Dos animais avaliados, 25,9% foram negativos para técnica aplicada de isolamento. Esses resultados também denotam que possivelmente há casos de condenação de peças e carcaças em que não são devido ao *Mycobacterium sp.* apesar da lesão macroscópica ser sugestiva. Estas lesões podem ser causadas por agentes infecciosos como *Nocardia sp.*, *Actinomyces sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Actinobacillus sp.* entre outros (PARREIRAS, 2003). As amostras negativas podem também estar relacionadas a amostras paucibacilares (GORMLEY et al., 2014), ao processo de descontaminação (SAKAMOTO et al., 2008) ou ainda morte do bacilo após causar infecção (FRÁGUAS et al., 2008).

Estes isolados na análise molecular por *Spoligotyping* 95% (18/19) demonstraram perfis compatíveis com a espécie de *Mycobacterium bovis* demonstrando diferentes spoligotipos. Os dados apresentados reforçam a necessidade da permanência da vigilância e da aplicação das medidas de controle da tuberculose na Bahia.

No que se refere às feiras livres foram colhidas 29 amostras de vísceras comestíveis, sendo que destas, 2 foram adquiridas em venda para consumo já em estágio inicial de autólise e não foram processadas. A contaminação ocorreu em 25,9% (7/27) das amostras mesmo após repetição do processo de descontaminação. Assim, excluindo-se as autólises e as contaminações, houve crescimento em meio de cultura seletivo para micobactérias em 25% (5/20) das análises (Figura 5). O tempo de crescimento variou entre 18 e 52 dias. As colônias obtidas foram coradas pela técnica de *Ziehl-Neelsen* (ZN) para confirmar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes e nenhuma das amostras foi positiva no BAAR (Figura 5B). Pode-se observar, por outro lado, condições de higiene claramente inadequadas no acondicionamento e comercialização do alimento incluindo vísceras ainda nos balcões, em estágio inicial de autólise. As condições higiênico-sanitárias eram visivelmente inadequadas o que pode explicar as amostras contaminadas do presente estudo. As condições sanitárias encontradas foram semelhantes às relatadas por outros autores nesses ambientes na Bahia (Martins e Lucena, 2002; Almeida e Pena, 2011), no entanto nenhum trabalho foi antes realizado para pesquisa de *Mycobacterium bovis* em vísceras no estado.

Figura 5. Crescimento bacteriano em meio de cultura seletivo para micobactérias a partir de amostras de pulmão em feira livre e coloração de *Ziehl-Neelsen* da colônia crescida. Notar ausência de bacilos álcool ácido resistentes.



Fonte: Arquivo pessoal (2019)

A= Crescimento de colônia em meio *Stonebrink – Leslie*;

B= Coloração de ZN evidenciando ausência de BAAR obj.10x

Possivelmente o aspecto mais significativo de se comercializar produtos alimentícios que apresentam tuberculose seja o ocupacional (ALMEIDA et al., 2017). Os manipuladores, neste caso os feirantes, não fazem uso de equipamentos de proteção individual e ficam vulneráveis ao contágio via oral ou aerógena. Estudos da transmissão de tuberculose via feira livre são diversos a partir de comercialização de leite ou queijos (VIALTA et al., 2003; HARRIS et al., 2007; KONUK et al., 2007; FRANCO et al., 2013; AGADA et al., 2014; CÉZAR et al., 2016; MORICONI et al., 2018) no entanto, pouco se pesquisa sobre a transmissão através de carne ou vísceras comestíveis neste ambiente.

A ausência de amostras positivas para tuberculose em amostras de vísceras comercializadas em feiras livres no presente estudo, pode ser parcialmente justificado, pelo fato de que no abate clandestino, especialmente, em animais de descarte, supostamente se retira qualquer lesão visível que pudesse evidenciar lesões e comprometer a venda do produto. Deve-se considerar também que as extremas condições inadequadas de estocagem e armazenamento possa tornar o *Mycobacterium* inviável para crescer em meio de cultura, método utilizado pelo presente trabalho. Outro fator que influencia na identificação do bacilo nessas condições de venda é a ausência de um método de pesquisa validado para *M. bovis* em

produtos alimentícios que permita a detecção de baixos números de micobactérias na presença e predominância de outros microorganismos (MORICONI et al., 2018). Ainda assim os riscos persistem uma vez que parte da população ainda consome carne de bovinos abatidos clandestinamente.

AGRADECIMENTO

Agradecimento à Capes e Fapesb pelo incentivo ao fomento.

REFERÊNCIAS

AGADA, C. A.; ADESOKAN, H. K.; IGWE, D.; CADMUS, S. I. *Mycobacterium africanum* and nontuberculous mycobacteria from fresh milk of pastoral cattle and soft cheese in Oyo State: implications for public health. **African Journal of Medicine and Medical Science**, v. 43, p. 13-20, 2014. Suppl.

ALMEIDA, A. C., SOUZA, R. M., PINHO, L., MACEDO SOBRINHO, E.; SILVA, B. C. M. 2010. Determinação de perigos microbiológicos em carnes bovinas resfriadas provenientes de abates clandestinos e comércio ilegal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.4, p.278- 285.

ALMEIDA, I. B., LIMA, A. F., MIRANDA, M. V.F.G., LIMA, P. O. Tuberculose x zoonose: um risco eminente para saúde ocupacional das comunidades rurais. **Revista Científica Rural** v.19 n 2, 2017

ALMEIDA, R. B., DINIZ, W. J. S., SILVA, P. T. V., ANDRADE, L. P., DINIZ, W. P. S., LEAL, J. B. G.; BRANDESPIM, D. F. 2011. Condições higiênico-sanitárias da comercialização de carnes em feiras livres de Parantama, PE. **Alimentos e Nutrição**. v. 22, n. 4, p. 585-592.

ALMEIDA, R.F.C.A.; SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R. Tuberculose Bovina: Diagnóstico. In: (Ed.). **Brucelose e Tuberculose Bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico**. Brasília: Empraba Informação Tecnológica, 2004. p.61-80

ALZAMORA FILHO F., REIS V.M., FEHLBERG I., ALCÂNTARA A.C., CAVALCANTE M.P., ROCHA V.C.F. & COSTA J.N. Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1585-1591, 2014

AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 241-244, 2008

ARANAZ A., LIEBANA E., MATEOS A., DOMINGUEZ L., VIDAL D., DOMINGO M., GONZALEZ-LLAMAZARES O., RODRIGUEZ-FERRI E.,

BUNSCHOTTEN A., VAN EMNDEN JDA. Y COUSINS DV. , 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** 34(11):2734-40.

BAHIENSE, L.; ÁVILA, L. N. de; BAVIA, M. E.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; GRISI-FILHO, J. H. H.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3549-3560, 2016. Suplemento.

BAPTISTA, F., MOREIRA, E. C., & SANTOS, W. L. M. Revalence of tuberculosis among bovines slaughtered in Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 577-580, 2004

BARBIERI, J. D. M., OLIVEIRA, L. F. D., DORNELES, E. M. S., MOTA, A. L. A. D. A., GONCAVES, V. S. P., MALUF, P. P., ... & GRISI-FILHO, J. H. H. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil, 2013. **Semina-Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3531-3548, 2016. Suplemento

BARBOSA NETO, J.D., SILVA, J.B., RANGEL, C.P., FONSECA, A.H., SILVA, N.S., BOMJARDIM, H.A., FREITAS, N.F.Q.R Tuberculosis prevalence and risk factors for water buffalo in Para, Brazil. **Tropical Animal Health And Production**. Dordrecht: Springer, v. 46, n. 3, p. 513-517, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/113220>>.

BATISTA, M. S. **Identificação de focos de tuberculose bovina a partir da vigilância em matadouros-frigoríficos sob serviço de inspeção estadual na Bahia / Cruz das Almas, BA**, [Dissertação] 2016.67f.; il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília-DF, 436p, 2008.

BRASIL. **Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA**, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/novo-regulamento-da-inspecao-de-produtos-de-origem-animal-reforca-seguranca-alimentar>>. Acesso em abril de 2018.

CEZAR, R. D.; LUCENA-SILVA, N.; BORGES, J. M.; SANTANA, V. L.; PINHEIRO JUNIOR, J. W. Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 3, p. 269-272, 2016. doi: 10.1016/j.ijmyco.2016.04.007.

CONSTABLE, P. D., HINCHCLIFF, K. W., DONE, S. H., GRUENBERG, W. **Veterinary Medicine** Edition A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats - two-volume set 11th, 2016

COSTA, A. C. F. **Tuberculose bovina: diagnóstico anatomo-histopatológico, bacteriológico e molecular em animais abatidos na Região Metropolitana de Salvador, Bahia**. Dissertação de Mestrado. Salvador, Bahia, 46 p. 2008

COSTA, A. C. F.; SILVA, N. S.; ROCHA, V. C. M.; RODRIGUEZ, C. A. R.; ESTRELA-LIMA, A.; MOREIRA, E. L. T.; MADRUGA, C.; ARRUDA, S. M.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA, M. C. A.; OLIVEIRA, E. M. de D. Tipificação genética, através da técnica de *spoligotyping*, de isolados de *Mycobacterium bovis* em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 77, n. 2, p. 233-237, 2010

DIAS, R. A.; STANOJLOVIC, F. M. U.; BELCHIOR, A. P. C.; FERREIRA, R. S.; GONÇALVES, R. C.; AGUIAR, R. S. C. B.; SOUSA, P. R.; SANTOS, A. M. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3673-3684, 2016. Suplemento.

DINIZ, W.J.S.; ALMEIDA, R.B.; LIMA, C.N.; OLIVEIRA, R. R.; QUIRINO, W.A.; BRANDESPIM, D.F. Aspectos higiênicos da comercialização de carnes em feiras livres: a percepção do comerciante. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 294-299, 2013.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/gado-de-corte/busca-de-noticias/-/noticia/2334398/tuberculose-bovina-sequenciamento-genomico-permite-avancos-na-deteccao-da-doenca>>. Acesso: 17 de maio de 2018

FRÁGUAS, S. A. MÁRCIA SOUZA CUNHA-ABREU,** ANA MARIA DOS REIS FERREIRA,** CARLA DRAY MARASSI,*** WALTER OELEMANN,*** LEILA DE SOUZA FONSECA,*** RACHEL FERREIRA,* WALTER LILENBAUM* Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização **R. bras. Ci. Vet.**, v. 15, n. 3, p. 117-121, set./dez. 2008

FRANÇA, L. R., FERREIRA DA CRUZ, J., BAHIA CERQUEIRA, R., & FERNANDES NEVES, V. B. Prevalência e histopatologia de lesões sugestivas de tuberculose em carcaça de bovinos abatidos no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14, n. 4, 2013

FRANCO, M. M. J.; PAES, A. C.; RIBEIRO, M. G.; DE FIGUEIREDO PANTOJA, J. C.; SANTOS, A. C.; MIYATA, M.; LEITE, C. Q.; MOTTA, R. G.; LISTONI, F. J. 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 Veterinary Research**, v. 9, n. 85, 2013. doi: 10.1186/1746-6148-9-85.

GALVIS, J. O. A.; GRISI-FILHO, J. H. H.; COSTA, D.; SAID, A. L. P. R.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3567-3578, 2016. Suplemento.

GALVIS, J. O. A.; GRISI-FILHO, J. H. H.; COSTA, D.; SAID, A. L. P. R.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GONÇALVES, V. S. P.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, E. O.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiologic characterization of bovine

tuberculosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3567-3578, 2016. Suplemento

GORMLEY, E. ; CORNER, L.A.L. ; COSTELLO, E. ; RODRIGUEZ-CAMPOS, S. Bacteriological diagnosis and molecular typing de *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* • Show more DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.04.010 **Research in Veterinary Science**, 2014

GUEDES, I. B.; BOTTENE, I. F. N.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LEAL FILHO, J. M.; HEINEMANN, M. B.; AMAKU, M.; GRISI-FILHO, J. H. H.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3579-3588, 2016. Suplemento.

HARRIS, N. B.; PAYEUR, J.; BRAVO, D.; OSORIO, R.; STUBER, T.; FARRELL, D.; PAULSON, D.; TREVISO, S.; MIKOLON, A.; RODRIGUEZ-LAINZ, A.; CERNEK-HOSKINS, S.; RAST, R.; GINSBERG, M.; KINDE, H. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 1025-1028, 2007. doi: 10.1128/AEM.01956-06.

KAMERBEEK J., SCHOOLS L., KOLK A., VAN AGTERVELD M., VAN SOOLINGEN D., KUIJPER S., BUNSCHOTEN A., MOLHUIZEN H., SHAW R., GOYAL M. & VAN EMBDEN J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n.4, p. 907-914, 1997

KONUK, M.; KORCAN, E.; DÜLGERBAKİ, S.; ALTINDIŞ, M. Isolation and Identification of *Mycobacteria* from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 343-347, 2007. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.019

LEITE, A. I., QUEIROZ, A. R. A., MOREIRA, J. O., BATISTA, J. S., PEREIRA NETO, E., MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A. 2009. Condições físicas e higiênico-sanitárias dos abatedouros municipais da região Oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.76, n.3, p.335-340

LIMA, P. B.; NASCIMENTO, D. L.; ALMEIDA, E. C.; PONTUAL, K. A. Q.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GONÇALVES, V. S. P.; TELLES, E. O.; GRISI-FILHO, J. H. H.; HEINEMANN, M. B.; SILVA, J. C. R.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Pernambuco, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3601-3610, 2016. Suplemento.

LOPES, C.A.R. **Prevalência de brucelose e tuberculose em bovinos abatidos sob inspeção estadual no município de Aracruz - Espírito Santo**. 2008, 34f. Monografia (Especialização em higiene e inspeção de produtos de origem animal). Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro

MARTINS, M.T.X, LUCENA R.M. **Para ler as feiras livres de Barreiras: uma percepção sócio-cultural dos alunos de comunicação social da FASB/ INTERCOM**. In: Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciências da Comunicação. Salvador (BA); 2002. p. 1-13.

MCKINLEY, T. J., LIPSCHUTZ-POWELL, D., MITCHELL, A. P., WOOD, J. L., & CONLAN, A. J. Risk factors and variations in detection of new bovine tuberculosis breakdowns via slaughterhouse surveillance in Great Britain. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198760, 2018

MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010 <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010005000002>.

MORATO, F. **Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos utilizando a técnica de cultivo em camada de Agar Middlebrook 7H11**. 2007, 84f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. São Paulo: São Paulo

MORE, SJ., RADUNZ, B., GLANVILLE, Lessons learned during the successful eradication of bovine tuberculosis from Australia **Veterinary Record** **177**, RJ. (2015) 224-232 <https://www.intechopen.com/online-first/diseases-caused-by-bacteria-in-cattle-tuberculosis#B68>

MORICONI, P., IKUTA, C., GREGORI, F., OLIVEIRA, G. DE, OLIVEIRA, S. DE, TONIETTI, P., FERREIRA NETO, J., FERREIRA, F., CORTEZ, A., & TELLES, E. (2018). Mycobacteria em queijos tipo Minas comercializados em feiras-livres de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 55(4), e146525. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.146525>

MOTA, P.M.C., LOBATO, F.C.F., ASSIS, R.A., LAGE, A.P., PARREIRAS, P.M., LEITE, R.C., 2002. Ocorrência de tuberculose em rebanhos bubalinos (*Bubalus bubalis* var. *bubalis* –Linneus, 1758) no município de Parintins, Amazonas, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 54, 441–443.

NASSAR A.F., MIYASHIRO S., OLIVEIRA C.G., PACHECO W.A. & OGATA R.A. 2007. Isolation and identification of bovine tuberculosis in a Brazilian herd (São Paulo). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 102(5):639-642.

NÉSPOLI, J. M. B.; NEGREIROS, R. L.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; GRISI-FILHO, J. H. H.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3589-3600, 2016. Suplemento.

OLIVEIRA L.E.D., NONATO I.A., NASCIMENTO G.A.M., NASCIMENTO A.A.T., SERRANO M.T.L. & CARVALHO G.D. 2012. Tuberculose bovina protraída: relato de caso. **J. Bras. Ci. Anim.** 5(10):397-405.

PAES, A.C. e FRANCO, M.M.J. 2016. Tuberculose em animais de produção. p. 512-542. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. 1ª ed. Roca, Rio de Janeiro.

PARRA A, GARCÍA N, GARCÍA A, LACOMBE A, MORENO F, FREIRE F, MORAN J, HERMOSO DE MENDOZA J. (2008) Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Vet Microbiol** 127: 10.1016/j.vetmic.2007.09.001 315-324 PubMed: 17954014 [PubMed]

PARREIRAS, P.M. **Tipificação de *Mycobacterium bovis* utilizando spoligotyping e MIRU-VNTR e avaliação da sensibilidade à quimioterápicos de estirpes isoladas em Minas Gerais e de outras regiões brasileiras.** 2003, 39f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. Minas Gerais.

PEREIRA J.D.B., CERQUEIRA V.D., BEZERRA JÚNIOR P.S., OLIVEIRA BEZERRA D.K., ARAÚJO F.R., DIAS A.C.L., ARAÚJO C.P. & RIET-CORREA G. Histopathological and molecular diagnosis of lesions suggestive of tuberculosis in buffaloes slaughtered in the municipalities of Macapá and Santana, Amapá state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p.1198-1204, 2017

PEREIRA, J. B. 2009. Avaliação das boas práticas em açougues no mercado municipal de Tailândia - PA. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção em Produtos de Origem Animal) Universidade Castelo Branco, 37f. Il. Belém

PINTO, P.S.A.; FARIA, J.E.; VILORIA, M.I.V.; BEVILACQUA P.D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 3, n. 1, p. 10 - 15, 2002.

PORPHYRE, T., STEVENSON, M. A., MCKENZIE, J. Risk factors for bovine tuberculosis in New Zealand cattle farms and their relationship with possum control strategies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 86, n. 1-2, p. 93-106, 2008

QUEIROZ, M. R.; GROFF, A. C. M.; SILVA, N. S.; GRISI-FILHO, J. H. H.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA, F. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3647-3658, 2016. Suplemento.

RAMÍREZ-VILLAESCUSA, A. M.; MEDLEY, G. F.; MASON, S.; GREEN, L. E. Risk factors for herd breakdown with bovine tuberculosis in 148 cattle herds in the South West of England. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, n. 3-4, p. 224-230, 2010

RIBEIRO, A.R.P.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V.; FARIA, E.S.; SILVA, J.A. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, 2003.

RIBEIRO, E. M.; ÂNGULO, J.L.G; NORONHA, A. B; CASTRO, B.S; GALIZONI, F.M.; CALIXTO, J.S., SILVESTRE, L.H. A feira e o trabalho rural no Alto Jequitinhonha: um estudo de caso em Turmalina, Minas Gerais. **Unimontes Científica**. Montes Claros, v.5, n.1, jan./jun. 2003.

RIBEIRO, L. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FRANCISCO, P. F. C.; MOTA, A. L. A. A.; NASCIMENTO, G. T.; LICURGO, J. B.; FERREIRA, F.; GRISI-FILHO, J. H. H.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.;

BORGES, J. R. J. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the Federal District of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3561-3566, 2016. Suplemento

ROCHA, W. V.; JAYME, V. S.; MOTA, A. L. A. A.; BRITO, W. M. E. D.; PIRES, G. R. C.; GRISI-FILHO, J. H. H.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Goiás, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3625-3628, 2016. Suplemento.

RODRIGUEZ C.A.R. 2005. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos**. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. São Paulo. 86p.

SALAZAR, F. H. P. **Ocorrência da tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigorífico no Estado do Mato Grosso, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 73 p. 2005.

SANTOS, E. S. V. dos. **Aplicação de uma mPCR para detecção e identificação de micobactérias diretamente de lesões bovinas suspeitas de tuberculose provenientes de abatedouro-frigorífico sob inspeção estadual no estado da Bahia**, 2014, 131p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, 2014.

SHI, J., ZHENG, D., ZHU, Y., MA, X., WANG, S., LI, H., & XING, J. (2018). Role of MIRU-VNTR and *Spoligotyping* in assessing the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Henan Province, China. **BMC Infectious diseases**, 18(1), 447. doi:10.1186/s12879-018-3351-y

SILVA D.A.V., BÜRGER K.P., MARTINS A.M.C.V. & PROVIDELLO A. 2014. Identificação de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina. **Rev. Bras. Hig. Sanid. Anim.** 2(8):149-160.

SILVA FILHO A.B., PONTES, J. F., MEDEIROS FILHO, M., SANTOS, M. P. L., CARNEIRO, R., SILVA, T. B., ALMEIDA, T. J. O., SILVA, A. F. A. Percepção do consumidor sobre a higiene na comercialização de carnes em feira livre da cidade de Garanhuns – PE **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** (v.12, n.4) p. 428-436 out - dez 2018

SILVA, M. C. P.; GONÇALVES, V. S. P.; MOTA, A. L. A. A.; KOLODA, M.; FERREIRA NETO, J. S.; GRISIFILHO, J. H. H.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; TELLES, E. O.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M. B.; ALFIERI, A. A.; MULLER, E. E. Prevalence and herd-level risk factors for bovine tuberculosis in the state of Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3611-3624, 2016. Suplemento.

SILVA, S.C.G., ALVES, A. DE D.F., ALMEIDA, T.J. DE O., SÁ, P.C.L., SOUZA FILHO, A.F., CÁRDENAS, N.C., FERREIRA NETO, J.S., HEINEMANN, M.B., AZEVEDO, S.S., & TORRES, M.B.A. DE M. 2018. Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* in cattle slaughtered from an abattoir in Garanhuns, Pernambuco. **Semina: Ciências Agrárias**. 39(1):157-166.

SULIEMAN, M. S.; HAMID, M. E. Identification of acid fast bacteria from caseous lesions in cattle in Sudan. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 9, p. 415-418, 2002

VAN INGEN J, RAHIM Z, MULDER A, BOEREE MJ, SIMEONE R et al. (2012) Characterization of *Mycobacterium* *myogis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerg Infect Dis** 18: 653-655. 10.3201/eid1804.110888PubMed: 22469053 [PMC]

VARELLO, M. K.; PEZZOLATO, D. MASCARINO, F. INGRAVALLE, M. CARAMELLI, E. BOZZETTA Comparação de técnicas histológicas para o diagnóstico da tuberculose bovina no âmbito dos programas de erradicação **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 20 (2008), pp 164-169

VELOSO, F. P.; BAUMGARTEN, K. D.; MOTA, A. L. A. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GRISI-FILHO, J. H. H.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; GONÇALVES, V. S. P. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 5, p. 3659-3672, 2016. Suplemento.

VENDRAME, F. B., AMAKU, M., FERREIRA, F., TELLES, E. O., GRISI-FILHO, J. H. H., GONÇALVES, V. S. P., ... & DIAS, R. A. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3639-3646, 2016. Suplemento

VIALTA, A.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; VIEIRA, M. C.; GRAEL-MARASCA, E. T.; BARBIERI, M. K.; SOUZA, F. K. H.; ALMEIDA, A. R.; POMPEI, J. C. A.; MARTINI, M.; LEAL, C. M.; LIMA, Z. M. B.; PRADO, M. V.; SCARCELLI, E.; ROXO, E.; BALDASSI, L.; TEIXEIRA, A. C.; PAULIN, L. M.; GENOVEZ, M. E. Caracterização microbiológica, microscópica e físico-química de produtos lácteos clandestinos apreendidos no estado de São Paulo. **Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos**, v. 3, n. 6, p. 212-216, 2003. Available from: . Viewed: May 25, 2018.

VISAVET Health Surveillance Centre
<https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/bovine-tb/> Acesso em 12 mai 2018

WATRELOT-VIRIEUX, D., DREVON-GAILLOT, E., TOUSSAINT, Y., & BELLI, P. Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 53, n. 7, p. 321-325, 2006

WHO, World Health Organization. The challenges of preventing bovine tuberculosis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 96, n. 2, p. 82-84, 2018. doi: 10.2471/BLT.18.020218

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da baixa frequência da tuberculose bovina, o agente infeccioso da doença ainda circula no estado da Bahia, o que reafirma a necessidade da permanente atenção por parte dos setores da vigilância epidemiológica a fim de intensificar as medidas de controle da enfermidade com atenção especial à Região Nordeste. Apesar da feira livre não ter sido apontada como local de fonte de transmissão da TB, mais pesquisas precisam ser realizadas. A análise da distribuição espacial dos casos na região do estudo mostrou-se uma ferramenta importante para direcionamento das ações de controle. O trabalho ratifica ainda a importância da inspeção sanitária, destaca o papel dos abatedouros frigoríficos frente à detecção dos casos existentes e indica que o método de diagnóstico molecular utilizado pode contribuir para a criação de uma base de dados para o estudo epidemiológico desta importante enfermidade no Estado da Bahia revelando ainda esspoligotipos inéditos na literatura.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. L.; PILLAI, S. **Imunologia celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008

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

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses e enfermidades transmisibles comunes al hombre e a los animales**. Washington: Organización Paramericana de la Salud, 2001 398p. (Publicación Científica y Técnica n. 580)

ALMEIDA, M. D. E PENA, P. G. L. Feira livre e risco de contaminação alimentar: estudo de abordagem etnográfica em santo amaro, Bahia **Revista Baiana de Saúde Pública** v.35, n.1, p.110-127 jan./mar. 2011

ALMEIDA, R.F.C.A.; SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R. Tuberculose Bovina: Diagnóstico. In: _ (Ed.). **Brucelose e Tuberculose Bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico**. Brasília: Empraba Informação Tecnológica, 2004. p.61-80

ALMEIDA, S. P. N. C. **Fazendo a feira: estudo das artes de dizer, nutrir e fazer etnomatemático de feirantes e fregueses da Feira Livre do Bairro Major Prates em Montes Claros – MG**. 2009. 135f. Dissertação (Mestrado em Educação). Universidade de Montes Claros. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Social. Montes Claros-MG, 2009.

ALTWEEG, M. General problems associated with diagnostic applications of amplification methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 23, n. 1, p. 21-30, 1995.

ALZAMORA FILHO F., T. S. SOUZA , C. C. V. LIMA , I. FEHLBERG , A. C. ALCÂNTARA , M. M. FERREIRA , J. N. COSTA Tuberculose sistêmica em bezerro. **A Hora Veterinária** , v. 34, n 200, p. 30-32, 2014

AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 241-244, 2008

AMENI, G. , ASEFFA, A. , ENGERS, H. , YOUNG, D. , GORDON, S. , HEWINSON, G. , VORDERMEIER, M. High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. **Clinical and Vaccine Immunology** : CVI14, p.1356-1361. , 2007

ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.39, p.175-186, 1993

ARANAZ A., LIEBANA E., MATEOS A., DOMINGUEZ L., VIDAL D., DOMINGO M., GONZALEZ-LLAMAZARES O., RODRIGUEZ-FERRI E., BUNSCHOTTEN A., VAN EMNDEN JDA. Y COUSINS DV. , 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** 34(11):2734-40.

ARAÚJO, C.P. **Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cultura e sua identificação pela reação de polimerase em cadeia.** 2004, 52f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. Mato Grosso do Sul.

ARAUJO, C.P., C.Q.F. LEITE, K.A. PRINCE, K.S.G. JORGE, AND A.L.R. OSORIO, 2005: *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 100, 749–752.

AYELE, W. Y. NEILL SD, ZINSSTAG J, WEISS MG, PAVLIK I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.** v. 8, n. 8, p. 924–937, 2004

BAPTISTA, F., MOREIRA, E. C., & SANTOS, W. L. M. Relevance of tuberculosis among bovines slaughtered in Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 577-580, 2004

BARRERA L., PALOMINO, J.C., LEÃO, S.C., RITACCO, V. The basis of clinical bacteriology. In: Tuberculosis, 2007. p. 93-112. Disponível em: <http://www.tuberculosis2007.com/tuberculosis2007.pdf>

BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos.** São Paulo: Roca, 1998.p.178-183.

BELAS, A. E.; BOLIN, C. A.; GARDINER, J. C.; KANEENE J. B. A study on the persistence of *Mycobacterium bovis* in the environment under natural climatic conditions in Michigan, USA **Vet Inter Med** (2011) 765 430
<http://dx.doi.org.ez278.periodicos.capes.gov.br/10.4061/2011/76543> Article

BESSELL, P. R.; ORTON, R.; WHITE, P. C.; HUTCHINGS, M. R., & KAO, R. R. Risk factors for bovine tuberculosis at the national level in Great Britain. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 51, 2012

BIET, F.; BOSCHIROLI M.L; THOREL M.F; GUILLOTEAU L.A; Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*- intracellulare complex (MAC). **Veterinary Research**. v. 36, p. 411–436, 2005.

BOSE, M. Natural reservoir, zoonotic tuberculosis & interface with human tuberculosis: An unsolved question. Commentary. **Indian Journal of Medical Research**. v. 128, p. 4-6, 2008

BRASIL. **Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 1997. Acesso em 18 fev 2017. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 15 fev. 2017

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília-DF, 436p, 2008.

BRASIL. **Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA**, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/novo-regulamento-da-inspecao-de-produtos-de-origem-animal-reforca-seguranca-alimentar>>. Acesso em abril de 2018.

BRASIL. **Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agromais/agropecuaria-brasileira.html>> Acesso em 21 de julho de 2018

BRASIL. Norma Interna DAS n ° 02 de 30 de abril de 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. (Diário oficial)

_____. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n° 51. Diário Oficial da União, Brasília, 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 15 fev 2017

_____. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n° 6. Diário Oficial da União, Brasília, 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, Sec.1: 6-10. 2004. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 16 fev 2017

_____. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) - Manual Técnico. Brasília:

MAPA/DAS/DSA, p. 188, 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 18 mai 2018

_____. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 10, 3 março 2017. Diário Oficial da União, Brasília, Altera o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Seção 1: 5-7. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programasde-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/principais-normas-pncebt/in-10-de-3-de-marco-de2017-aprova-o-regulamento-tecnico-do-pncebt.pdf/view> Acesso em 17 abri. 2018

BRONWEN E., ANDRE M. FIONA D., JUDY P. PHILL E., SUE P. et al, (2018) Spreading of bovine TB by hunting hounds **Veterinary Record** **183**, 327-328.

CAMPOS S.S. 2008. Prevalência da tuberculose bovina. Revta Eletrônica do CESVA 1:245

CARVALHO RCT, FURLANETTO LV, DUARTE RS, NAKAZATO L, LILENBAUM W, FIGUEIREDO EES, et al. (2015) Molecular Diagnostic Testing on Post Mortem Inspection and Rulings on Bovine Tuberculosis—An **Experience Report in Brazil**. In: Ribon W, editor. Tuberculosis—Expanding Knowledge: InTech 191–211.

CARVALHO, R. C. T., VASCONCELLOS, S. E. G., DE AZEVEDO ISSA, M., SOARES FILHO, P. M., MOTA, P. M. P. C., DE ARAÚJO, F. R., & PASCHOALIN, V. M. Molecular typing of *Mycobacterium* Bovis from cattle reared in Midwest Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162459, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0162459

CAZOLA, D. D. O.; DOS SG JORGE, K.; ZUMÁRRAGA, M. J.; SOUZA-FILHO, A. F.; ARAÚJO, F. R., & OSÓRIO, A. L. A. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium* bovis em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 141-147, 2015, doi: 10.1590/S0100-736X2015000200008

COELHO, H.E. **Patologia Veterinária**. Barueri: Manole, 2002, 234p

COLLINS, D.M.; R ADFORD, A.J.; D E LISLE, G.W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.83-94, 1994.

CONSTABLE, P. D., HINCHCLIFF, K. W., DONE, S. H., GRUENBERG, W. **Veterinary Medicine** Edition A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats - two-volume set 11th, 2016

CORNER L.A., GORMLEY E., PFEIFFER D.U. (2012) the primary isolation of *Mycobacterium* bovis from bovine tissues: conditions to maximize the number of positive cultures. *Vet Microbiol* 156: 162-17110.1016/j.vetmic.2011.10.016 PubMed: 22074859 [PubMed]

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

CORREIA, M.; CORREIA, N.M. Tuberculose Bovina. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. Editora: MEDSI, 1992, p.317-337.

COSIVI O., GRANJA J., DABORN C., RAVIGLIONE M., FUJIKURA T., & COUSINS D. Tuberculose zoonótica devido a *Mycobacterium bovis* em países em desenvolvimento. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 59–70, 1998, pmid: 9452399

COSTA, A. C. F. **Tuberculose bovina: diagnóstico anatomo-histopatológico, bacteriológico e molecular em animais abatidos na Região Metropolitana de Salvador, Bahia**. Dissertação de Mestrado. Salvador, Bahia, 46 p. 2008

COSTA, A. C. F.; SILVA, N. S.; ROCHA, V. C. M.; RODRIGUEZ, C. A. R.; ESTRELA-LIMA, A.; MOREIRA, E. L. T.; MADRUGA, C.; ARRUDA, S. M.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA, M. C. A.; OLIVEIRA, E. M. de D. Tipificação genética, através da técnica de *spoligotyping*, de isolados de *Mycobacterium bovis* em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 77, n. 2, p. 233-237, 2010

COUSINS, D.V.; BATISTA R, CATALDI A, QUSE V, DOWN S, DUIGNAN P, MURRAY A, DUPONT C, AHMED N, COLLINS DM, BUTLER WR, DAWSON D, RODRIGUEZ D, LOUREIRO J, ROMANO MI, ALITO A, ZUMARRAGA M, BERANRDELLI A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1305-1314, 2003

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, n. 2, p. 77–109, 2006.

DINIZ, W.J.S.; ALMEIDA, R.B.; LIMA, C.N.; OLIVEIRA, R. R.; QUIRINO, W.A.; BRANDESPIM, D.F. Aspectos higiênicos da comercialização de carnes em feiras livres: a percepção do comerciante. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 294-299, 2013.

DOMINGO, M.; VIDAL, E.; MARCO, A. Pathology of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 9, p. 520-529, 2014.

DOWNES, S. H., BROUGHAN, J. M., GOODCHILD, A. V., UPTON, P. A., & DURR, P. A. Responses to diagnostic tests for bovine tuberculosis in dairy and non-dairy cattle naturally exposed to *Mycobacterium bovis* in Great Britain. **The Veterinary Journal**, v. 216, p. 8-17, 2016. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.06.010

DOWNES, S. H., PARRY, J. E., UPTON, P. A., BROUGHAN, J. M., GOODCHILD, A. V., NUÑEZ-GARCIA, J., ... & DE LA RUA-DOMENECH, R. Methodology and preliminary results of a systematic literature review of ante-mortem and post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis. **Preventive veterinary medicine**, v. 153, p. 117-126, 2018.

DUARTE, E. L.; DOMINGOS, M.; ALBUQUERQUE, T.; AMADO, A.; BOTELHO, A. Transmissão da tuberculose bovina entre espécies domésticas e silvestres em Portugal: primeiras evidências moleculares em isolados de *Mycobacterium bovis* de uma exploração no Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 299-303, 2007.

DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. Micobactérias. In: TRABULSI, R.L.; ATERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap.56.

EL-SAYED, A., EL-SHANNAT, S., KAMEL, M., CASTAÑEDA-VAZQUEZ, M.A., CASTAÑEDA-VAZQUEZ, H. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in humans and cattle. **Zoonoses and Public Health**, Indianapolis, v.63, n.4, p.251-264, 2015

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/gado-de-corte/busca-de-noticias/-/noticia/2334398/tuberculose-bovina-sequenciamento-genomico-permite-avancos-na-deteccao-da-doenca>>. Acesso: 17 de maio de 2018

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 9-13, 1997

FIGUEIREDO, S. M. et al . Tuberculose bovina no Estado da Paraíba: estudo retrospectivo. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 30, n. 9, p. 712-716, Sept. 2010 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-36X2010000900002&lng=en&nrm=iso>. access on 11 Apr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900002>.

FURLANETTO L.V., FIGUEIREDO E.E.S., CONTE JÚNIOR C.A., CARVALHO R.C.T., SILVA F.G.S., SILVA J.T., LILENBAUM W. & PASCHOALIN V.M.F. Uso de métodos complementares na inspeção post mortem de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 11, Nov. 2012 .

FUVERKI, R.B.N.; MURAKAMI, P.S.; BIONDO, A.W.; BARROS FILHO, I.R. Uso da PCR para detecção e identificação de micobactérias a partir de amostras clínicas de bovinos. **Archives Veterinary Science**, v. 13, n.1, p. 73-77, 2008

GALLAGHER, J. e CLIFTON-HADLEY, R. S. Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. **Research in Veterinary Science**, v. 69, n. 3, p. 203-217, 2000

GARNIER, T., EIGLMEIER, K., CAMUS, JC, MEDINA, N., MANSOOR, H., PRYOR, M., DUTHOY, S., GRONDIN, S., LACROIX, C., MONSEMPE, C., SIMON, S., HARRIS, B., ATKIN, R., DOGGETT, J., MAYES, R., KEATING, L., WHEELER, PR, PARKHILL, J., BARRELL, BG, COLE, ST, GORDON, SV, HEWINSON, R.G. A sequência completa do genoma de *Mycobacterium bovis*. **Proceedings da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América**, v. 100, p. 7877-7882, 2003

GHAVIDEL, M.; MANSURY, D.; NOURIAN, K., & GHAZVINI, K. The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing; a systematic review. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 310-315, 2018

GINGERAS, T.R.; GHANDOUR, G.; WANG, E. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. **Genome Research**, v.8, p.435-438, 1998

GOOD, M., BAKKER, D., DUIGNAN, A., & COLLINS, D. M. The History of In Vivo Tuberculin Testing in Bovines: Tuberculosis, a “One Health” Issue. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, p. 59, 2018

GORMLEY, E. ; CORNER, L.A.L. ; COSTELLO, E. ; RODRIGUEZ-CAMPOS, S. Bacteriological diagnosis and molecular typing de *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* • Show more DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.04.010 **Research in Veterinary Science**, 2014

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

GRISI FILHO, J. H. H.; ROSALES, C. A. R.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J.S. Análise epidemiológica das condenações de bovinos por tuberculose em abatedouros do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.2, p.175- 181, 2011.

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

HALSE, T.; VINCENT E. ESCUYER V. E.; MUSSER K. A. Evaluation of a single tube Multiplex Real-Time PCR iferenciação members of the *Mycobacterium* tuberculosis complex in clinical specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, 2011, Vol.49(7), pp.2562-2567 [Periódico revisado por pares]

HARDIE, R.M.; W ATSON, J.M. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. **Epidemiology & Infection**, v.109, n.1, p.23-33, 1992.

HERNANDEZ, M. RODRÍGUEZ-LÁZARO D, ESTEVE T, PRAT S, PLA M. DEVELOPMENT of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. **Analytical Biochemistry**, v.323, p.164-170, 2003.

HOGAN et al. Requirements for CD4 T cell levels in acute *Mycobacterium bovis* strain bacille Calmette Guérin (BCG)-induced granulomas differ for optimal mycobacterial control versus granuloma formation. **International Immunology**. p. 1-7, 2007

HONG X.; HOPFINGERA. J. Construction, Molecular Modeling, and Simulation of *Mycobacterium* tuberculosis **Cell Walls**. *Biomacromolecules*. 2004.

HOPE JC, VILLARREAL-RAMOS B (2008) Bovine TB and the development of new vaccines. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 31: 77–100..

HUARD, R. C., FABRE, M., DE HAAS, P., LAZZARINI, L. C. O., VAN SOOLINGEN, D., COUSINS, D., AND L. HO, J. 2006. Novel genetic Polymorphisms that

Further Delineate the Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Journal of Bacteriology** 188: 4271-4287

HUARD, R. C.; OLIVEIRA L. C.; BUTLER W. D., SOOLINGEN D. VAN, HO JL 2003. Based on PCR to distinguish the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions method. **J. Clin.Microbiol.** 41 :1637-1650

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>. Acesso em 21/11/2018.

JANES, C.R., CORBETT, K.K., JONES, J.H. & TROSTLE, J. (2012). Emerging infectious diseases: the role of social sciences. *Lancet*, 380, 1884–1886.[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61725-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61725-5)

JORGE, K.S.G. **Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica**. 2011, 69p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande: Mato Grosso do Sul

KAMERBEEK J., SCHOOLS L., KOLK A., VAN AGTERVELD M., VAN SOOLINGEN D., KUIJPER S., BUNSCHOTEN A., MOLHUIZEN H., SHAW R., GOYAL M. & VAN EMBDEN J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n.4, p. 907-914, 1997

KANDUMA, E.; MCHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. A review. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.781-791, 2003.

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

KANTOR, I.N. & RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.5-14, 1994.

KEE SJ, KIM SM, KIM SH, SHIN MG, SHIN JH, SUH SP, et al *Multiplex* PCR assay for identification of mycobacterial species isolated from liquid cultures. **Chonnam Med J.** 2009; 45(1) :19–26

LAGO, L. P.; NAVARRO, Y. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review Darío García-de-Viedma **Research in Veterinary Science**, 2013

LATINI, M.D.S.; LATINI, O.A.; LOPEZ, M.L.; CECCONI, J.O. Tuberculosis bovina en seres humanos. **Revista Argentina del Torax**, v.51, p.13-16, 1990.

LAVAGNOLI, M. R.; AMORIM, B. M. de; MACHADO, G. P.; DEMONER, L. de C.; ZANINI, M. S.; ANTUNES, J. M. A. de P. Tuberculosis in bovines from Espírito Santo State. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 71-78, 2010

LILENBAUM, W. Atualização em Tuberculose Bovina. Uma mini revisão. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 22, n. 4, p.145-151, 2000

LISLE, G. W.; BENGIS, R. G.; SCHMITT, S. M.; O'BRIEN, D. J. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. **Revue scientifique et technique** (international Office of Epizootics). v. 21, n. 2, p. 317-334, 2002.

LOPES L.B., ALVES T.M., STYNEN A.P.R., MOTA P.M.P.C., LEITE R.C. & LAGE A.P. 2012. Parameter estimation and use of gamma interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(4):279-283. Embrapa Agrossilvipastoril, Rodovia MT 222, km 2,5, Caixa Postal 343, Sinop, MT 78.550-970, Brazil.

LOPES, C.A.R. **Prevalência de brucelose e tuberculose em bovinos abatidos sob inspeção estadual no município de Aracruz - Espírito Santo**. 2008, 34f. Monografia (Especialização em higiene e inspeção de produtos de origem animal). Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro

MARCONDES, A.G.; SHIKAMA, M.L.M; VASCONCELLOS, S.A.; BENITES, N.R.; MORAIS, Z.M.; ROXO, E. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006..

MARQUES, M.E.O. Controle da Tuberculose Bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro, ano VI, N. 10. Janeiro 2008. ISSN: 1679-7353.

MARTINS, M.T.X, LUCENA R.M. **Para ler as feiras livres de Barreiras: uma percepção sócio-cultural dos alunos de comunicação social da FASB/ INTERCOM**. In: Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciências da Comunicação. Salvador (BA); 2002. p. 1-13.

MASCARENHAS, G; DOLZANI, M.C.S. Feira Livre: Territorialidade Popular e Cultura na Metrópole Contemporânea. **Revista Eletrônica Ateliê Geográfico**, V.2, n 4 agosto/2008 UFG/IESA p. 72-87, 2008

MCKINLEY, T. J., LIPSCHUTZ-POWELL, D., MITCHELL, A. P., WOOD, J. L., & CONLAN, A. J. Risk factors and variations in detection of new bovine tuberculosis breakdowns via slaughterhouse surveillance in Great Britain. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198760, 2018

MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010 <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010005000002>.

MITCHELL, A. P., GREEN, L. E., CLIFTON-HADLEY, R., MAWDSLEY, J., SAYERS, R., & MEDLEY, G. F. Analysis of single intradermal comparative cervical test (SICCT) coverage in the GB cattle population. **Proceedings Society of Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine**, p. 70-86, 2006

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. The tuberculin test. **Vet. Microb.**, v.40, n.1-2, p.111-124, 1994.

MORAIS, Ione Rodrigues; Araújo Marcos Antônio de. Territorialidade e Sociabilidade na Feira-Livre de Coicó (RN). **In. Caminhos de Geografia**. V.7n7 (2006). Disponível em <http://www.ig.ufu.br/revista/caminhos.html>.

MORATO, F. **Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos utilizando a técnica de cultivo em camada de Agar Middlebrook 7H11**. 2007, 84f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. São Paulo: São Paulo

MOTA, P.M.P.C.; LOBATO, F.C.F., ASSIS, R.A. et al. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.4, p.1-3, 2001

MURAKAMI, P. S; FUVERKI, R. B. N; NAKATANI, S. M; FILHO4, I. R. B; BIONDO5, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 67-74, jan./jun. 2009.

NEILL SD, SKUCE RA, POLLOCK JM (2005) Tuberculosis – new light from an old window. **Journal of Applied Microbiology** 98: 1261–1269

NEILL, S. D.; BRYSON, D. G; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in Cattle. **Tuberculosis**. v. 81, n. 1/2, p. 79-86, 2001

NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON , D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1/2, p.41-52, 1994.

NÉSPOLI, J. M. B. **Situação epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso**. 2012. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NOORDHOEK, G.T.; KOLK, A.H.; BJUNE, G.; CATTY, D; DALE, J.W.; FINE, P.E.; GODFREY-FAUSSETT, P.; CHO, S.N.; SHINNICK, T.; SVENSON, S.B. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.2, p. 277-284, 1994.

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

OIE, World Organisation for Animal Health-. , 2009. Bovine Tuberculosis. The tuberculin test. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th ed, 6-7.

OIE, World Organisation for Animal Health-<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Bovine-tuberculosis/> Acesso em 12 out de 2018

OIE, World Organisation for Animal Health-WAHID Interface, 2007. Available from: <http://www.oie.int/wahid-prod/public.php>. (Acesso 05 Set 2017)

OLIVEIRA, V.M.; FONSECA, A.H.; PEREIRA, M.J.S.; CARNEIRO, A.V.; JESUS, V.L.T.; ALVES, P.A.M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3; p. 574-579, 2008.

OMER, M.K.; SKJERVE, E.; WOLDCHIWET, Z. et al. A cross-sectional study of bovine tuberculosis in dairy farms in Asmara, Eritrea. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.33, n. 4, p. 295-303, 2001

ORDÓÑEZ, P.T.; FLORES, M.A.S.; SUAZO, F.M.; CASILLAS, I.C.R. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. **Veterinária**, México, v. 30, n. 3, p. 227-229, 1999

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P. Isolamento de *Mycobacterium* spp. do leite de vacas suspeitas e positivas para tuberculose. **Brazilian Journal Veterinary Reseach Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001

PARRA A, GARCÍA N, GARCÍA A, LACOMBE A, MORENO F, FREIRE F, MORAN J, HERMOSO DE MENDOZA J. (2008) Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Vet Microbiol** 127: 10.1016/j.vetmic.2007.09.001 315-324 PubMed: 17954014 [PubMed]

PARSONS LM, BROSCHE R, COLE ST et al (2002). Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. **J. Clin. Microbiol**; 40: 2339–2345

PAYNE, A., BOSCHIROLI, M.L., GUENEAU, E., MOYEN, J.L., RAMBAUD, T., DUFOUR, B., GILOT-FROMONT, E. AND HARS, J. Bovine tuberculosis in “Eurasian” badgers (*Meles meles*) in France. **European journal of wildlife research**, v. 59, n. 3, p. 331-339, 2013

PERREZ, A.M.; WARD, M.P.; TORRES, P.; RITACCO, V. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, p. 63-74, 2002

PFYFFER GE *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection and staining procedures. In: Murray PR, Barron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, (eds). Manual of clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC: **American Society for Microbiology**. 2007; p 543–572

PINTO, P.S.A. Atualização em controle da tuberculose no contexto da inspeção de carnes. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 115- 121, 2003.

PINTO, P.S.A.; FARIA, J.E.; VILORIA, M.I.V.; BEVILACQUA P.D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 3, n. 1, p. 10 - 15, 2002.

POLLOCK, J. M & NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. **The veterinary Journal**. v. 163, p.115-127, 2002.

PRODINGER, W. M. et al. Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 4984–4992, 2005

PRODINGER, W. M. et al. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 2270– 2272, 2002

PYM, A. S. et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 709-717, 2002

RADOSTITS, O. M.; GA Y, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 817-827.

RAMÍREZ-VILLAESCUSA, A. M.; MEDLEY, G. F.; MASON, S.; GREEN, L. E. Risk factors for herd breakdown with bovine tuberculosis in 148 cattle herds in the South West of England. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, n. 3-4, p. 224-230, 2010

RAMOS D.F., SILVA A.B.S., FAGUNDES M.Q., VON-GROLL A., SILVA P.E., DELLAGOSTIN O.A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the south of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 657-660, 2014, pmid:25242955

RAMOS, J. M., HEINEMANN, M. B., FERREIRA NETO, J. S., SOUZA FILHO, A. F. D., CÁRDENAS, N. C., DANTAS, A. F. M., ALVES, J.C., AZEVEDO, S. S. D. Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* in bovines with positive reaction to the tuberculin test in the state of Paraíba, northeast Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018

RIBEIRO, A.R.P.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V.; FARIA, E.S.; SILVA, J.A. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, 2003.

RIBEIRO, D. C. **Comparação de protocolos de extração de DNA para detecção de *Mycobacterium bovis* através da PCR em homogeneizados de órgãos bovinos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-07032007-115429/>. Acesso em 2016-05-17

RIBEIRO, E. M.; ÂNGULO, J.L.G; NORONHA, A. B; CASTRO, B.S; GALIZONI, F.M.;CALIXTO,J.S., SILVESTRE, L.H. A feira e o trabalho rural no Alto Jequitinhonha:

umestudo de caso em Turmalina, Minas Gerais. **Unimontes científica**. Montes Claros, v.5, n.1, jan./jun. 2003.

RICHARDSON, I. W., BRADLEY, D. G., HIGGINS, I. M., MORE, S. J., MCCLURE, J., & BERRY, D. P. Variance components for susceptibility to *Mycobacterium bovis* infection in dairy and beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 46, n. 1, p. 77, 2014

RICHOMME, C., BOSCHIROLI, M.L., HARS, J., CASABIANCA, F. AND DUCROT, C. Bovine tuberculosis in livestock and wild boar on the Mediterranean island, Corsica. **J Wildl Dis**, v. 46, p. 627–631, 2010

ROCHA, A., ELIAS, A. R., SOBRAL, L. F., SOARES, D. F., SANTOS, A. C., MARSICO, A. G... & FONSECA, L. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. **Tuberculosis**, v. 91, n. 1, p. 14-21, 2011.

RODRIGUEZ C.A.R. 2005. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos**. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. São Paulo. 86p.

RODRIGUEZ, S., BEZOS, J., ROMERO, B., DE, J.L., ALVAREZ, J., CASTELLANOS, E., MOYA, N., LOZANO, F., JAVED, M.T., SAEZ-LLORENTE, J.L., LIEBANA, E., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L., ARANAZ, A. *Mycobacterium caprae* Infection in Livestock and Wildlife, Spain. **Emerg.Infect.Dis**. v. 17, p. 532-535, 2011

RODRIGUEZ-CAMPOS S., ARANAZ A., JUAN L., SÁEZ-LLORENTE J.L., ROMERO B., BEZOS J., JIMÉNEZ A., MATEOS A. & DOMINGUEZ, L. 2011. Limitations of *Spoligotyping* and Variable-Number Tandem-Repeat Typing for Molecular Tracing of *Mycobacterium bovis* in a High-Diversity Setting. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3361-3364.

RODWELL T. C, MOORE M., MOSER K. S, BRODINE S. K, STRATHDEE S. A 2008. Tuberculosis for *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. **Emerg. Infect. Dis.** 14 :909-916

ROMERO B., RODRÍGUEZ S., BEZOS J., DÍAZ R., COPANO M.F., MEREDIZ I., MÍNGUEZ O., MARQUÉS S., PALACIOS J.J., VIEDMA D.G., SÁEZ J.L., MATEOS A., ARANAZ A., DOMÍNGUEZ L. & JUAN L. 2011. Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. **Emerg. Infect. Dis.** 17(12):2393-2395.

ROXO, E. Tuberculose bovina: revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.63, n.2, p. 91-97, 1996

ROXO, E., 2005. Situação Atual da tuberculose bovina no Brasil. Plano Nacional de Controle e erradicação da brucelose e tuberculose, tuberculose PNCE bovina (Plano nacional para o controle e erradicação da tuberculose e brucelose bovinas). Secretaria de Defesa Agropecuária. Docum. PNCE tuberculose bovina DDD2005, São Paulo, pp 1-5.

RUGGIERO, A. P, A.A. IKUNO, V.C.A. FERREIRA, E. ROXO **Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico** 1Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Departamento de Medicina Preventiva, Campus Universitário

“Darcy Ribeiro”, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.1, p.55-65, jan./mar., 2007

SALAZAR, F. H. P. **Ocorrência da tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigorífico no Estado do Mato Grosso, Brasil.** Dissertação de Mestrado. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 73 p. 2005.

SANT’ANNA, C.C.; FONSECA, L.S.; SAAD, M.H.F. Relação entre o diagnóstico sorológico (ELISA) e a gravidade da tuberculose pulmonar na infância. ISSN 0037-8682. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822001000600006> **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 34, n. 6, p.531-535, 2001

SAYURI, Camila. As melhores feiras do Brasil, Disponível em as+melhores+feirinhas+do+brasil+9498072.html: . Acessado em 10 jan 2019

SCHULTZ, M. (2008). Photo quiz. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), 1479–1481. <https://doi.org/10.3201/eid1409.080667>

SHITAYE J.E., GETAHUN B., ALEMAYEHU T., SKORIC M., TREML F., FICTUM P., VRBAS V. & PAVLIK I. A prevalence study of bovine tuberculosis by using abattoir meat inspection and tuberculin skin testing data, histopathological and IS6110 PCR examination of tissues with tuberculous lesions in cattle in Ethiopia. **Vet. Med. Czech.** v. 51, n. 11, p. 512-522, 2006

SILVA FILHO A.B., PONTES, J. F., MEDEIROS FILHO, M., SANTOS, M. P. L., CARNEIRO, R., SILVA, T. B., ALMEIDA, T. J. O., SILVA, A. F. A. Percepção do consumidor sobre a higiene na comercialização de carnes em feira livre da cidade de Garanhuns – PE **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** (v.12, n.4) p. 428-436 out - dez 2018

SKORIC, M. Tuberculous and tuberculoid lesions in free living small terrestrial mammals and the risk of infection to humans and animals: a review. **Veterinarni Medicina.** v. 52, n. 4, p. 144–161, 2007.

SKUCE, R. A.; ALLEN, A. R.; MCDOWELL, S. WJ. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. **Veterinary Medicine International**, v. 2012, 2012

SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos.** São Paulo: Manole, 1993, v. 1 e v. 2, p. 620, 621, 1218.

SMITH, B. P. **Medicina interna de grandes animais.** 3.ed. São Paulo: Manole, 2006.

SMITH, N. H. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. **Infection Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 857-865, 2011

SOUSA JPC; RODRIGUES AM; EXPOSTO F. *Mycobacterium*. In: Ferreira WF, Sousa JC. **Microbiologia.** Lisboa: Lidel. 2000; Vol 2 p 85-98

SOUZA, A.V., SOUZA, C.F.A., SOUZA, R.M., RIBEIRO, R.M.P., OLIVEIRA, A.L. (1999) A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene Alimentar**, 13 (59).

TAYLOR, T.B.; P ATTERSON, C.; HALE, Y.; S AFRANEK, W.W. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.79-85, 1997

THOMAS, L.H. No evidence to suggest foxhounds spread bovine TB. **Veterinary Record**, v. 183, n. 10, p. 329-329, 2018

UEYAMA, M ; CHIKAMATSU, K ; AONO, A ; MURASE, Y ; KUSE, N ; ORIMOTO, K ; OKUMURA, M ; YOSHIYAMA, T ; OGATA, H ; YOSHIMORI, K ; KUDOH, S ; AZUMA, A ; GEMMA, A ; MITARAI, S Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from patients with tuberculosis in Japan. **Tuberculosis**, 2014, Vol.94(1), pp.15-19

USABIAGA, J. **Brucelosis y tuberculosis bovina: ¿control o eliminación?** São Paulo: OMS, 2001. (RIMS A 12/15).

VAN INGEN J; RAHIM Z; MULDER A; BOEREE MJ; SIMEONE R et al. (2012) Characterization of *Mycobacterium* *oryzidis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 18: 653-655. 10.3201/eid1804.110888PubMed: 22469053

VERDANA, V. **"Fazer a Feira": estudo etnográfico das "artes de fazer" de feirantes e fregueses da Feira Livre da Epatur no contexto da paisagem urbana de Porto Alegre. 2004.** 251 f. Dissertação (Mestrado em Antropologia Social) - Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

VISAVET Health Surveillance Centre
<https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/bovine-tb/> Acesso em 12 mai 2018

WARREN, R. M. et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 10 n. 7, p: 818–822, 2006.

WATERS, W. R., THACKER, T. C., NELSON, J. T., DICARLO, D. M., MAGGIOLI, M. F., GREENWALD, R., & PALMER, M. V. Virulence of two strains of *Mycobacterium bovis* in cattle following aerosol infection. **Journal of comparative pathology**, v. 151, n. 4, p. 410-419, 2014

WATRELOT-VIRIEUX, D., DREVON-GAILLOT, E., TOUSSAINT, Y., & BELLI, P. Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 53, n. 7, p. 321-325, 2006

WHELAN AO, COAD M, COCKLE PJ, HEWINSON G, M VORDERMEIER et al. (2010) Revisiting host preference in the *Mycobacterium tuberculosis* complex: experimental infection shows *M. tuberculosis* H37Rv to be avirulent in cattle. **PLoS ONE**

WHO, World Health Organization. The challenges of preventing bovine tuberculosis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 96, n. 2, p. 82-84, 2018. doi: 10.2471/BLT.18.020218

WIELER, L. H. (2014). “One Health” – Linking human, animal and environmental health. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 775–776

WIKER, H. G. MPB70 and MPB83 – Major Antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian Journal of Immunology*. v. 69, p. 492–499, 2009.

WILSMORE T., TAYLOR N. Bovine Tuberculosis: an update. *Veterinary Epidemiology and Economics Research Unit, University of Reading, UK*. p. 132, 2008

WOOD P.R. & JONES S.L. 2001. BOVIGAMTM: An in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis** 81(1/2):147-155.

WOOD P.R., ROTHEL J.S., MCWATHERS P.G.D. & JONES S.L. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. **Vet. Immun. Immunopathol.** 25:37-46.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Tuberculosis Control: a short update to the 2009 report. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/en/index.html>. Acesso em: 09 ago. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2018. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ Acesso 15 out 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global tuberculosis Report 2013. Geneva: WHO, 2013

WRIGHT, D. M., ALLEN, A. R., MALLON, T. R., MCDOWELL, S. W., BISHOP, S. C., GLASS, E. J., & SKUCE, R. A. Field-isolated genotypes of *Mycobacterium bovis* vary in virulence and influence case pathology but do not affect outbreak size. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74503, 2013.

WULF, A. (2016). A invenção da natureza: a vida e as descobertas de Alexander Von Humboldt (1st ed.). São Paulo: Editora Planeta do Brasil

ZANDEN, A.G.M. **Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis and control of tuberculosis.**, 2002. p.12-45. Tese (Doutorado) - Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen, 2002.

ZANELLA G; DUVAUCHELLE J.H; MOUTOU M.L; DURAND, B (2008) Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. **Vet Rec** 163(2):43–47

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; FIORAVANTI, R.L.; R OXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M.I.; C ATALDI, A.; S ALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph

node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by *spoligotyping* and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.6, p.2809-2813, 2001.

ZHANG, J., ABADIA, E., REFREGIER, G., TAJAJ, S., BOSCHIROLI, M. L., GUILLARD, B., & SOLA, C.. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of '*spoligotyping*' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 3, p. 285-294, 2010

ZUMÁRRAGA, M. J.; PAOLICCHI, F.; GARBACCIO, S.; GIOFFRÉ, A. Aplicación de la PCR em detección de *Mycobacterium bovis* em muestras de tejido de terneros. **Veterinaria Argentina**, v. 28, n. 179, p. 668-676, 2001.