



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**BRUNO RIBEIRO DOS SANTOS**

**DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DA BAHIA PELA  
TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX**

**ILHÉUS – BAHIA**

**2022**

**BRUNO RIBEIRO DOS SANTOS**

**DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DA BAHIA PELA  
TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de  
Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção  
Do título de Mestre em Ciência Animal.

Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Bianca Mendes Maciel

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Alzamora Filho

**ILHÉUS – BAHIA**

**2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ - UESC**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPP**  
**SECRETARIA GERAL DE CURSOS - SECREGE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ATA DE DEFESA PÚBLICA Nº 173

DISSERTAÇÃO DE **BRUNO RIBEIRO DOS SANTOS**

NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL *stricto sensu* – ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA ANIMAL – NÍVEL: MESTRADO ACADÊMICO.

Aos DEZOITO dias do mês de FEVEREIRO de dois mil e VINTE E DOIS, às OITO HORAS E TRINTA MINUTOS, através de videoconferência, reuniu-se a comissão examinadora composta pelos Doutores POLIANA DE CASTRO MELO, JOSELITO NUNES COSTA e FERNANDO ALZAMORA FILHO examinadores, e por mim BIANCA MENDES MACIEL, orientadora, para julgar o trabalho intitulado: "**DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DA BAHIA PELA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX**", de autoria de BRUNO RIBEIRO DOS SANTOS. Após análise prévia pela banca, bem como arguição do candidato por essa mesma banca, chegou-se à conclusão de que a dissertação está APROVADA, sendo essa uma das etapas necessárias à emissão do diploma. A emissão do diploma está condicionada à entrega ao Colegiado PPGCA da versão final da dissertação, sob a supervisão do orientador e demais documentos exigidos pelo regimento.

*Campus Prof. Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Bahia, 18 de FEVEREIRO de 2022.*



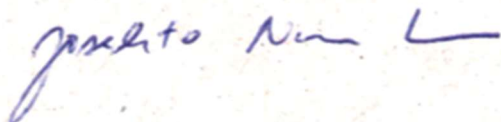
---

**BIANCA MENDES MACIEL - DSc.**  
**UESC/PPGCA**  
**(Orientadora)**



---

**FERNANDO ALZAMORA FILHO - DSc.**  
**UESC**  
**Examinador**



---

**JOSELITO NUNES COSTA - DSc.**  
**UFRB**  
**Examinadora**



---

**POLIANA DE CASTRO MELO - DSc.**  
**UESC**  
**Examinadora**

Dedico este trabalho a minha Irmã, Daniela Cristina, que para sempre permanecerá em nossos corações.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e todos aqueles que contribuíram para que eu conseguisse concluir esta etapa da minha vida.

Aos meus familiares, em especial as minhas Mães Vitória Batista e Jaciara Ribeiro e aos meus pais Valdeci Santos e José Raimundo que sempre me deram apoio e incentivo ao longo dessa jornada.

Aos meus irmãos e irmãs que sempre estiveram ao meu lado no que fosse necessário.

Aos meus orientadores Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Mendes Maciel e ao Prof. Dr. Fernando Alzamora Filho por todo comprometimento, acompanhamento e apoio durante os desafios apresentados ao longo do projeto.

Ao quadro de professores incríveis que compõe o Programa de Pós-Graduação e Ciência Animal – PPGCA da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.

À Agência de Defesa Agropecuária da Bahia – ADAB pela parceria ao Laboratório de Micobacteriologia da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, que favoreceu a execução do projeto e possibilitou alcançar os resultados esperados.

À CAPES pelo importante auxílio financeiro.

## DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DA BAHIA PELA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX

### RESUMO

O Estado da Bahia possui o nono maior rebanho bovino do país, correspondendo a 5,5% de toda produção nacional. Dentre os agravos que podem acometer o rebanho, a tuberculose bovina se destaca por ser uma enfermidade zoonótica de curso crônico, que causa prejuízos à saúde pública e perdas econômicas consideráveis ao mercado produtor e exportador de carne bovina do mundo. Uma medida para auxiliar na vigilância e diagnóstico da doença é a detecção de lesões suspeitas de tuberculose através do sistema de inspeção implantado nos matadouros frigoríficos, que encaminham os achados *post mortem* à laboratórios especializados para confirmação do agente *Mycobacterium bovis* através de testes complementares. Objetivou-se com este trabalho investigar a prevalência da tuberculose bovina, através do isolamento bacteriológico seguido da técnica de PCR *multiplex* em fragmentos presuntivos de tuberculose encontrados em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos com inspeção oficial no estado da Bahia. Foram investigadas 996.298 carcaças de bovinos com serviço de inspeção estadual / federal entre o período de março de 2020 a dezembro de 2021, onde coletou-se 42 amostras provenientes de 30 municípios, dentre as quais 32 animais (0,0003%) apresentaram lesões sugestivas de tuberculose. Das 42 amostras, 26,2 % (11/42) apresentaram crescimento em meio de cultura seletivo para *M. bovis* e 90,9% (10/11) dos esfregaços evidenciaram bacilos álcool – ácidos resistentes (BAAR). Os isolados BAAR foram submetidas a PCR *multiplex* no qual foi confirmada a presença do agente *Mycobacterium bovis* em 100% (10/10) das amostras. Essa técnica molecular, associada aos exames *post-mortem* e bacteriológico, revelou a presença da enfermidade no estado e possibilitou um diagnóstico mais fidedigno. As informações sobre esses indicadores epidemiológicos, possibilita que as instituições competentes possam planejar ações que visem rastrear, controlar e monitorar a tuberculose bovina, evitando assim, possíveis surtos zoonóticos que possam vir a agravar a população e causar prejuízos econômicos como gastos em saúde pública.

**Palavra-chave:** Inspeção; *Mycobacterium bovis*; PCR *multiplex*; Vigilância Epidemiológica; Saúde Pública, Zoonoses;

## DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS IN THE STATE OF BAHIA BY THE MULTIPLEX PCR TECHNIQUE

### ABSTRACT

The State of Bahia has the ninth largest bovine herd in the country, corresponding to 5.5% of all national production. Among the diseases that can affect the herd, bovine tuberculosis stands out for being a chronic zoonotic disease, which causes countless damages to public health and considerable economic losses to the world's beef producer and exporter market. One measure to assist in the surveillance and diagnosis of the disease is the detection of suspected tuberculosis lesions through the inspection system implemented in slaughterhouses, which forward post-mortem findings to specialized laboratories for confirmation of the *Mycobacterium bovis* agent through complementary tests. The objective of this study was to investigate the prevalence of bovine tuberculosis, through the application of the multiplex PCR technique and bacteriological isolation, in presumptive tuberculosis fragments found in slaughtered cattle slaughterhouses with official inspection in the state of Bahia. A total of 996,298 bovine carcasses were investigated with state and federal inspection services between the period of March 2020 and December 2021, among which 32 animals (0.0003%) had lesions suggestive of tuberculosis, where 42 samples were collected from 30 municipalities. Of the 42 samples, 26.2% (11/42) showed growth in selective culture medium for *M. bovis* and 90.9% (10/11) of the smears showed alcohol-acid resistant bacilli (BAAR). BAAR isolates were submitted to multiplex PCR in which the presence of the agent *Mycobacterium bovis* was confirmed in 100% (10/10) of the samples. This molecular technique, associated with post-mortem and bacteriological examinations, revealed the presence of the disease in the state and enabled a more accurate diagnosis. Having knowledge about these epidemiological indicators allows the competent institutions to plan actions aimed at tracking, controlling and monitoring bovine tuberculosis, thus avoiding possible zoonotic outbreaks that may aggravate the population and cause economic losses such as public health expenditure and disposal of infected animals.

**Keyword:** Epidemiological surveillance; Public health; Inspection; *multiplex* PCR; *Mycobacterium bovis*; zoonosis;

## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	OBJETIVO GERAL.....	11
3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
	4.1 Agente etiológico.....	14
	4.2 Patogênese e transmissão.....	14
	4.3 Diagnóstico.....	17
	4.4 Diagnóstico clínico.....	17
	4.5 Diagnóstico anatomopatológico.....	17
	4.6 Diagnóstico bacteriológico.....	18
	4.7 Diagnóstico molecular por PCR.....	19
	4.8 Controle e prevenção.....	20
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
	5.1 Delineamento experimental.....	21
	5.2 Colheita e envio de amostras.....	21
	5.3 Processamento das lesões e isolamento do <i>M. bovis</i> .....	21
	5.4 Extração de DNA para método de PCR.....	22
	5.5 Reação em Cadeia Polimerase (PCR) <i>multiplex</i> .....	22
	5.6 Análise estatística.....	23
6	RESULTADOS.....	24
7	DISCUSSÃO.....	30
8	CONCLUSÃO.....	33
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
10	REFERÊNCIAS.....	35
11	ANEXOS.....	42



## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde classifica a tuberculose bovina (TB) como uma zoonose que representa um problema de saúde pública de âmbito global, que afeta principalmente humanos, além de uma grande diversidade de espécies de animais domésticos e selvagens. Nos países em desenvolvimento esse problema se agrava, pois o conhecimento sobre a doença ainda é escasso, e essa falta de informação pode contribuir com o avanço e a disseminação de uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo.

A tuberculose bovina é uma enfermidade zoonótica de curso crônico causada pelo agente *Mycobacterium bovis*, pertencente ao *Complexo Mycobacterium tuberculosis*, sendo responsável pela maioria dos casos de tuberculose humana e animal. Essa enfermidade é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas nodulares, que podem afetar qualquer tecido ou órgão, porém, apresenta seletividade pelo trato respiratório, linfonodos, principalmente os mediastínicos, brônquios, e, ocasionalmente, por intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio (BRASIL, 2006; ALZAMORA et al., 2014).

A TB não é apenas um problema sanitário, mas também uma preocupação econômica nos quais os bovinos e bubalinos são as espécies mais afetadas pela enfermidade, levando à perdas econômicas consideráveis que podem chegar até 20% na redução da produção de leite e carne, condenações de carcaças, além de alterações reprodutivas. Esses animais estão intimamente ligados a fonte de renda para grande parte da população, e essa proximidade pode predispor a infecção dos indivíduos gerando custos a saúde pública com o tratamento.

O Brasil é um dos mais importantes produtores e exportadores de carne bovina do mundo, possuindo um rebanho comercial de 213,5 milhões de animais. O Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada afirma que, em 2019, a produção de bovinos de corte representou 1,2% do PIB total brasileiro, havendo um aumento significativo de 15% nas exportações de carne bovina (IBGE, 2019; CEPEA, 2019). Contudo, o setor pecuário enfrenta diversos desafios, dentre estes, a febre aftosa, tuberculose e brucelose, que lideram a prioridade de prevenção devido ao impacto no comércio internacional. Entretanto, a TB é a única que não possui vacina, o que dificulta a eficiência do seu controle (EMBRAPA, 2014). Diante disso, O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2001, implementou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e tuberculose - PNCEBT, com objetivo reduzir a prevalência e incidência da doença (COSTA, 2012; BRASIL, 2006).

O isolamento micobacteriano é considerado um teste “padrão ouro” para o diagnóstico da tuberculose (BRASIL, 2017). Porém, trata-se de uma técnica trabalhosa e tardia que pode levar meses para o seu resultado, atrasando no desenvolvimento de programas de saúde destinados ao controle e erradicação da doença, além de ser uma técnica que apresenta baixa sensibilidade. Com intuito de reduzir o tempo tardio para o isolamento e identificação do agente, as opções por métodos moleculares tornaram-se cada vez mais favoráveis (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015; DE ALMEIDA FRÁGUAS, 2008).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) surge como um método efetivo e sensível implantado aos exames laboratoriais de tuberculose, evidenciando a origem das lesões sugestivas em carcaças inspecionadas nos frigoríficos, além da possibilidade de diagnosticar o agente causador a nível de espécie. Atualmente, os pesquisadores têm utilizado cada vez mais técnicas moleculares como PCR *multiplex* e PCR em tempo real, com o objetivo de realizar o diagnóstico da TB em um menor período, além da sua sensibilidade, variando de 50 a 100%, e especificidade de 95 a 100% (NOORDHOEK et al., 1994; RUGGIERO et al., 2007).

Assim, a detecção da enfermidade de forma mais precisa, através dos métodos de diagnósticos moleculares complementares, possibilitará a atuação da vigilância epidemiológica nos pontos focos da enfermidade e auxiliará a elucidar quais são as possíveis falhas apresentadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT. Além disso, permitirá a redução da disseminação da enfermidade no rebanho e, conseqüentemente, a diminuição das perdas econômicas causadas por condenação de carcaça. Dessa forma, será possível instituir as medidas de controle sanitário recomendadas pelas instituições competentes e evitar o surgimento de novos casos de zoonoses e riscos à saúde pública ocasionados pela tuberculose bovina no estado da Bahia.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Diagnosticar o agente *Mycobacterium bovis*, através do cultivo bacteriológico seguido da técnica de PCR *multiplex*, a partir de lesões sugestivas de tuberculose coletadas nos matadouros-frigoríficos do Estado da Bahia.

### 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar o agente *M. bovis*, através do cultivo bacteriológico a partir de lesões suspeitas de tuberculose identificadas durante a avaliação das carcaças de bovinos em abatedouros com registro de inspeção Estadual/Federal do Estado da Bahia.

- Aplicar a técnica de PCR multiplex, utilizando o DNA extraído diretamente das colônias sugestivas de *Mycobacterium* sp., para confirmar a espécie *M. bovis*.

- Estimar a prevalência da tuberculose bovina em carcaças de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos com inspeção estadual/federal nos municípios do Estado da Bahia.

- Informar a vigilância epidemiológica sobre os resultados encontrados, analisando os pontos de foco e as medidas necessárias para controle da tuberculose no estado.

#### 4 REVISÃO DE LITERATURA

O estado da Bahia ocupa o 5º lugar no ranking dos maiores estados do país, possuindo uma extensão territorial de 567.295 km<sup>2</sup>, podendo ser comparada ao espaço territorial da França com 632.734 km<sup>2</sup>. O estado é constituído por 417 municípios e uma população de 15,13 milhões de habitantes, sendo 67,12% urbana e 32,88% rural, representando 7,1% da população nacional (IBGE, 2021).

No ano de 2020, o Brasil notificou 66.819 casos novos de tuberculose, atingindo um coeficiente de incidência de 31,6 casos para cada 100 mil habitantes. Em 2019, foram registrados 4,5 mil óbitos pela doença, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes. No mesmo ano, a Bahia e outros 12 estados apresentaram índices de mortalidade próximo ou superior ao coeficiente do país, sendo que suas capitais também apresentaram os maiores coeficientes de mortalidade (BRASIL, 2021).

Durante o período de 2017 a 2021 foram notificados pelo Datasus (2021), 21.359 casos de tuberculose humana na Bahia. Comparando os dados do IBGE (2021) e Datasus (2021) os municípios com maiores índices populacionais são aqueles que apresentam maiores casos de notificações do estado (Quadro 1).

Quadro 1 – Comparação entre os índices populacionais e os casos de notificados de tuberculose humana no período de 2017 a 2021.

Ranking	Município	População/habitantes	Casos notificados
1º	Salvador	2,9 milhões	8.667
2º	Feira de Santana	624,107 mil	845
4º	Camaçari	309, 208 mil	366
6º	Itabuna	214,123 mil	662
10º	Ilhéus	157,639 mil	579

Fonte: adaptado de IBGE (2021) e DATASUS, 2021.

O tratamento convencional usado em humanos para combater a tuberculose é composto pelo "esquema de tríplice" (rifampicina, isoniazida e pirazinamida). Entretanto, para casos de infecções por *M. bovis* este tratamento deve ser reformulado, visto que essa micobactéria é naturalmente resistente a pirazinamida. Além disso, a interrupção do tratamento pode promover o desenvolvimento de cepas multidrogas resistentes de *M. bovis* (ABRAHÃO, 1999). No ano de 2020 foram notificados 913 casos de tuberculosos resistentes a drogas no país.

A pandemia pelo novo coronavírus em 2020, proporcionou um cenário atípico registrado pelo boletim epidemiológico anual de tuberculose, havendo uma queda acentuada da incidência e uma piora nos indicadores como abandono, queda das notificações e redução dos consumos de cartuchos de teste rápido molecular para tuberculose (TRM TB). Contudo, não se sabe ao certo como a pandemia pode ter influenciado na gravidade da enfermidade, ou se a alteração desses indicadores estaria atrelada aos aspectos operacionais, como sobrecarga dos sistemas de saúde, refletindo na qualidade dos dados (BRASIL, 2021).

#### 4.1 Agente etiológico

O gênero *Mycobacterium* é composto por bacilos aeróbios estritos, sem motilidade, cápsula ou flagelos; não formadores de esporos e álcool ácido resistentes (PFYFFER, 2007), medem de 0,5 a 7,0 µm de comprimento e cerca de 0,3 µm de largura (BRASIL, 2006). As micobactérias possuem em sua constituição uma parede celular bastante complexa, rica em lipídios (60% do peso seco da célula), o que irá atuar na morfologia da bactéria promovendo uma barreira contra ação dos agentes físicos e químicos, na patogenia das respectivas infecções, crescimento tardio das colônias e nas características hidrofóbicas em meios líquidos (DUCATI, BASSO e SANTOS 2004).

Estes patógenos são sensíveis a desinfetantes fenólicos a 5%, formólicos a 3%, álcoois a 70% e ao hipoclorito de sódio a 5%, porém, a concentração dos desinfetantes pode ser afetada pela concentração dos produtos, tempo de exposição, temperatura e matéria orgânica (MORRIS; PFEIFEER; JACKSON, 1994). Além destes, as micobactérias são destruídas pela pasteurização, luz solar direta em ambientes secos e calor úmido a 60°C (DUCATI, BASSO e SANTOS, 2004). Em relação a resistência, o agente consegue sobreviver em meios ácidos, álcalis e desinfetantes como amônio quartenária e clorexidina, (MORRIS; PFEIFEER; JACKSON, 1994) podendo também resistir no ambiente úmido e protegidos por luz solar como estábulos, pastos e esterco por até 2 anos; na água por até 1 ano, e até 10 meses em produtos de origem animal contaminados. Além disso, mostra-se moderadamente resistente ao calor, à dessecação e a uma das principais drogas antituberculosas, a pirazinamida (ABRAHÃO, 1999; SANTOS, 2019).

#### 4.2 Patogenia e transmissão

O *M. bovis* possui um complexo padrão epidemiológico e uma das maiores cadeias de hospedeiros entre todos os patógenos existentes, envolvendo seres humanos, animais domésticos e animais selvagens. Seu principal hospedeiro é o bovino que elimina o bacilo da tuberculose no leite, expectoração, corrimento nasal, fezes, urina, secreções vaginais e uterinas, e pelo sêmen. Sua

transmissão por via aerógena, através da inalação, corresponde até 90% da rota mais comum de infecção do rebanho, sendo esta, a via direta de infecção do homem e a indireta pela ingestão de leite e produtos lácteos não fervidos ou pasteurizados (ABRAHÃO, 1999). Além disso, o homem portador do bacilo do *M. bovis* pode reinfetar bovinos por contato próximo das vias respiratórias (GRANGE, 2001).

Os bacilos da tuberculose, quando inalados, geralmente se alojam nos espaços alveolares, onde são capturados pelos macrófagos. Dentro destes macrófagos, ligam-se às Receptores de Reconhecimento Padrão do fagócito, dos quais estão presentes o grupo de células *Toll-like* (CRUVINEL et al., 2010), e é fagocitado pelo mesmo, com o intuito de proteger o organismo. Após a ingestão, os lisossomos fundem-se com o fagossomo para formar um fagolisossomo, em uma tentativa para destruir o agente. Os bacilos virulentos conseguem escapar da destruição e sobreviver dentro de um macrófago mononuclear, inibindo a fusão do fagossomo com lisossomas pré-formados, limitando assim a acidificação do fagolisossomo (THOEN et al., 2016). Sugere-se que a patogenicidade do MTBC é um fenômeno multifatorial que requer a participação de múltiplos complexos glicolipídicos como o lipoarabinomanano que pode interferir na maturação do fagossomo (THOEN e BARLETTA, 2014).

O sistema de proteção contra infecções por micobactérias depende da ativação de uma resposta imune mediada por células. Citocinas inflamatórias, como interleucina 1 (IL - 1), IL - 2 e fator de necrose tumoral alfa (TNF -  $\alpha$ ), produzidas por células mononucleares sensibilizadas por antígenos micobacterianos recrutam células T *natural killer*, células T CD4, células T CD8 e Células T gama delta (OLSEN, BARLETTA e THOEN, 2010). Essas células produzem citocinas que são capazes de recrutar células adicionais para o local da infecção, resultando na formação de granulomas. A formação do granuloma é uma tentativa do hospedeiro de localizar o processo da doença. Em humanos, todavia, nos casos em que a resposta do hospedeiro é incapaz de combater o bacilo, devido a condições que comprometem a função imunológica, como senilidade, estresse ou reativação do HIV, pode ocorrer resultando na liberação do bacilo e na transmissão da infecção (THOEN et al., 2016).

Inúmeros fatores corroboram com a disseminação da tuberculose bovina, tanto na forma zoonótica quanto na contaminação ambiental. O *M. bovis* é capaz de infectar humanos através do contato direto com animais infectados durante o abate ou caça (BHEMBE, 2017), como também pelo consumo de leite não pasteurizados e produtos lácteos contaminados (SILAIGWANA et al.,

2012). Cerca de 41% do leite produzido no Brasil é produzido ilegalmente (SALES et al., 2014), sendo a via digestória a principal via de infecção nos casos de tuberculose extrapulmonar causada pelo *M. bovis* em humanos pelo consumo de leite e seus derivados não pasteurizados (CARVALHO, VASCONCELLOS e ISSA 2016). Harris (2007), Park (2010) e Silva (2013), descreveram a presença do bacilo em queijos associado a tuberculose humana. Cezar (2016), detectou o agente *M. bovis* por sequenciamento em amostras de queijos artesanais comercializados no estado de Pernambuco/PE. Rocha (2013), através da técnica de qRT-PCR, encontrou uma taxa de 10% de amostras positivas para *M. bovis* em produtos lácteos confeccionados com leite cru.

O abate clandestino de bovinos também se torna um importante meio de transmissão da tuberculose zoonótica. Além da ausência do médico veterinário qualificado para realizar a inspeção sanitária, coloca-se em risco a saúde alimentar, uma vez que a carne não fiscalizada está sendo comercializada ilegalmente. Ressalta-se também os maus tratos aos animais, utilização de mão de obra não especializada, aumento das despesas ao Sistema Único de Saúde (SUS) e a disseminação de zoonoses (SILVA, 2021). O Consumo dos produtos de origem animal não fiscalizados promove a disseminação de diversas doenças veiculadas por alimentos, e afeta diretamente o setor de saúde, o que acaba gerando gastos ao município. Diante disso, mesmo com as medidas legais vigentes, ainda se faz necessário a elaboração de normas e portarias para combater o abate ilegal (SILVEIRA et al., 2015).

Outro fator que pode ser determinante na disseminação do *M. bovis* entre os animais são as espécies de vida livre, que podem atuar como reservatórios do agente e irão introduzir ou reintroduzir a enfermidade nos rebanhos, podendo ser a principal via de infecção para bovinos de pasto em alguns países. Dentre essas espécies estão citados os texugos na Europa, o búfalo do Cabo, o gambá cauda-de-escova na Nova Zelândia e demais ruminantes na África (FERREIRA, 2019). Quinn (2007) reafirma que veados são susceptíveis e capazes de atuar como reservatórios da infecção para infectar bovinos. Glaser (2016), relacionou o surto de *M. bovis* no estado de Minnesota (Estados Unidos), em bovinos de corte que compartilham pastos com cervos-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) e evidenciou a existência de um ancestral comum nos isolados de *M. bovis*, que pode ter dado origem ao surto no período de 1999 e 2004. Além disso, também foram encontradas várias mutações de isolados de micobactérias em um mesmo rebanho, sendo justificado pela separação do rebanho durante as pastagens de verão.



### **4.3 Diagnóstico**

Os métodos de diagnóstico da tuberculose em bovinos podem ser realizados de forma direta ou indireta, por meio de várias técnicas que estão disponíveis atualmente. Dentre elas, métodos clínicos, anatomopatológicos, histopatológico, imunológicos, bacteriológicos e moleculares (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015). Apesar de muitos métodos terem sido desenvolvidos, nenhum deles pode ser empregado separadamente, sempre havendo a necessidades de técnicas complementares, com o objetivo de um diagnóstico fidedigno (COSIVI et al., 1998).

### **4.4 Diagnóstico clínico**

Em estágios avançados da enfermidade, quando presente nos bovinos, a sintomatologia clínica envolve os sinais respiratórios como tosse seca, curta e repetitiva; eliminação de secreção nasal e manifestação de dispneia; quando submetidos à marcha forçada, geralmente, tendem a posicionar-se atrás dos demais, demonstrando cansaço e baixa capacidade respiratória; além de emagrecimento progressivo, febre flutuante de baixo grau, fraqueza e inapetência (PAES e FRANCO, 2016). Pode haver aumento de linfonodos, podendo até mesmo causar obstrução de vias aéreas, trato digestório ou vasos sanguíneos. Quando há acometimento do trato digestório, algumas vezes pode-se manifestar por diarreia intermitente intercalada por períodos de constipação; caquexia acentuada e dispneia podem ocorrer durante a fase terminal (OIE, 2009). Segundo Cousins (2001), as infecções também podem permanecer inativas durante anos e serem reativadas durante períodos de estresse ou idade avançada.

Portanto, pode ser difícil diagnosticar tuberculose bovina com base apenas nos sinais clínicos, já que os mesmos não são patognomônicos e não permitem diferenciar a TB de outras doenças (RIET-CORRÊA e GARCIA, 2007), principalmente em países pouco desenvolvidos, onde o número de casos de animais com evidência clínica pode ser limitado ou ausente, sendo a maioria diagnosticada por testes de rotina ou achados nos matadouros (COUSINS, 2001). Entretanto, o diagnóstico clínico acaba se tornando importante nos estágios avançados da doença, pois os animais anérgicos apresentam uma queda da sensibilização ao teste tuberculínico (BRASIL, 2006).

### **4.5 Diagnóstico anatomopatológico**

Uma das principais ferramentas utilizada no diagnóstico da tuberculose bovina no Brasil é a inspeção sanitária realizada em matadouros–frigoríficos ou necropsia (FERREIRA, 2019). Por meio dessa prática, é possível identificar, rastrear e detectar focos de tuberculose bovina, através da

inspeção das lesões macroscópicas características em carcaças e órgãos (DIGUIMBAYEFDJAIBÉ et al., 2006). Contudo, se implantada isoladamente, essa técnica pode apresentar algumas limitações para determinar o diagnóstico da doença. Como citado anteriormente, alguns animais infectados podem não apresentar alterações clínicas visíveis nos tecidos inspecionados (TEKLU et al., 2004). Além disso, agentes como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Actinobacillus lignieresii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, fungos, parasitas e em alguns processos neoplásicos podem ser confundidos com tuberculose (OHARA, 2006).

Países com foco da enfermidade, mas que desempenham de forma satisfatória os serviços de inspeção nos matadouros, com infraestrutura adequada, profissionais qualificados e um sistema confiável de registro para rastrear o rebanho de origem, associado a um sólido programa de erradicação, têm conseguido diminuir a prevalência da doença (FERREIRA, 2019). Entretanto, nos matadouros menores, além de procedimentos inadequados, as lesões sugestivas podem passar despercebidas, por não haver tempo suficiente para examinar os órgãos e tecidos de forma detalhada (CORNER et al., 1990).

#### **4.6 Diagnóstico bacteriológico**

O isolamento bacteriano é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da enfermidade, porém apresenta baixa sensibilidade e necessita que as lesões apresentem uma concentração bacteriana igual ou superior a 10.000 unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Outro fator a destacar é o longo período de incubação necessário para o isolamento e identificação bioquímica, o que pode levar até 12 semanas para o diagnóstico definitivo (FERREIRA, 2019). O material coletado precisa ser submetido a protocolos de descontaminação para eliminar os microorganismos competitivos, contudo, o efeito tóxico das substâncias de descontaminação pode afetar a viabilidade da micobactéria, interferindo no processo de isolamento bacteriano (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015). Diante disso, o uso de *swabs* nasais como alternativa para reduzir a contaminação das amostras tem sido empregado, afim de aumentar a sensibilidade do método (AMBROSIO et al., 2008). Outra limitação para o cultivo de *M. bovis* é a dificuldade para obter amostras em necropsias e matadouros frigoríficos.

São recomendados para o isolamento do *M. bovis*, meios de cultura a base de ovo, principalmente, o meio Stonebrink-Leslie que possui o piruvato em sua composição, que é utilizado como fonte de substrato para as micobactérias. Após a inoculação nos meios específicos,

estes devem ser mantidos em incubação por até 90 dias à temperatura de 36 a 37°C, com o objetivo de observar o crescimento bacteriano (MARCONDES et al., 2006). A confirmação micobacteriana pode ser realizada por exames microscópicos através da coloração de Ziehl-Neelsen, caracterização fenotípica, testes bioquímicos e moleculares (ROWE e DONAGHY, 2008). O método de visualização de micobactérias através do método de Ziehl-Neelsen permite a pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) em concentrações superiores a 10.000 UFC/ mL. Trata-se de uma técnica bastante utilizada, mas apresenta baixa sensibilidade, além da impossibilidade de distinguir os membros da família *Mycobacteriaceae* de outros micro-organismos BAAR, como: *Corynebacterium* sp., *Nocardia* sp. e *Rhodococcus* sp. (PRITCHARD, 1988).

#### **4.7 Diagnóstico molecular por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

Com intuito de reduzir o tempo tardio para o diagnóstico, as opções por métodos moleculares tornaram-se cada vez mais favoráveis (DE ALMEIDA FRÁGUAS, 2008). Ruggiero et al. (2007) descrevem que a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) aparece com o objetivo de auxiliar os exames laboratoriais de tuberculose, evidenciando a origem das lesões sugestivas, principalmente em carcaças inspecionadas nos frigoríficos.

Buscando a identificação das micobactérias através da técnica de PCR, deve-se voltar a atenção principalmente em dois pontos: a escolha correta dos *primers* e a qualidade da técnica de extração do DNA (ZUMÁRRAGA et al., 2001). Quando há necessidade de realizar a diferenciação das espécies do MTBC, a PCR *multiplex* revela-se uma técnica interessante (KEE et al., 2009). Isso ocorre devido à possibilidade de, em uma mesma reação, empregar vários conjuntos de pares de *primers* específicos para determinadas regiões do genoma bacteriano (YEBOAH-MANU, YATES, e WILSON, 2001). Hernandez et al. (2003) destacam ainda a economia de tempo e de reagente utilizados nessa técnica. A literatura varia quanto à sensibilidade, relatando de 50 a 100% relacionado a falhas da execução da técnica, contudo a especificidade é alta, variando de 95 a 100% (NOORDHOEK et al., 1994; SANTOS, 2019).

A implementação de uma metodologia de diagnóstico molecular que possibilite a detecção rápida do *M. bovis* diretamente em amostras biológicas de lesões sugestivas de tuberculose se torna uma interessante alternativa para determinar a existência da doença, podendo ser utilizada na vigilância epidemiológica de animais abatidos em matadouro em programas de erradicação (FRANÇA, 2013). Entretanto, vários fatores podem interferir na PCR, principalmente quando se

utilizam amostras de lesões granulomatosas com tecido supurativo e inflamado e em diferentes estágios da infecção bacteriana, sujeitas à ação de possíveis inibidores da reação. (SICONELLI, 2017) Dentre estes, amostras clínicas, contendo a presença de sangue, hemoglobina, anticorpos, íons, restos celulares, proteínas, além de outros componentes que são utilizados ou são presentes durante a preparação da reação, como detergentes orgânicos e até mesmo o talco nas luvas (SCHRADER et al. (2012). Esses fatores acabam tornando-se empecilhos para a elaboração de técnicas que possam ser realizadas diretamente da lesão sugestiva de tuberculose bovina, e dessa forma, atrasando a padronização de uma técnica que possa ser replicada em laboratórios especializados.

#### **4.8 Controle e prevenção**

Para enfrentar os desafios associados a tuberculose bovina em uma tentativa global de controle, os profissionais de saúde humana e animal devem trabalhar juntos para a prevenção e o controle eficazes dessa enfermidade zoonótica (HOLLANDER e RABINOWITZ 2010). No Brasil, o método habitual de controle da TB consiste na realização da prova de tuberculina e no abate sanitário dos animais (SANTOS, 2019). Uma importante medida de controle é a monitoração de rebanhos por meio da detecção de lesões sugestivas de tuberculose, através do serviço de inspeção de carcaças no momento do abate dos animais. Os achados de matança presente nas carcaças e as vísceras suspeitas de tuberculose são informados ao Serviço de Defesa Oficial, como também, os animais reagentes positivos presuntivos de tuberculose, para que possa proceder ao abate sanitário. O programa não recomenda o tratamento dos animais com tuberculose, em virtude dos riscos em saúde pública das pessoas envolvidas com os animais, bem como do consumo de seus produtos infectados com micobactérias (BRASIL, 2006).

Portanto, pode-se considerar que uma inspeção sanitária eficiente associada à obtenção de resultados em tempo real, atrelada ao diagnóstico bacteriológico e molecular avançado, podem fornecer dados epidemiológicos para controle e erradicação desta enfermidade zoonótica (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento experimental

A pesquisa foi realizada através de uma ação conjunta entre a Agência de Defesa Agropecuária da Bahia – ADAB e o Laboratório de Micobacteriologia (LAMVET) do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, onde os matadouros–frigoríficos com registro de inspeção federal ou estadual acompanhados pela ADAB, encaminharam as amostras suspeitas de tuberculose para o LAMVET, na qual foram recebidas, processadas, isoladas, identificadas e elaborados os laudos dos resultados das análises.

### 5.2 Colheita e envio das amostras

Foram coletadas amostras de carcaças de bovinos condenadas durante a inspeção sanitária, com aspecto granulomatoso nodular sugestivas de tuberculose, no período de março de 2020 a agosto de 2021. Além disso, foi encaminhado aos matadouros/frigoríficos a guia de acompanhamento (Anexo 1), que foi preenchida com as informações provenientes desses animais, tais como: municípios de origem, local da fazenda, dados do proprietário, guia de transporte animal (GTA), município de abate, inspetor veterinário responsável, idade e sexo do animal, data da coleta da amostra, descrição do tecido/ órgão enviado e o número de fragmentos encaminhado.

Juntamente com a guia, também foram encaminhados tubos tipo Falcon (50mL) estéreis, devidamente identificados, contendo a solução saturada de tetraborato de sódio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 140g/L) utilizado como conservante, preservando as micobactérias por até 60 dias em temperatura ambiente.

As amostras enviadas eram oriundas de qualquer tecido ou órgão do animal que apresentaram lesões nodulares suspeitas, com tamanhos variados, contendo em seu interior exsudato caseoso, purulento, ou até mesmo calcificado, não havendo restrição para a quantidade de material coletado do mesmo animal. As amostras e suas respectivas guias de acompanhamento foram encaminhados ao Laboratório de Micobacteriologia da Universidade Estadual de Santa Cruz para realizar isolamento bacteriológico.

### 5.3 Processamento das lesões e isolamento do *M. bovis*

As amostras foram maceradas através de um processador mecânico, onde foi retirado um grama da lesão e em seguida foi adicionado 1 mL de Cloreto de 1- Hexadecilpiridínio (HPC) a

1,5% por 30 minutos, para a descontaminação e evitar concorrência pelo meio cultura por outros agentes. Logos após, as amostras são centrifugadas por 20 minutos a 3500 rpm. Ao termino descarta-se o sobrenadante e são semeadas em dois meios de cultura, sendo estes os meios Lowenstein-Jensen (LJ) e Stonebrink-Lesslie (ST) e incubadas a 37 °C, sendo observados semanalmente durante 90 dias.

As amostras que apresentaram crescimento de colônia nos meios de cultura, foram submetidas a coloração Ziehl Neelsen para verificar a presença dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

#### **5.4 Extração de DNA para o método de PCR**

Quando confirmada a presença BAAR, as colônias foram submetidas a uma suspensão bacteriana em 200 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8.0) para inativar a bactéria e realizar a extração de DNA por lise térmica através da incubação a 100°C por 40 min. Os extraídos do DNA genômico foram quantificados em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA), com posterior padronização do DNA, diluídas para 50ng e armazenados em caixas e acondicionados em freezer a -20°C.

#### **5.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) *multiplex***

A técnica de PCR *multiplex* foi realizada com a finalidade de identificar o *M. bovis* a partir das colônias isoladas. Para isso, realizou-se o método de PCR de *Mycobacterium* spp. descrito por Warren et al. (2006), utilizando os *primers* baseados nas regiões genômicas de diferença do complexo *Mycobacterium tuberculosis*: RD1, RD4, RD9 e RD12 (Tabela 1). Foram utilizados 4µL de cada amostra contendo 50ng de DNA, 0,2 Unidades da enzima HotStarTaq plus DNA polymerase (QIAGEN), 5,0 µL tampão de PCR, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer*.

**Tabela 1** – Sequência de primers com o tamanho dos pares de bases (pb) da região de diferença (RD) em 5 diferentes membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Sequência de primers	RD (pb)	<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. canetti</i>
AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC		RD1	RD1	RD1	RD1	RD1
CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG	RD1	presente	presente	presente	ausente	presente
GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG		(146 pb)	(146 pb)	(146 pb)	(196 pb)	(146 pb)
ATGTGCGAGCTGAGCGATG		RD4	RD4	RD4	RD4	RD4
TGTACTATGCTGACCCATGCG	RD4	presente	presente	ausente	ausente	presente
AAAGGAGCACCATCGTCCAC		(172 pb)	(172 pb)	(268 pb)	(268 pb)	(172 pb)
CAAGTTGCCGTTTCGAGCC		RD9	RD9	RD9	RD9	RD9
CAATGTTTGTGCGCTGC	RD9	presente	ausente	ausente	ausente	presente
GCTACCCTCGACCAAGTGTT		(235 pb)	(108 pb)	(108 pb)	(108 pb)	(235 pb)
GGGAGCCCAGCATTACCTC		RD12	RD12	RD12	RD12	RD12
GTGTTGCGGGAATTACTCGG	RD12	presente	ausente	ausente	ausente	ausente
AGCAGGAGCGGTTGGATATTC		(369 pb)	(306 pb)	(306 pb)	(306 pb)	ausente

Fonte: Adaptado de Warren, 2006.

Para os controles positivos utilizou-se DNA de *M. bovis* e *M. tuberculosis* já isolados e confirmados por PCR *multiplex*, pertencentes ao Laboratório de Micobactériologia, e os controles negativos utilizou-se água ultrapura. As reações foram realizadas em termociclador (Bio-Rad iCycler iQ5) sob as seguintes condições: incubação inicial a 95 °C por 5 minutos seguidos por 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (60V/cm) em gel de agarose 3% em tampão TBE 1X e visualizados por coloração com SYBR Safe 10.000 vezes diluído.

## 5.6 Análise estatística

Com o intuito de verificar se há relação entre o sexo (machos/fêmeas) e o índice de positividade, a frequência dos resultados positivos obtidos pelo cultivo bacteriológico seguido de PCR *multiplex* foi comparada pelo teste de Fisher a 5% de significância, baseada nas seguintes hipóteses:

**H0: Sexo = índice de animais positivos**

**H1: Sexo ≠ índice de animais positivos**

## **6 RESULTADOS**

Durante o período de março de 2020 a dezembro de 2021 foram inspecionadas 996.298 carcaças, sendo 991.316 bovinos e 4.981 bubalinos, das quais foram coletadas 42 lesões sugestivas de tuberculose, provenientes de 32 animais (0,0003%) e advindas de 28 municípios distintos do estado da Bahia (Tabela 2), apresentando uma incidência de  $9,033^{-6}$ . Os 32 animais sugestivos para TB possuíam idade entre 24 meses e acima de 36 meses.



**Tabela 2** – Origem dos municípios e tecidos encaminhados para análise.

<b>Municípios - origem</b>	<b>Nº de Amostras</b>	<b>Identificação (Nº do animal)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tecido</b>	<b>Isolamento bacteriano</b>
Aiquara - BA	1	Animal 1	F	Linfonodo	Negativa
Una - BA	3	Animal 2	F	Linfonodo	Negativa
Rafael Jambeiro - BA	2	Animal 3	M	Pulmão	Negativa
Itagibá - BA	2	Animal 4	M	Linfonodo	<b>Positiva</b>
Valente - BA	1	Animal 5	F	Linfonodo	Negativa
Jacobina - BA	1	Animal 6	F	Linfonodo	Negativa
Itapé - BA	1	Animal 7	F	Pulmão	Negativa
Itororó - BA	1	Animal 8	M	Linfonodo	Negativa
Salitre - CE	2	Animal 9	M	Linfonodo	Negativa
Tomar do Geru - SE	1	Animal 10	M	Linfonodo	<b>Positiva</b>
Ibiciuí - BA	1	Animal 11	M	Linfonodo	<b>Positiva</b>
Muquém do São Francisco - BA	1	Animal 12	M	Linfonodo	Negativa
Santaluz - BA	2	Animal 13	F	Língua Pulmão	Negativa
Ipiauí - BA	1	Animal 14	M	Linfonodo	Negativa
Jequié - BA	1	Animal 15	F	Linfonodo	Negativa
Gongogi - BA	2	Animal 16	F	Linfonodo Pulmão	Negativa
Itapetinga - BA	2	Animal 17	F	Pulmão Carcaça	<b>Positiva</b>
Laje - BA	2	Animal 18	F	Linfonodo Fígado	Negativa
Jaremoabo - BA	2	Animal 19	F	Linfonodo	Negativa
		Animal 20	F	Linfonodo	<b>Positiva</b>
Euclides da Cunha - BA	1	Animal 21	F	Fígado	<b>Positiva</b>
Barreiras - BA	1	Animal 22	M	Linfonodo	<b>Positiva</b>
Guaratinga - BA	1	Animal 23	F	Carcaça	Negativa
Santa Brígida - BA	1	Animal 24	F	Linfonodo	Negativa
Paulo Afonso - BA	1	Animal 25	M	Linfonodo	Negativa
Itapebi - BA	2	Animal 26	M	Linfonodo Estômago	Negativa
São Gonçalo dos Campos - BA	1	Animal 27	M	Linfonodo	<b>Positiva</b>
Teodoro Sampaio - BA	2	Animal 28	M	Linfonodo	<b>Positiva</b>
		Animal 29	M	Linfonodo	Negativa
Presidente Tancredo Neves - BA	1	Animal 30	F	Linfonodo	Negativa
Maiquinique - BA	1	Animal 31	F	Carcaça	Negativa
Jitaúna - BA	1	Animal 32	F	Linfonodo	Negativa
<b>Total</b>	30 municípios	42 amostras	32 animais	18 Fêmeas 14 Machos	9 Positivas 23 Negativas

Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

As lesões apresentavam aspecto granulomatoso, nodular, caseoso ou calcificado (Figura 1). Diante do número de lesões encaminhadas, pôde-se observar que os linfonodos corresponderam a maior parte dos tecidos, chegando a 69,04% (29/42) das amostras enviadas, seguidos por pulmão com 14,29% (6/42), carcaça 7,15% (3/42), fígado 4,76% (2/42), língua 2,38% (1/42) e estômago com 2,38% (1/42) (Figura 2).

Figura 1 - Recebimento e processamento da amostra.

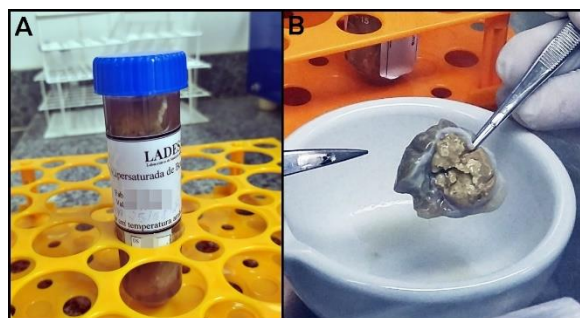
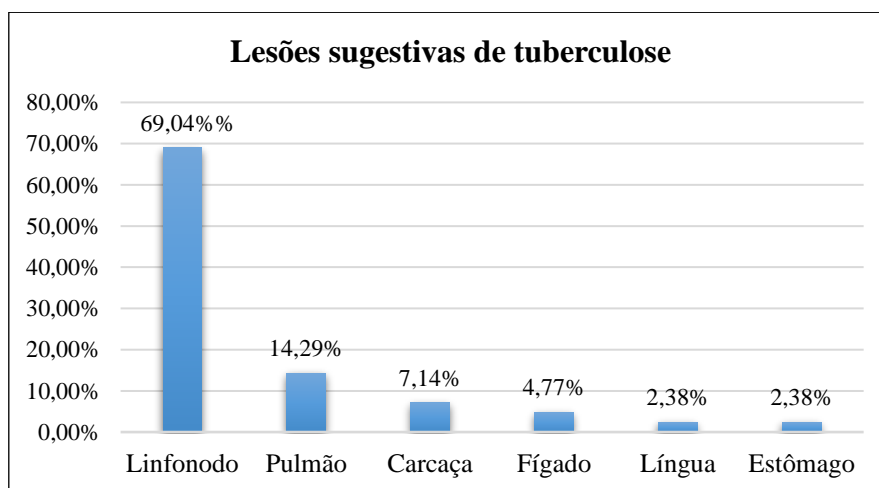


Figura 1: **A** - Recipiente contendo a amostra e a solução conservante de tetraborato de sódio. **B** - Linfonodo apresentando lesão granulomatosa nodular e circunscrita. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Figura 2 - Porcentagem de tecidos suspeitos de TB encaminhados durante o período de 2020 a 2021



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Das 42 amostras enviadas ao laboratório 11 (26,2%), provenientes de nove animais diferentes, apresentaram crescimento nos meios de cultura seletivos. As amostras positivas foram provenientes dos municípios de: Itagibá/BA, Tomar do Geru/SE, Ibicuí/BA, Gongoji/BA, Jaremoabo/BA, Euclides da Cunha/BA, Barreiras/BA, São Gonçalo dos Campos/BA e Teodoro Sampaio/BA (Figura 3). As colônias apresentaram coloração creme à amarelada, bordas

arredondadas, superfície rugosa e crescimento disgônico no meio de cultura, sendo que 100% cresceram somente no meio Stonebrink-Lesslie (ST) e apenas uma (9,1%) cresceu tanto no Stonebrink-Lesslie quanto no Lowenstein-Jensen (LJ) (Figura 4). Foi observado um tempo mínimo de 14 dias e máximo de 84 dias para formação das colônias, com uma média de 39 dias para o crescimento.

Figura 3 – Mapa da Bahia com os municípios amostrados para a pesquisa de *Mycobacterium bovis* através da cultura bacteriana e PCR multiplex.

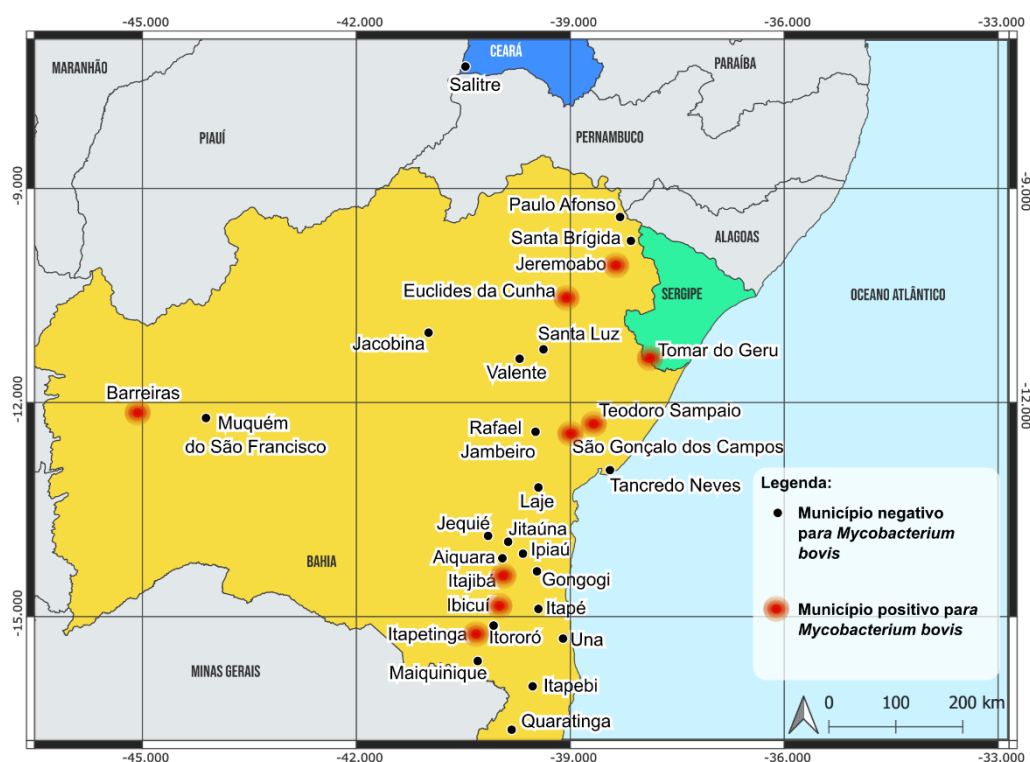
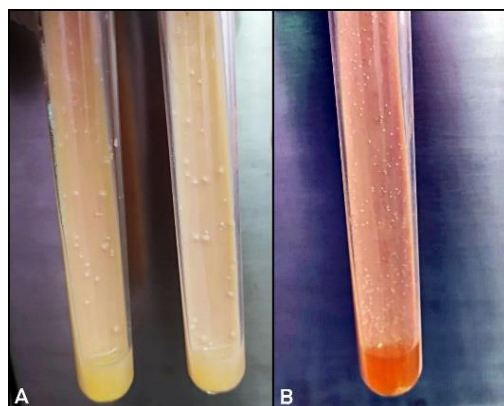


Figura 3 :Círculos pretos indicam os municípios negativos para a presença do agente *Mycobacterium bovis*; Círculos vermelhos municípios positivos para o *Mycobacterium bovis*. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Figura 4 – Cultura bacteriana.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Figura 4- A: Formação de colônias bacterianas positivas no meio Stonebrink-Lesslie. B: Formação colônias bacterianas positivas no meio Lowenstein-Jensen. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

As colônias positivas nos meios de cultura foram submetidas ao teste de coloração Ziehl-Neelsen (ZN) para confirmação dos BAAR, onde 90,9 % (10/11) foram positivas, sendo possível a visualização da presença dos bacilos de micobactérias, e 9,1% (1/ 11) negativas (Figura 5).

Figura 5 – Coloração Ziehl – Neelsen.

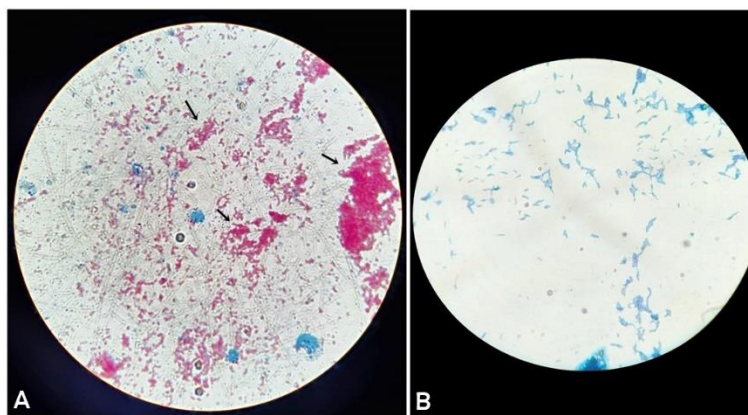


Figura 5: A: As setas indicam os bacilos de micobactérias (aumento de 1000x) corados em vermelho pela fucsina, confirmando a presença de bacilo álcool-ácido resistente. B: Resultado negativo, não são visualizadas micobactérias, e corados em azul podem ser visualizados outros microrganismos. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

A PCR *multiplex* foi realizada nas culturas com características tintoriais de bacilo álcool ácido resistentes, onde 100% (10/10) das amostras apresentaram ampliações das regiões RD1, RD4, RD9 e RD12 (Figura 6), confirmando a presença do *M. bovis* nas lesões encaminhadas pelos matadouros - frigoríficos do estado da Bahia.

Figura 6 – Reação em Cadeia Polimerase Multiplex ara o diagnóstico de *M. bovis*.

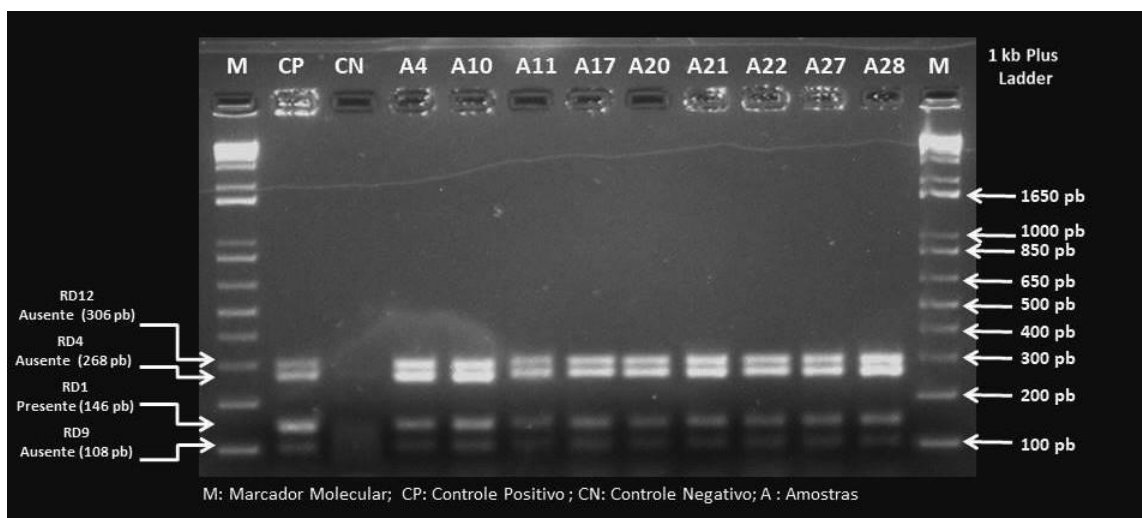


Figura 6: M– marcador molecular; CP – amostra controle; CN – controle negativo; A4-A28 – amostras dos animais. Setas brancas indicam a amplificação das regiões RD1 (146 pb), RD 4(268 pb), RD9 (108 pb) e RD12 (306 pb), confirmando a presença do *M. bovis* em todas as amostras. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Para avaliar a relação entre sexo e índice de positividade foi aplicado o teste exato de Fisher, considerando um nível de 5% de significância. Dessa forma, tem-se as seguintes hipóteses:

**H0: Sexo = índice de animais positivos**

**H1: Sexo  $\neq$  índice de animais positivos**

Após a elaboração da tabela de contingência (Tabela 3), foram observados que mais de 20% da frequência esperada é menor que 5, neste caso, o teste mais indicado para verificar se as variáveis são independentes é o teste exato de Fisher.

**Tabela 3** - Tabela de contingência.

Sexo	Índice de positividade observada			Índice de positividade esperada		
	Positivos	Negativos	Total	Positivos	Negativos	Total
Machos	6	8	14	3,94	10,6	24
Fêmeas	3	15	18	5,06	12,94	18
<b>Total</b>	9	23	32	9	23	32

Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Neste caso, não houve relação significativa entre as variáveis sexo e índice de positividade (p-valor = 0,1317).

## 7 DISCUSSÃO

Das 42 amostras encaminhadas suspeitas de TB, 23,8% (10/42) foram confirmadas pelas técnicas de cultivo bacteriológico, coloração e PCR *multiplex*. Essas 10 amostras foram provenientes de 9 animais diferentes, com idade superior a 36 meses e pertencentes a 9 municípios distintos, sendo 8 municípios da Bahia e 1 do estado de Sergipe. Os resultados encontrados são semelhantes a aqueles descritos por Alzamora et al., (2014), no qual relatou 14 isolados positivos pela técnica de PCR *multiplex* em amostras sugestivas de TB coletadas nos matadouros – frigoríficos do estado da Bahia.

Em relação ao crescimento nos meios de cultura específicos, foi observado um tempo mínimo de 14 dias e máximo de 84 dias para formação das colônias, com uma média de 39 dias. Outro fator a considerar é que embora todas as amostras tenham crescido no meio ST, apenas uma cresceu em ambos os meios (ST e LJ). O meio LJ é pobre em piruvato, o que influencia no crescimento das colônias de *M. bovis*. No entanto, pode ocorrer uma adaptação do agente ao meio, fazendo com que o mesmo consiga se desenvolver mesmo com a ausência do piruvato. Neste caso, observa-se colônias menores em relação ao ST, que possui piruvato como fonte de carbono para os bacilos, principalmente *M. bovis*. O meio LJ utiliza como fonte de carbono a glicerina, que favorece o crescimento de demais micobactérias (DA SILVA, 2015).

A associação entre o serviço de inspeção sanitária, identificando e encaminhando as amostras suspeitas de tuberculose a laboratórios especializados para realização dos testes complementares, possibilita o rastreamento das possíveis propriedades e/ou locais que possam se tornar focos de tuberculose bovina. A cultura bacteriana associada a coloração de Ziehl–Neelsen e a PCR *multiplex* permite a eliminação dos resultados “falsos positivos”, mesmo que haja crescimento de colônias, não indica que realmente sejam cepas de *Micobacterium bovis*. Pode haver o crescimento de outros microrganismos como bactérias gram-positivas que, quando corados, não serão visualizados BAAR, como demonstrado no trabalho de Santos (2019), que aplicou a técnica do cultivo bacteriológico seguido pela coloração Ziehl–Neelsen em amostras sugestivas de TB coletada em feiras livres. As amostras que apresentaram crescimento de colônias nos meios de cultura, foram negativas na técnica de coloração de Ziehl – Neelsen. No presente trabalho, o mesmo ocorreu com apenas uma amostra.

A PCR *multiplex* possibilitou a identificação mais precisa do agente etiológico devido a sua aplicação baseado nas regiões genômicas de diferença do MTBC. Esses agentes possuem regiões específicas em seu genoma que os permite diferenciá-los pela “presença” ou “ausência” dessas regiões de ampliações, apresentando pares de bases (pb) diferentes. As regiões amplificadas no

gel foram a RD1(presente), RD4 (ausente), RD9 (ausente) e RD12 (ausente), confirmando em todas as amostras positivas, a presença do agente *Mycobacterium bovis*.

A análise estatística relevou que o índice de positividade independe se os animais forem machos ou fêmeas. Contudo, uma maior incidência pode ser observada em fêmeas, devido a particularidade do manejo, ao longo tempo de vida útil o relacionado aos processos de reprodução e de aleitamento (HUMBLET et al., 2009). Por se tratar de uma enfermidade infectocontagiosa inúmeros outros fatores podem estar atrelados ao número de casos positivos, dentre eles a imunidade do próprio animal, podendo isolar ou disseminar a infecção por meio de secreções nasais, salivares, vaginais, uterinas, urinárias, espermáticas e fezes (ABRAHÃO, 1999); escore corporal, uma vez que, os animais com escore corporal baixo podem não resistir a infecção, se tornando fontes de contaminação tanto ambiental quanto de animal para animal; a idade, animais muito jovens (< um ano) ou muito tardios (> cinco anos), devido ao desenvolvimento incompleto do sistema imune ou a redução da funcionalidade do mesmo, podem corroborar para susceptibilidade da doença, além de que, quanto mais velho for o animal maior a probabilidade de entrar em contato com animais infectados devido a separação dos animais por fases do desenvolvimento estabelecida na propriedade (KAZWALA et al. 2001); condições higiênico-sanitárias do rebanho como o acúmulo de matéria orgânica, fezes ou a utilização de fômites; tamanho do rebanho; locais de pastejo e ingestão de água, se houver acesso ou forem compartilhados com animais silvestres podem vir a ser meios de infecção pelo agente *M. bovis* (HUMBLET et al., 2009).

Em relação a idade dos animais, observou-se que todos os animais positivos, tanto machos quanto fêmeas, possuíam idade acima de 36 meses. Este fato pode estar relacionado ao tipo de sistema (extensivo, semi-intensivo ou intensivo), realizado na propriedade, uma vez que os animais encaminhados aos matadouros-frigoríficos são considerados “terminados”, ou seja, atingiram o peso ideal para o abate; velhos (> cinco anos), sendo estes animais matrizes ou reprodutores na fase final da vida ou animais destinados ao descarte. O grande entrave é que por serem animais de corte, permanecem por pouco tempo na propriedade e por apresentarem score corporal, os produtores não imaginam que o animal possa ser positivo para TB, e estes, acabam se tornando fontes de disseminação no rebanho, ou até mesmo aos manipuladores, já que as lesões suspeitas de TB podem se apresentar isoladas e só serem encontradas no momento do abate.

Diante da aplicabilidade da PCR *multiplex*, é possível confirmar o agente etiológico com maior precisão e identificar de quais municípios estão sendo advindas as amostras positivas e quais são as áreas mais afetadas, que podem vir a se tornar possíveis focos de disseminação da

enfermidade no estado da Bahia. Um dos maiores entraves para o diagnóstico da TB é a dificuldade de extração de DNA e o tempo para o diagnóstico devido a sensibilidade do agente. A elaboração de uma técnica que seja capaz de identificar o agente causador da TB diretamente da lesão, favoreceria um diagnóstico mais precoce da enfermidade, não sendo necessário aguardar até 12 semanas para a formação das colônias nos meios específicos, e dessa forma, poder informar aos órgãos competentes quais áreas podem se tornar possíveis focos de TB.

O município de Tomar do Geru, pertencente ao estado de Sergipe, apresentou uma amostra positiva para PCR *multiplex* na identificação do agente *M. bovis*. Observando sua localização no mapa, o município fica localizado na divisa entre o estado da Bahia e Sergipe (Figura 3). Essa proximidade pode favorecer a comercialização sem controle sanitário dos animais e, dessa forma, promover a entrada não fiscalizada do agente causador da tuberculose bovina no estado.

Outro fator que pode ter corroborado com o número de casos positivos é a não remuneração aos pequenos produtores, aos animais positivos nos testes tuberculínicos; por serem casos de notificação obrigatória, os animais são destinados a eliminação por meio do abate sanitário em matadouros-frigoríficos ou ao enterro dos animais na propriedade (BRASIL, 2021), sem que o produtor receba qualquer quantia. Isso faz com que estes produtores deixem de buscar os serviços de fiscalização fornecidos pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose - PNCETB, e passem a comercializar esses animais e seus subprodutos de forma indevida, dando origem aos abates clandestinos e a venda de leite e subprodutos de forma *in natura*. Além disso, os demais estados vizinhos podem vir a apresentar animais positivos, aumentando os riscos zoonóticos.



## 8 CONCLUSÃO

Através do cultivo bacteriológico, foi possível isolar o agente *M. bovis* a partir das lesões suspeitas de tuberculose identificadas durante o sistema de inspeção de carcaças de bovinos nos matadouros – frigoríficos do estado da Bahia. A aplicação da técnica de PCR *multiplex* diretamente do DNA extraído da colônia positiva, possibilitou a identificação da espécie *M. bovis* através das suas regiões genômicas específicas. Além disso, foi possível estimar a prevalência (0,0003%) da enfermidade no estado e com o auxílio do mapeamento dos pontos focos e registros epidemiológicos encontrados, reforçam que as atividades do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT, assim como, da vigilância epidemiológica devem ser reformuladas e reavaliadas para que novos métodos de controle e monitoramento possam ser implantados mediante as condições socioeconômicas dos municípios. Uma das alternativas que pode ser aplicada é a conscientização da população por meio de palestras, workshops, pôsteres e cursos de higiene destinados a produtores, trabalhadores, manipuladores e comerciantes de produtos cárneos e lácteos, sobre os riscos que a TB bovina pode vir a causar a sociedade se houver disseminação da zoonose.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A aplicação da técnica de PCR *multiplex* associada aos exames *post-mortem* e cultivo bacteriológico, possibilitou um diagnóstico mais preciso e revelou a presença da enfermidade no estado da Bahia e no município de Tomar do Geru em Sergipe.
- Mesmo apresentando uma baixa prevalência (0,0003%), a enfermidade está presente no estado da Bahia e as atividades promovidas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina – PNCEBT tem sido efetivas no rastreamento e monitoramento da tuberculose bovina.
- Além disso, ressaltou a importância do trabalho conjunto indispensável do serviço inspeção sanitária, órgãos governamentais e laboratórios especializados na aplicabilidade do rastreamento de propriedades focos de tuberculose bovina.

## 10 REFERÊNCIAS

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. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.6.1998.tde-04022011-153511>.

ALZAMORA F, F.; VASCONCELLOS, S. E.; GOMES, H. M.; CAVALCANTE, M. P.; SUFFYS, P. N.; COSTA, J. N. (2014). Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34, 103-108. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000200001>.

AMBROSIO, S.R; OLIVEIRA, E. M. D. 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. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200008>.

BHEMBE, N. L; JAJA, I. F.; NWODO, U. U.; OKOH, A. I; & GREEN, E., Prevalence of tuberculous lymphadenitis in slaughtered cattle in Eastern Cape, South Africa, **International Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 27–37, 2017.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.05.005>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. In: **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília. p. 184, 2006. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt>> Acesso: 09 jan 2022.

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 11 jan. 2022

BRASIL. Secretaria de estado da agricultura, abastecimento e desenvolvimento rural. **Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – SANTUB**. Disponível em: <<https://www.agricultura.df.gov.br/controle-e-erradicacao-da-brucelose-e-tuberculose-santub/>>. Acesso em: 11 nov. 2021.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da saúde. Tuberculose **Boletim epidemiológico**, número especial, 1º edição. Março/ 2021 Disponível em:<[https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/24/boletim-tuberculose-2021\\_24.03](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/24/boletim-tuberculose-2021_24.03)>.Acesso em 04 de nov. 2021.

CARVALHO, R C. T.; VASCONCELLOS, S. E. G.; ISSA FILHO, M. D. A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* from cattle reared in Midwest Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162459, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162459>.

CEPEA. **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada**. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/opinia0-cepea/negocio-da-china.aspx#:~:text=Dados%20da%20Secex%20apontam%20que,respectivos%2015%25%20e>

%2016%25.. Acesso em: 28 abr. 2020.

CEZAR, R.D.S.; LUCENA-SILVA, N.; BORGES, J. M.; SANTANA, V. L.; JUNIOR, J. W. P. 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: <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.04.007>.

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

COSIVI, O; GRANGE, J. M; DABORN, C. J; RAVIGLIONE, M. C; FUJIKURA, T., COUSINS, D; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Disease**, v. 4, p. 59–70, 1998. DOI: 10.3201/eid0401.980108.

COSTA, L. B. **Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no estado da Bahia**. Universidade Federal da Bahia, Salvador. Bahia, 2012. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-402>. Acesso: 09/01/2022.

COUSINS, D. V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 20, p. 71–85, 2001. DOI: 10.20506/rst.20.1.1263.

DA SILVA, D. A. V. **Comparação entre os métodos de diagnóstico da tuberculose em bovinos abatidos em matadouros - frigoríficos do estado de São Paulo**. 2015.

DATASUS. **TUBERCULOSE - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Bahia**. Datasus.gov.br. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/tubercba.def>>. Acesso em: 4 nov. 2021.

DE ALMEIDA FRÁGUAS, S. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 3, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.211>.

CRUVINEL, W. D. M; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. D.; SILVA, N. P. D. e ANDRADE, L. E. C.M. Sistema Imunitário -Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434–61, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>.

DIGUIMBAYEFDJAIBÉ, C; HILTY, M.; NGANDOLO, R.; MAHAMAT, H. H.; PFYFFER, G. E.; BAGGI, F. e SCHELLING, E. *Mycobacterium bovis* isolates from tuberculous lesions in Chadian zebu carcasses. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.5, p.769-771, 2006. DOI: 10.3201/eid1205.050691

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

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 em: 25 abr. 2020.

FERREIRA, F. F. **Diagnóstico bacteriológico e molecular em lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos sob serviço de inspeção estadual no Ceará**. Dissertação (Mestrado em Defesa Agropecuária) - Programa de Pós-Graduação do curso de Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2019.

FRANÇA, L. R. da. **Diagnóstico anatomopatológico histológico de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina**. Dissertação (Mestrado em Defesa Agropecuária) - Programa de Pós-Graduação do curso de Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2013.

GLASER, L.; CARSTENSEN, M.; SHAW, S.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; WUNSCHMANN, A., GREAR, D.; STUBER T.; THOMSEN, B. Descriptive Epidemiology and Whole Genome Sequencing Analysis for an Outbreak of Bovine Tuberculosis in Beef Cattle and White-Tailed Deer in Northwestern Minnesota, **Plos one**, v. 11, n. 1, p. e0145735, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145735>.

GRANGE, J. M. **Mycobacterium bovis infection in human beings**. **Tuberculosis**. v. 81, p. 71–77, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0263>.

HARRIS, N. B. HARRIS, N. B., PAYEUR, J., BRAVO, D., OSORIO, R., STUBER, T., FARRELL, D.; PAULSON, D.; MIKOLON, A.; LAINZ, A. R.; HOSKINS, S. C.; RAST, R.; MICHELE GINSBERG, e 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: <https://doi.org/10.1128/AEM.01956-06>.

HERNANDEZ, 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.07.015>.

HOLLANDER E, RABINOWITZ PM. **Tuberculose e outras infecções micobacterianas**. In: Rabinowitz PM, Conti LA. Human-Animal Medicine, Clinical Approaches to Zoonoses, Toxicants and Other Shared Health Risks, 1st Edition, 2010; pp 276-89. DOI: 10.3201/eid1606.100367.

HUMBLET, M.F., BOSCHIROLI, M.L., SAEGERMAN, C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. **Vet Res**. 2009 Sep-Oct; 40(5):50. Epub 6 Jun, 2009. Review. **PubMed** PMID: 19497258; PubMed Central PMCID: PMC2710499

IBGE. **Áreas Territoriais**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/15761-areas-dos-municipios.html?=&t=resolucoes-e-legislacao>>. Acesso em: 4 Nov. 2021.

KAZWALA, R. R., KAMBARAG, E. D. M., DABORN, C. J., NYANGE, J., JIWA, S. F. H., SHARP, J. M. Risk factors associated with the occurrence of bovine tuberculosis in cattle in the Southern Highlands of Tanzania, **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 25, p. 609-614, 2001.

KEE S J.; KIM, S. M.; KIM, S. H.; SHIN, M. G.; SHIN, J. H.; SUH, S. P. e RYANG, D. W. Multiplex PCR assay for identification of mycobacterial species isolated from liquid cultures. **Chonnam Med J**, v. 45, p. 19–26, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4068/cmj.2009.45.1.19>.

MARCONDES, A. G.; MARIA DE LOURDES, M. S., VASCONCELLOS, S. A., BENITES, N. R., DE MORAIS, Z. M., ROXO, E.; DIAS, R. A.; LEÃO, S. L. P. C. E PINHEIRO, S. R. 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. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26484>.

MORRIS, R. S.; PFEIFEER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 153–177, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90053-1).

NOORDHOEK, G.; KOLK, A. H.; BJUNE, G.; CATTY, D.; W DALE, J.; FINE, P. E.; FAUSSETT, P. G.; CHO, S. N.; SHINNICK, T. E 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. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.32.2.277-284.1994>.

OHARA, P.M. Microbiologia e histopatologia de linfonodos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo, São Paulo, 106 p. 2006. DOI: [10.11606/D.10.2006.tde-17042007-122417](https://doi.org/10.11606/D.10.2006.tde-17042007-122417).

OIE. World Organisation for Animal Health - Bovine Tuberculosis. The tuberculin test. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. p. 6–7, 2009. Disponível em: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.04.06\\_BOVINE\\_TB.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVINE_TB.pdf) > Acesso em: 10 de jan de 2022.

OLSEN I, BARLETTA RG, THOEN CO. *Mycobacterium*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, eds. Patogênese das infecções bacterianas em animais. 4ª Edição. Ames, IA: **Wiley-Blackwell Publishing**, 2010; pp 113-32. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470958209.ch7>.

PAES, A. C., FRANCO, M. M. Tuberculose em animais de produção. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**, v. 1, p. 512–542, 2016.

PARK, D.; QIN, H.; JAIN, S.; PREZIOSI, M.; MINUTO, J. J.; MATHEWS, W. C.; MOSER, K. S.; BENSON, C. A. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in patients coinfecting with human immunodeficiency virus. **Clinical infectious diseases**, v. 51, n. 11, p. 1343-1346, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1086/657118>.

PFYFFER G.E. *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. DOI: <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch30>.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, n. 4, p. 357–359, 1988.

QUINN, P.J *et al.* Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. 1. ed. São Paulo: **Artmed**, 2007. p.106-114.

RAMOS D.F.; SILVA, A. B.; 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. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200039>.

RAMOS, D.F.; SILVA, P.E.A.; DELLAGOSTIN, O.A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal of Biology**, v.75, n.4, p.830-837, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.23613>.

RIET-CORREA, F. & GARCIA, M. Tuberculose. In: Riet-Correa, F.; Schild, A; N.; Lemos, R. A. A. & Borges J. R. J. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3.ed. vol.1 São Paulo: Pallotti, 2007. p.432-442.

ROCHA, Bernardo Barbosa. Ocorrência de *Mycobacterium bovis* em queijos coalho artesanais e fatores associados ao consumo de leite e derivados lácteos informais, **Locus.ufv.br**, 2013. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/5161>. Acesso em: 12 jan. 2022.

ROWE, M. T., DONAGHY, J. *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 4, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00433.x>

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; e ROXO, E. Tuberculose Bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.74, n.1, p.55-65, 2007. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v74\\_1/ruggiero.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v74_1/ruggiero.pdf). Acesso em: 12 jan. 2022.

SALES, M. L.; JUNIOR, A. A. J; ORZIL, L.; ALENCAR, A. P.; HODON, M. A.; ISSA, M. A.; HODON M. A.; ISSA, P. M.; SOARES, M. R.; SILVA, A. P.; LAGE A.N.; HEINEMANN, M. B. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. **Embrapa Gado de Leite-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1011537/1/Cnppl2014GeneticsMolecularResearchValidationSP6610.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2022.

SANTOS, E. S. V. **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**. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2019.

SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L., & JOHNE, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, 113(5), 1014-1023. DOI:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>. PMID:22747964.

SICONELLI, M. J. L.; VEY-DA-SILVA, D. A.; DE SOUZA-POLLO, A., & BÜRGER, K. P. Difficulties in diagnosis of bovine tuberculosis in suggestive lesions on post-mortem inspection in carcasses. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm002518>

SILAIGWANA, Blessing; GREEN, Ezekiel; NDIP, Roland N. Molecular detection and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex from cattle at a dairy farm in the Nkonkobe region of South Africa: A pilot study. **International journal of environmental research and public health**, v. 9, n. 6, p. 2045-2056, 2012.

SILVA, H. L.; RIBEIRO, L.F. Abate clandestino de bovinos: Uma reflexão sobre os riscos à saúde pública, **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 11, n. 02, p. 139–170, 2021. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/abate-clandestino>. Acesso em: 12 jan. 2022.

SILVA, M.R.; ROCHA, A. S.; COSTA, R. R.; ALENCAR, A. P.; OLIVEIRA, V. M.; JÚNIOR, A. A. F.; SALES, M. L.; MARINA ISSA, M. A.; FILHO, P. M. S.; PEREIRA O. T. V.; SANTOS, E. C.; MENDES, R. S.; FERREIRA, A. M. J.; MOTA, P. M. P. C.; SUFFYS, P. N.; GUIMARÃES, M. D. C. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 321-327, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000300010>.

SILVEIRA, C. O.; SILVEIRA, R. O.; DA CUNHA ABREU, C.; RITTER, M. A. ABATE clandestino: um risco para saúde pública. **Anais simpac**, v. 5, n. 1, 2015. Disponível em: <https://academico.univicosa.com.br/revista/index.php/%20RevistaSimpac/article/view/98>. Acesso em: 12 jan. 2022.

TEKLU, A.; ASSEGED, B.; YIMER, E.; GEBEYEHU, M.; WOLDESENBET, Z. Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. **Revue Scientifique et Technique Office international des Epizooties**, v. 23, n. 3, p. 957-964, 2004. DOI: 10.20506/rst.23.3.1534.

THOEN CO, BARLETTA RG. Patogênese da tuberculose causada por *Mycobacterium bovis*. In: Thoen CO, Steele JH, Kaneene JB, eds. Tuberculose zoonótica: *Mycobacterium bovis* e outras micobactérias patogênicas. Ames, IA: **Wiley-Blackwell** - Publicação 2014 Capítulo 5; pp 51-62. DOI: 10.1590/0074-02760170445.

THOEN, C. O.; LOBUE, P. A.; ENARSON, D. A.; KANEENE, J. B.; KANTOR, I. N. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. **Vet. Ital.** 45, 135–181, 2009. Disponível em: <https://digitalcommons.unl.edu/michbovinetb/95/>. Acesso em: 12 jan. 2022.

THOEN, C. O.; KAPLAN, B.; THOEN, T. C.; GILSDORF, M. J.; SHERE, J. A. (Zoonotic tuberculosis: A comprehensive one health approach, **Medicina (Buenos Aires)**, v. 76, n. 3,



p. 159–165, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27295705/>. Acesso em: 12 jan. 2022.

WARREN, R. M.; PITTIUS, N. C.; BARNARD, M.; HESSELING, A. <sup>1</sup>; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M. C.; CHEGE, G. K.; VICTOR, T. C.; HOAL, E. G.; VAN HELDEN, P. D. 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.

YEBOAH-MANU, D.; YATES, M. D.; WILSON, S. M. Application of a simple Multiplex PCR to aid in routine work of the Mycobacterium reference laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4166-4168, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4166-4168.2001>.

ZUMÁRRAGA, M. J.; PAOLICCHI, F. A.; GARBACCIO, S. G.; GIOFFRE, A.; CATALDI, A. AD. 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.

## 11 ANEXOS

### 11.1 Anexo 1

<b>GUIA DE ACOMPANHAMENTO</b> Lesão suspeita de tuberculose colhida em matadouro	
<b>NÚMERO DO FRASCO:</b>	

### 1 – DADOS DO MATADOURO

Quem faz a inspeção: ( ) SIE-BA ( ) SIF	
Nº de registro:	EDA/POINS:
Nome do estabelecimento:	
Telefone:	e-mail:
Méd. Vet. Encarregado IF/ Resp. Técnico SIE-BA:	
Telefone:	

### 2 – PROCEDÊNCIA DO ANIMAL

Informações do GTA:	Número do GTA:
Local de emissão do GTA:	
Nome do proprietário:	
Nome do estabelecimento:	
Município:	Estado:
<b>Informações a serem obtidas do proprietário do animal:</b>	
É de criação própria? Sim ( ) Não ( ) Qual a procedência?	
Proprietário:	
Propriedade:	Município:

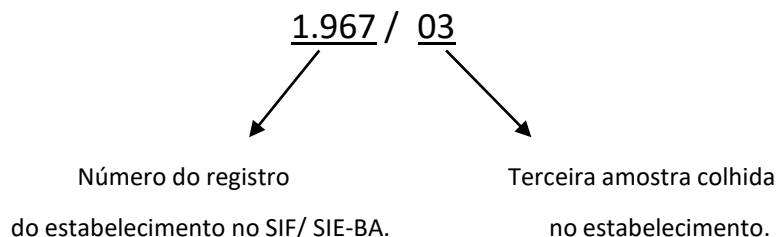
### 3 – DADOS DA AMOSTRA

Data da coleta:      /      /	
Espécie: ( ) Bovina ( ) Bubalina	Sexo : ( ) M ( ) F
Raça (vide-verso): ( ) zebu ( ) Europeu de leite ( ) europeu de corte ( ) SRD ( ) Outras raças	
Idade: ( ) até 12 meses ( ) 12 a 24 meses ( ) 24-a 32 meses ( ) mais de 36 meses	
Distribuição das lesões na carcaça:	Material colhido
( ) Trato Respiratório	( ) Tonsilas
( ) Trato Digestivo	Retrofaringeanos ( )
( ) Genito urinário	( ) Linfonodo: Mesentérico ( )
( ) Linfonodos da cabeça e pescoço	Mandibulares ( )
( ) Úbere	Mediastínicos ( )
( ) Outro, qual: _____	Hilo-hepático ( )
	Sub-ilíacos ( )
	( ) Pulmão
	( ) Outro, qual: _____
Carimbo e assinatura do Méd. Vet. Encarregado IF/ Resp. técnico SIE-BA:	

## NÚMERO DO FRASCO

Composto pelo número de registro do estabelecimento no SIF/ SIE-BA e número seqüencial da amostra, separados por uma barra.

Exemplos:



### Raça predominante

Marcar uma única opção, aquela que melhor caracterize a propriedade amostrada.

Quando o rebanho for bovino:

- **Zebu:** qualquer raça de bovino da espécie *Bos indicus*. Exemplo: considera-se raça zebu predominante quando o rebanho for composto por: (1) bovino de uma única raça (ex: nelore); (2) bovino de duas ou mais raças diferentes (ex: nelore e guzerá); (3) bovinos resultantes de cruzamentos entre raças zebuínas, independente do grau de sangue (ex: nelore x guzerá).
- **Europeu de leite:** qualquer raça de bovino da espécie *Bos taurus*, especializadas em produção leiteira, podendo o rebanho ser constituído por animais de uma única raça ou de cruzamentos de raças desta mesma espécie. Ex: holandês e Jersey.
- **Europeu de corte:** qualquer raça de bovino da espécie *Bos taurus*, especializadas em produção de carne, podendo o rebanho ser constituído por animais de uma única raça ou de cruzamentos de raças desta mesma espécie. Ex: angus, charolês e simental.
- **Sem raça definida (SRD):** é o bovino resultante de cruzamentos entre raças, não permitindo que ele seja incluído dentro de uma ou mais raças específicas, sendo, portanto, considerado como sem raça definida (SRD).
- **Outras raças:** todas as categorias que não se enquadram nas opções acima. São incluídos aqui bovinos resultantes de cruzamentos entre as espécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, que dão origem ao gado cruzado (europeu x zebu), independente do grau de sangue (Ex: girolanda, cruzamento industrial).

**Procedência do animal:** são os dados do GTA.