

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

JAQUELINE QUEIROZ AMORIM

**USO DE MÉTODOS BACTERIOLÓGICO E MOLECULAR NO
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA, A PARTIR DE LESÕES EM
CARÇAÇAS DE BOVINOS PROVENIENTES DE MATADOUROS-
FRIGORÍFICOS NO ESTADO DO CEARÁ**

ILHÉUS – BA

2020

JAQUELINE QUEIROZ AMORIM

**USO DE MÉTODOS BACTERIOLÓGICO E MOLECULAR NO
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA, A PARTIR DE LESÕES EM
CARÇAÇAS DE BOVINOS PROVENIENTES DE MATADOUROS-
FRIGORÍFICOS NO ESTADO DO CEARÁ**

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

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Fernando Alzamora Filho

ILHÉUS-BA

2020

A524

Amorim, Jaqueline Queiroz.

Uso de métodos bacteriológico e molecular no diagnóstico da tuberculose bovina, a partir de lesões em carcaças de bovinos provenientes de matadouros-frigoríficos no estado do Ceará / Jaqueline Queiroz Amorim. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.

64f.: il.; anexo.

Orientador: Fernando Alzamora Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências.

1. Bovinos – Doenças. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. Tuberculose em bovino – Diagnóstico. 4. Epidemiologia. 5. Mycobacterium bovis. I. Título.

CDD 636.08969

JAQUELINE QUEIROZ AMORIM

**USO DE MÉTODOS BACTERIOLÓGICO E MOLECULAR NO
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA, A PARTIR DE LESÕES EM
CARCAÇAS DE BOVINOS PROVENIENTES DE MATADOUROS-
FRIGORÍFICOS NO ESTADO DO CEARÁ**

Ilhéus – BA, 27/02/2020

Fernando Alzamora Filho - *DSc*
UESC/DCAA
(Orientador)

Roberta Costa Dias - *DSc*
UFBA/DMVPPA

Poliana Castro Melo - *DSc*
UESC/ DCAA

**ILHÉUS-BA
2020**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre presente em minha vida.

À minha Mãe Vanda, minha amiga, mulher de grande coragem, sempre me apoiando e incentivando e ao meu Pai Raimundo, pelo apoio. Obrigada pelo amor e apoio incondicional de vocês!

À todos os meus familiares que fizeram e se faz presente.

Ao meu namorado amigo Jadson, por estar sempre a meu lado me dando força e pela paciência.

À Dona Gení, pelos acolhimentos. Muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará (ADGRI) pela colaboração na obtenção de informações e amostras nos matadouros-frigoríficos do Estado do Ceará.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal (PPGCA) da UESC pelo suporte educacional.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Fernando Alzamora Filho, pela oportunidade e grande apoio na elaboração deste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório, Bruno e Alana, pelo apoio na fase experimental e pelos conhecimentos transmitidos, a participação de vocês foi muito importante. Muito obrigada!

À Hllytchaikra, pelo seu grande apoio e por transmitir seus conhecimentos. Agradeço imensamente!

Ao Prof^o. Dr. Joselito Nunes Costa, pelo grande incentivo nesta e outras etapas da minha vida.

A todos, muito obrigada!

USO DE MÉTODOS BACTERIOLÓGICO E MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA, A PARTIR DE LESÕES EM CARÇAÇAS DE BOVINOS PROVENIENTES DE MATADOUROS FRIGORÍFICOS NO ESTADO DO CEARÁ

RESUMO

A tuberculose bovina é uma doença zoonótica de evolução crônica ocasionada pelo *Mycobacterium bovis* e no Brasil existem inquéritos epidemiológicos estaduais ou regionais com prevalência variada. Devido à escassez de dados no estado do Ceará, essa pesquisa objetivou detectar do *Mycobacterium bovis* por métodos bacteriológico e molecular em lesões sugestivas de tuberculose em carcaças de bovinos abatidos em matadouro-frigoríficos com inspeção estadual. Durante o período de agosto de 2017 a janeiro de 2019, o serviço de inspeção oficial inspecionou 59.512 bovinos em três matadouros-frigoríficos no estado do Ceará, dos quais foram enviadas 48 amostras de 46 animais variando entre pulmão, linfonodos e fígado. Desses animais, 34 eram fêmeas e 12 machos. No isolamento bacteriológico, 14,5% (7/48) das amostras apresentaram crescimento de colônias pequenas, arredondadas, bordas irregulares, superfície granular, coloração creme-amareladas e crescimento disgônico em meio de cultura Stonebrink-Leslie, com tempo médio de crescimento de 32 dias. Essas amostras foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen e todos os esfregaços evidenciaram bacilo álcool-ácido resistente. A PCR multiplex identificou todos os sete isolados como *M. bovis*, sendo que seis das amostras positivas eram de fêmeas e uma de macho. Foi possível a identificação de *M. bovis* através da associação entre os exames *post mortem*, bacteriológico e PCR multiplex, fornecendo informações sobre a

doença nas regiões estudadas no Ceará e contribuindo para adoção de medidas de controle e erradicação da tuberculose bovina no Estado.

Palavras-chave: BAAR. Diagnóstico. Epidemiologia. PCR multiplex. *Mycobacterium bovis*.

USE OF BACTERIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS IN BOVINE DATUBERCULOSIS DIAGNOSIS FROM INJURIES IN CATTLE CARCASSES FROM REFRIGERATING SLAUGHTERHOUSE IN THE STATE OF CEARÁ

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a chronic zoonotic disease caused by *Mycobacterium bovis* and in Brazil the prevalence is not yet known in detail, only state or regional epidemiological surveys with varying results. However, the state of Ceará has a need for epidemiological information on the disease. This research aimed at detecting *Mycobacterium bovis* by bacteriological and molecular methods in lesions suggestive of tuberculosis and other lymphadenitis of bovine carcasses slaughtered in slaughterhouses with state inspection. During the period from August 2017 to January 2019, the official inspection service inspected 59,512 cattle in 3 slaughterhouses in the state of Ceará, from which samples were sent from 46 animals, located in the lungs, lymph nodes and liver of slaughtered cattle. Of these samples, 34 were from females and 12 males. In bacteriological isolation, 14.5% (7/48) of the samples showed growth of small, rounded colonies, irregular edges, granular surface, yellowish-cream color and dysgenic growth in Stonebrink-Leslie culture medium, with average growth time of 32 days. These samples were submitted to Ziehl-Neelsen staining and all smears

showed acid-fast bacillus. The multiplex PCR identified all seven isolates as *M. bovis*, with six of the positive samples being from females and one from males. It was possible to identify *M. bovis* quickly through the association between post-mortem, bacteriological and multiplex PCR tests, providing epidemiological information about the disease in Ceará and contributing to the adoption of control and eradication measures against bovine tuberculosis in the State.

Keywords: acid fast bacilli. Diagnosis. Epidemiology. Multiplex PCR. *Mycobacterium bovis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO.....	18
2.1 Objetivo Geral	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Etiologia.....	18
3.2 Epidemiologia	20
3.3 Tuberculose zoonótica.....	24
3.4 Imunopatogenia	26
3.5 Transmissão	27
3.6 Sinais clínicos	28
3.7 Métodos de diagnóstico	28
3.7.1. Diagnóstico Clínico.....	29
3.7.2 Diagnóstico Imunológico	30
3.7.3 Diagnóstico <i>post mortem</i>	31
3.7.4 Diagnóstico histopatológico.....	32
3.7.5 Diagnóstico bacteriológico.....	33
3.7.6 Diagnóstico molecular.....	34
4 CONTROLE E PREVENÇÃO	36
5 ARTIGO CIENTÍFICO.....	38
6 CONCLUSÕES GERAIS	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO.....	58

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (TB) é uma doença de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*) (CHIU et al., 2019). Caracteriza-se por apresentar lesões nodulares granulomatosas de desenvolvimento progressivo denominados tubérculos e podem localizar-se em qualquer órgão ou tecido, sendo, mas comumente observados nos pulmões, pleura e linfonodos adjacentes, fígado, baço e intestino (VORDERMEIER et al., 2012; OIE, 2019).

M. bovis faz parte do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e as espécies pertencentes a este complexo diferem das demais por apresentarem homologia em comum, com 99,9% de similaridade na sequência de seu ácido desoxirribonucleico (DNA) e por conterem elementos de inserção repetitivos, como a sequência de inserção 6110 (IS6110) (SANTIAGO; MUÑOZ; MARTÍNEZ, 2014).

A etiologia da tuberculose começou a ser desvendada no final do século XIX, no ano de 1882, quando Robert Koch isolou *Mycobacterium tuberculosis* em lesões de pessoas acometidas pela doença (FRANCIS, 1958). Após a descoberta de Koch, a tuberculose caracterizava-se como a principal causa de morte no mundo, além de serem observadas lesões semelhantes entre os homens e os bovinos e outros animais domésticos (MCFADYEAN, 1888). Em 1898, Theobald Smith isolou o *Mycobacterium bovis* em lesões tuberculosas de bovinos (FRANCIS, 1958) sendo considerado a primeira fonte de infecção em humanos. No entanto, a doença tem sido relatada em muitos outros animais domesticados e selvagens (OIE, 2019).

A principal forma de transmissão do microrganismo é por via respiratória, sendo que a densidade animal contribui para o aumento do risco de infecção, podendo este fator estar relacionado com a maior prevalência da doença no gado leiteiro estabulado, e a menor prevalência no gado de corte, os quais são criados em sistema extensivo e abatidos precocemente (SKUCE; ALLEN; McDOWELL, 2012). Essa enfermidade

ocasiona perdas econômicas para a pecuária, devido à diminuição na produção de leite e condenação da carcaça no exame *post mortem* (WATERS et al., 2014).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2016 ocorreram 147.000 novos casos de tuberculose zoonótica e 12.500 mortes foram atribuídas à doença (FAO, OIE, OMS, 2017), constituindo um problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento (AHAMAD et al., 2017).

A inspeção sanitária em matadouros-frigoríficos é de grande importância, pois evita que carnes contaminadas cheguem à mesa do consumidor (SILVA, 2015). Alguns países como Estados Unidos, Canadá, Cuba, Austrália e a maioria da Europa continental estão eliminando animais contaminados pela doença no processo de abate sanitário, levando assim a redução da tuberculose bovina nos rebanhos (AYELE et al., 2004). No Brasil, devido à importância da tuberculose bovina, em 2001 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses nas saúdes humana e animal.

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser realizado por método direto (isolamento e identificação do agente etiológico), conhecido como “padrão ouro” e o indireto, por meio de pesquisas da resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico que pode ser humoral ou celular (PACHECO et al., 2009). Estudos vêm evidenciando o uso de métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção de *M. bovis* em lesões sugestivas de tuberculose, permitindo assim, uma maior acurácia e significativa redução no tempo para obtenção do resultado, em comparação ao isolamento (CARDOSO et al., 2009). O método recomendado pelo PNCEBT para o diagnóstico da tuberculose é o teste alérgico tuberculínico (método indireto), que provoca uma reação de hipersensibilidade tardia, imunologicamente específica, mediada por linfócitos T sensibilizados, que possibilita a identificação de animais infectados pelo *M. bovis* (MOTA et al., 2008).

A tuberculose bovina é uma doença de grande importância, por ser uma zoonose cosmopolita que ocasiona grandes prejuízos econômicos e a ausência de informações

sobre a prevalência, corrobora com a manutenção do agente no rebanho bovino. Desta forma, o levantamento epidemiológico pela tuberculinização associado a inspeção de carcaças pela Inspeção Estadual, e exames bacteriológicos e moleculares, propiciarão melhor entendimento da epidemiologia da doença, contribuindo para seu controle e erradicação.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Determinar a ocorrência da tuberculose bovina nas Regiões Metropolitana do Cariri e Sertão Central no Estado do Ceará, a partir de lesões suspeita de tuberculose ou de outras linfadenites em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos com inspeção estadual.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Etiologia

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), agente da tuberculose bovina pertence ao gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae* ordem *Actinomycetales* (PAES; FRANCO, 2016). São bacilos curtos aeróbicos, imóveis, incapazes de formar esporos, flagelos e medindo de 0,5 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,7 µm de largura (PALOMINO et al., 2007; QUINN et al., 2007).

A espécie que ocasiona tuberculose em humanos e animais faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), o qual é composto pelas espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* e

Mycobacterium pinnipedii. *M. tuberculosis* é o agente responsável pela tuberculose em humanos, *M. bovis* é o agente casual da tuberculose em bovinos, podendo ocasionalmente infectar seres humanos (ARIAS, 2018). Essas espécies, apresentam semelhança em nível de DNA e do gene 16s rRNA (Ácido Ribonucleico Ribossomal), diferindo nas características fenotípicas, patogenicidade e preferência por hospedeiro (ARANAZ et al.,2003).

Outros agentes que causam tuberculose em animais e no homem e não pertencem ao (MTBC) são as denominadas micobactérias não tuberculosas, formadas pelo complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*, o qual abrange duas espécies: *M. avium* e *M. intracellulare*. *M. avium* é subdividido em quatro subespécies: ssp. *avium*, ssp. *paratuberculosis*, ssp. *silvaticum* e ssp. *hominisuis*. Caracterizadas como microrganismos não patogênicos para os bovinos e bubalinos, mas ocasiona reações cruzadas inespecíficas, interferindo nos testes de tuberculinização (DVORSKA et al., 2004).

M. avium pode causar tuberculose em várias espécies de aves e o *M. avium* ssp. *paratuberculosis* é o agente etiológico da doença de Johne, uma doença crônica que pode levar a uma enterite granulomatosa em ruminantes. O *M. avium* ssp. *paratuberculosis* também tem sido isolado em tecidos de pacientes humanos com a doença de Crohn, patogenicidade para essa espécie (GOLLNICK et al., 2007).

O alto conteúdo lipídico presente na parede celular de *M. bovis*, determinar o tipo de coloração usada para visualização microscópica (ARIAS, 2018). Para sua caracterização tintorial é utilizado o método de coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), sendo assim, quando corados pela fucsina a quente não se descora pela ação do álcool clorídrico, conferindo-lhe a característica de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (HEINEMANN et al., 2008).

Essa resistência é ocasionada possivelmente pelo ácido micólico presente na parede celular dessas micobactérias e, quando ligados ao peptideoglicano formam uma barreira periférica hidrofóbica capaz de se ligar e reter fucsina a certos lipídios da parede, adquirindo a cor vermelha durante a coloração ZN. As bactérias que não retêm

fucsina são coradas pelo azul de metileno (ARAÚJO, 2004; COSTA, 2008; HEINEMANN et al., 2008).

Em relação à bacteriologia, *M. bovis* necessita de 60 a 90 dias de incubação a uma temperatura de 37°C para crescimento até a visualização das colônias (BRASIL, 2008; GORMLEY et al., 2014) de coloração creme-amareladas, pequenas, arredondadas, com bordas irregulares e superfície granular em meios de cultura *Stonebrink-Leslie*, sendo este considerado padrão ouro para cultivo, produzido a base de ovo e piruvato. *M. bovis* apresenta dificuldade de crescimento em meios glicerinados diferente do *M. tuberculosis* que apresenta desenvolvimento ótimo a base de glicerina como o meio *Lowenstein- Jensen* (ALZAMORA FILHO et al., 2014; O'REILLY; DABORN, 1995).

Em relação a sua resistência, *M. bovis* permanece viável em estábulos, pastos esterco por até dois anos, em produtos de origem animal contaminado e água por um ano. O bacilo é sensível a desinfetantes como fenólicos, álcool e, sobretudo ao hipoclorito de sódio, a ação do desinfetante vai depender do tempo de exposição, temperatura, presença de matéria orgânica e concentração. O bacilo não é eliminado por meio de compostos contendo amônia quaternário e clorexidine, porém, o calor úmido a 60°C mata rapidamente e os processos de pasteurização lenta e rápida contribui para eliminação das micobactérias presentes em produtos lácteos (MORRIS; PFEIFEER; JACKSON, 1994; MOTA, 2014).

3.2 Epidemiologia

A ocorrência da TB pode ser modificada dependendo do sistema de criação, práticas sanitárias e tecnológicas adotadas (FURLANETTO et al., 2012). A infecção por *M. bovis* nos países em desenvolvimento ainda representa um grande risco para a saúde pública, pois, mesmo os bovinos sendo o principal reservatório do microrganismo, esses podem ser observados em outros animais domésticos ou silvestres em humanos (ROCHA et al., 2012).

Em relação à distribuição geográfica da doença, existem países desenvolvidos que restringiram ou eliminaram a TB dos rebanhos bovinos. Entretanto, de janeiro de 2017 a junho de 2018, de 188 países que declaram ocorrência de tuberculose bovina à OIE, apenas (44%) relataram a presença da doença. A maior prevalência de tuberculose bovina está na África e em algumas partes da Ásia, embora a doença também seja encontrada em países da Europa e das Américas (OIE, 2019). Países da União Europeia para serem considerados livres da doença, devem manter a prevalência da tuberculose abaixo de 0,1% por um tempo mínimo de seis anos sucessivos. Para os países avaliados não livres, como a Espanha, é necessário a implementação de um sistema de vigilância com testes tuberculínicos recorrentes no rebanho, retirada dos animais reatores e monitoramento de carcaças em matadouros-frigoríficos pela inspeção veterinária (GARCIA-SAENZ et al., 2015).

No Brasil foi instituído, em 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), posteriormente atualizado pela Instrução Normativa nº10/2017, com a finalidade de diminuir a prevalência dessas doenças por meio de aplicação de medidas sanitárias, visando erradicação.

Uma das principais barreiras para controle da tuberculose em bovinos é a presença de reservatórios de *M. bovis* na fauna silvestre. Espécies selvagens como texugos, gambás, javalis, veados e outras representam um reservatório do agente, assim, a circulação desses animais difunde a doença para os animais domésticos. Países como Nova Zelândia, Irlanda e Reino Unido tentam erradicar a tuberculose bovina onde há reservatório desses animais (ANAELOM et al., 2010; GORMLEY; CORNER, 2012).

Um estudo sobre a situação epidemiológica da TB foi realizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em treze Unidades Federativas Brasileira que representam 75% do rebanho (Fig.1).

Figura 1. Prevalência de focos de tuberculose bovina em propriedades e de animais bovinos reagentes aos testes de tuberculinização nos diferentes estados brasileiros.

Estado (UF)	Focos em propriedades		Animais positivos		Referência
	%	IC 95%	%	IC 95%	
RO	2,3	1,5 - 3,5	0,12	0,06-0,25	Vendrame et al., 2016
GO	3,43	2,20 - 4,67	0,3	0,10 - 0,49	Rocha et al., 2016
MT	1,3	0,7 - 2,4	0,12	0,03 - 0,44	Néspoli et al., 2016
MS	1,3	0,72 - 2,37	0,035	0,017 - 0,069	Guedes et al., 2016
DF	0,36	0,0 - 2,0	0,05	0,0 - 0,4	Ribeiro et al., 2016
ES	7,6	5,7 - 9,9	0,7	0,3 - 1,1	Galvis et al., 2016
MG	4,25	3,36 - 5,15	0,56	0,46 - 0,66	Barbieri et al., 2016
SP	9,0	7,8 - 10,5	1,3	0,9 - 1,7	Dias et al., 2016
PR	2,15	1,31 - 3,00	0,42	0,04 - 0,81	Silva et al., 2016
SC	0,50	0,074 - 0,93	0,06	0,0 - 0,12	Veloso et al., 2016
RS	2,8	1,8 - 4,0	0,7	0,4 - 1,0	Queiroz et al., 2016
BA	1,6	1,0 - 2,6	0,21	0,07 - 0,60	Bahiense et al., 2016
PE	2,87	1,82 - 4,50	0,62	0,29 - 1,29	Lima et al., 2016

O estudo demonstrou que a situação epidemiológica da tuberculose bovina apresenta diferença dentro e entre os estados (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).

Ferreira Neto et al. (2016) realizaram uma avaliação do PNCEBT no Brasil quinze anos após sua implementação e identificaram que estados como Espírito Santo, norte de São Paulo, sul de Minas Gerais e sul de Goiás, que são áreas com grande produção leiteira, possuem as maiores prevalências de tuberculose bovina. Os pesquisadores

relataram que fatores como alta produção de leite, principalmente em fazendas que apresentam maior sofisticação na produção e maior concentração de fêmeas, entrada de animais sem realização de testes tuberculínicos possam estar associados ao aumento da doença no rebanho.

Para identificar os aspectos epidemiológicos na região de Quixeramobim (CE) 248 fêmeas lactantes foram testadas através do teste Tuberculínico Cervical Comparado (TCC), as quais se mostraram negativas ao teste. Entretanto, o pesquisador relatou que este resultado não pode sustentar a ausência da doença na região avaliada, apenas afirmar que essa amostra não era positiva, pois existem alguns fatores que podem ter contribuído para esse resultado, como a ação voluntária dos participantes das propriedades e a seca, que podem contribuir para eliminação dos animais mais debilitados precocemente (NASCIMENTO, 2014).

A realização de inquéritos epidemiológicos por meio da inspeção sanitária em matadouros-frigoríficos é de grande importância para evitar a propagação da doença a população humana, pelo consumo de carne contaminada, tanto em países com índices de prevalência baixa como elevada (DOMINGO; VIDAL; MARCO, 2014). Biffa et al. (2012) avaliaram 337 carcaças com lesões sugestivas de tuberculose durante a inspeção oficial de 3.322 bovinos abatidos em cinco frigoríficos localizados na Etiópia e relataram que as lesões mais frequentes estavam nos pulmões e linfonodos respiratórios (50,9%), seguidos por linfonodos mesentéricos e intestinais (16,5%).

Alzamora Filho et al. (2014) avaliaram 825.394 bovinos em matadouros-frigoríficos no estado da Bahia, com inspeção oficial, dos animais avaliados 180 apresentaram lesões sugestivas de tuberculose com crescimento em meio de cultura em 25 (13,9%) e 14 (56%) dos isolados foram confirmados pela técnica de PCR multiplex como *M. bovis*.

No estado de Mato Grosso, Carvalho et al. (2015), avaliaram 41.193 bovinos durante a inspeção *post mortem*, onde 0,48% das carcaças apresentaram lesões suspeitas de tuberculose bovina. No cultivo bacteriológico, foi isolado 1,5% das amostras e *M. bovis* foi confirmado no PCR multiplex em 7% das amostras bacteriológicas. Os testes

de diagnósticos moleculares como o PCR têm contribuído nos estudos epidemiológicos da tuberculose bovina auxiliando no diagnóstico juntamente com os testes intradérmicos ou bacteriológicos (CARVALHO et al., 2014).

3.3 Tuberculose zoonótica

A tuberculose em humanos é causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, entretanto, a tuberculose bovina originada por *M. bovis* pode ser subestimada em seres humanos como causa da tuberculose de origem zoonótica, por não realizar diagnóstico diferencial de *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis* (OLEA-POPELKA et al., 2016). Alguns fatores predisponentes podem levar ao desenvolvimento da doença em seres humanos como o consumo de leite contaminado sem os devidos tratamentos térmicos, contato com aerossóis de animais doentes (SICHEWO et al., 2019) e consumo de carne bovina cozida inadequadamente (SAIDU et al., 2015). No Brasil, os abatedouros clandestinos municipais que não seguem as normas sanitárias expostas pela lei, apresentam um alto risco de contaminação por *M. bovis* através da ingestão da carne (GARRO et al., 2011). Os grupos ocupacionais que lidam diretamente com os animais como magarefes, médicos veterinários, pecuaristas são considerados grupos com maior risco de desenvolver a doença (UNE; MORI, 2007).

Estima-se que *M. bovis* é responsável por 0,5 a 7,2% dos casos de tuberculose humana em países desenvolvidos e por 10 a 15% de novos casos nos países em processo de desenvolvimento (DE LA RUA-DOMENECH, 2006). Avaliações sobre a ocorrência da tuberculose bovina em humanos são de extrema importância, especialmente devido à falta de informação onde a tuberculose bovina é endêmica. Em 2018, foram diagnosticados 72.788 novos casos de tuberculose humana no Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, dos quais 4.559 casos foram registrados no estado do Ceará, sem informações de pacientes com tuberculose causada por *M. bovis* (BRASIL, 2019).

Em muitos casos o diagnóstico ineficiente da tuberculose por *M. bovis* em seres humanos pode levar a um tratamento ineficaz, considerando que o tratamento da tuberculose zoonótica é complexo porque *M. bovis* é resistente a pirazinamida, um dos medicamentos essenciais no tratamento da tuberculose humana. Os sintomas clínicos causados tanto por *M. tuberculosis* e *M. bovis* são difíceis de diferenciar, tornando a tuberculose zoonótica subdiagnosticada (WHO, FAO, OIE, 2017). Rahman et al. (2015) coletaram amostras de escarros de pacientes com tuberculose e de leite em bovinos com sinais de TB para pesquisar a existência de *M. bovis* através da PCR. A amplificação por PCR do fragmento de DNA de *Mycobacterium bovis* foi encontrada em 12,33% (37/300) das amostras de bovinos e em 6,67% (6/90) do escarro, indicando a possibilidade da transmissão zoonótica.

Bapat et al. (2017), em um estudo para avaliar a incidência da tuberculose bovina em diferentes populações da Índia Central e os fatores que podem levar ao desenvolvimento da doença, concluíram que a mesma está presente principalmente na população humana que mantém contato próximo com os animais. Segundo Khattak et al. (2016), a informação sobre a tuberculose bovina em seres humanos a partir do contato com animais é negligenciada. Por isso, esses autores realizaram um estudo com trabalhadores de matadouros, açougues, médicos veterinários e assistentes veterinários para avaliar a ocorrência da tuberculose zoonótica no Peshawar, Paquistão e perceberam que as informações sobre os riscos da doença entre alguns desses grupos eram escassas e a ausência do uso de equipamentos de proteção, propiciou um maior risco em desenvolver a enfermidade, principalmente em trabalhadores de matadouro.

Uma abordagem intersetorial e multidisciplinar de saúde única que envolva a saúde animal, humana e ambiental são importantes para enfrentar os desafios colocados pela tuberculose zoonótica e outras enfermidades que tenham relação entre animais e seres humanos (OLEA-POPELKA; FUJIWARA, 2018).

3.4 Imunopatogenia

As alterações patológicas geradas na infecção por TB estão associadas à interação entre os mecanismos de defesa do hospedeiro, fatores de virulência do microrganismo e o equilíbrio entre as respostas imunológicas e os processos inflamatórios. A doença forma um processo inflamatório caseoso-necrosante granulomatoso crônico que afeta principalmente os pulmões e os linfonodos regionais, por ser a via respiratória a principal forma de infecção, porém, outros órgãos também podem ser comprometidos como ossos, articulações, intestino e sistema nervoso central (DOMINGO; VIDAL; MARCO, 2014).

Após entrar em contato com o hospedeiro, o agente é fagocitado pelos macrófagos que são os sítios primários da divisão intracelular de *M. bovis* no local da infecção. Entretanto, quando a resposta imune é ineficiente e não consegue eliminar a micobacteria, o patógeno multiplica-se no interior dos macrófagos ocasionando lise destes, ocorrendo liberação dos microrganismos, que serão fagocitados na corrente sanguínea por outros macrófagos que não foram ativados (BRASIL, 2006). A lise celular causada nos macrófagos induz a liberação de quimiocinas e citocinas fazendo com que outras células migrem para o local da infecção (PALMER et al., 2019). As células T apresentam grande importância na primeira linha de defesa contra os patógenos invasores e na formação da resposta imune adaptativa (HAYDAY, 2000).

Uma reação de hipersensibilidade tardia é estimulada pelo sistema imune com a parada da propagação bacilar, ocasionando destruição tecidual do hospedeiro por meio de necrose de caseificação, na tentativa em extinguir ou mesmo limitar o crescimento de *M. bovis* levando a formação de granulomas (DOMINGO; VIDAL; MARCO, 2014). A morfologia microscópica do granuloma tuberculóide caracteriza-se por uma região central de necrose caseosa, cercada por macrófagos, células epitelióides, células gigantes de Langerhans multinucleadas, linfócitos, células plasmáticas ocasionais, envoltos por uma cápsula fibrosa (PALMER et al., 2019) que pode ter sua estrutura alterada de acordo com o grau da infecção, apresentando um nível de fibrose mais acentuado em lesões crônicas (Warren et al., 2006).

De acordo com o desenvolvimento das lesões, após o indivíduo ser contaminado, as lesões iniciais distinguidas como complexo primário podem permanecer estáveis ou progredir para a forma miliar, quando acomete todo sistema (RADOSTITS et al., 2002).

3.5 Transmissão

A tuberculose bovina pode ser transmitida de diferentes formas, podendo ocorrer entre indivíduos da mesma espécie ou espécies distintas (NUGENT, 2011). O bovino contaminado é a principal fonte de infecção para o rebanho, podendo transmitir a doença principalmente pela via respiratória por meio de aerossóis, e para que isso aconteça, é necessário o contato próximo entre esses animais (CORNER, 2006). A infecção pela via digestiva nos bovinos pode ocorrer, entretanto é considerada secundária à respiratória, devido a poucos relatos de bovinos apresentando lesões mesentéricas (NEILL et al., 1994). Os animais podem se infectar indiretamente através do meio ambiente por meio do contato com fezes, urina, água, solo e pastagem contaminada com *M. bovis* (CUNHA et al., 2019).

Um fator de risco importante para que a doença seja introduzida no plantel é a aquisição de novos animais sem a realização da tuberculinização, assim, como a densidade animal, que aumenta a probabilidade de transmissão principalmente nos rebanhos leiteiros, devido a uma maior aproximação durante as ordenhas (GOODCHILD; CLIFTON-HADLEY, 2001; BAHIENSE et al., 2016).

Outra rota de transmissão importante para os bovinos são os animais silvestres, os quais atuam como reservatório de *M. bovis*, e dificultam o processo de erradicação da doença nos rebanhos devido à interação entre as espécies (CORNER; MURPHY; GORMLEY; 2011).

A contaminação humana por *M. bovis* pode ocorrer através do consumo de produtos de origem animal contaminados pelo microrganismo e de forma direta quando há um contato próximo com aerossóis de animais infectados (OIE, 2017). O risco de

transmissão aumenta principalmente para pessoas que lidam diretamente com os animais como veterinários, magarefes, inspetores de frigoríficos e produtores rurais (VALENTE; VALE; BRAGA, 2011).

3.6 Sinais clínicos

Os bovinos acometidos por *M. bovis* podem apresentar sinais clínicos como emagrecimento progressivo, febre, fraqueza, inapetência, quando o sistema respiratório está envolvido, apresentam tosse úmida, que piora durante exercícios e dispnéia ou taquipnéia (UNE; MORI, 2007). A tuberculose acomete frequentemente os pulmões e linfonodos do sistema respiratório (SANCHEZ et al., 2011).

Alguns testes podem ser realizados durante a análise clínica, para verificação dos sintomas como a compressão na região da faringe para verificar a presença de tosse crônica, sendo indicativo de uma broncopneumonia, auscultação e percussão do tórax para detectar áreas de silêncio e ruído. A disfagia e respiração ruidosa podem estar presentes devido a aumento dos linfonodos retrofaríngeos. Alguns animais podem apresentar outros sinais clínicos extrapulmonar como aumento de volume na parte superior dos quartos posteriores do úbere, aumento de volume nos linfonodos supramamários, podendo está relacionado com a forma mastítica da doença, sendo um grande problema de saúde pública devido à disseminação da enfermidade através do leite contaminado (RADOSTITS et al., 2002).

3.7 Métodos de diagnóstico

O uso de técnicas diagnósticas utilizando amostras de tecido de animais supostamente infectados para detecção de *M. bovis*, tem colaborado para o controle e erradicação da doença (COSTA et al., 2013). Os métodos de diagnósticos da tuberculose podem ser divididos em métodos diretos os quais determinam a presença do agente etiológico no material biológico, como testes bacteriológicos, histopatológicos e moleculares e em métodos indiretos, que pesquisam a resposta gerada pelo animal ao agente etiológico,

podendo ser humoral com produção de anticorpos circulantes ou celular, mediada por linfócitos e macrófagos (CORNER, 1994; CAGIOLA et al., 2004).

O diagnóstico clínico associado ao teste tuberculínico é utilizado constantemente a campo. O teste consegue na maioria das vezes identificar a doença em estágio crônico, a onde os animais apresentam um decréscimo da sensibilização alérgica (SAKAMOTO et al., 2008). Outros métodos utilizados com frequência para detecção da tuberculose em bovinos e bubalinos é a bacteriologia e histopatologia (BRASIL, 2006).

A inspeção *post mortem* das amostras de carcaças bovinas nos frigoríficos é um método de grande importância para controle da tuberculose bovina (KU et al., 2018). Entretanto, Furlanetto et al. (2012) relataram que mesmo sendo uma técnica fundamental, no momento da avaliação macroscópica pode ocorrer dificuldades na detecção e identificação das lesões, desta forma, o uso de métodos complementares como exames bacteriológico, histopatológico, e molecular podem complementar a inspeção *post mortem*, melhorando o diagnóstico da tuberculose.

3.7.1. Diagnóstico Clínico

A tuberculose pode apresentar-se geralmente crônica em bovinos e estes mostrarem-se sadios, mas no estágio inicial da doença pode apresentar-se como aguda e progressiva, por isso, o diagnóstico pelo exame clínico pode insensível e com baixa especificidade (UNE; MORI, 2007; GORMLEY et al., 2014).

Um dos métodos mais utilizados, principalmente a campo, é o diagnóstico clínico associado à tuberculinização. O teste também pode identificar animais com tuberculose crônica, os quais podem apresentar um decréscimo da sensibilização alérgica, podendo, muitas vezes, chegar à anergia (BRASIL, 2006).

O diagnóstico com base apenas nos sinais clínicos pode ser dificultoso, pois a quantidade de animais com evidência clínica pode ser restrito ou ausente, sendo a

maioria diagnosticado por testes de rotina ou achados nos matadouros (COUSINS, 2001).

3.7.2 Diagnóstico Imunológico

O teste de diagnóstico imunológico oficial para tuberculose bovina é o teste alérgico cutâneo (CASAL et al., 2015), sendo considerado um método de referência pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e utilizado como ferramenta básica em programas de controle e erradicação da TB em todo o mundo, apresentando boa sensibilidade e especificidade quando o procedimento é executado de forma padronizada em todas as etapas, podendo diagnosticar infecções recentes (BRASIL, 2006).

Apresenta a vantagem de ser um método econômico, seguro e rápido (MOTA et al., 2008), entretanto, apresenta algumas limitações como dificuldades na administração e interpretação dos resultados, necessidade de uma segunda visita à propriedade, baixo grau de padronização e teste de acurácia variável (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006), bem como, dificuldades em detectar a doença em fêmeas que estão no período de periparto, estágios iniciais ou tardios da doença, devido ao período de incubação e anergia, respectivamente, e desnutrição. Animais testados com frequência podem tornar-se dessensibilizados, por apresentarem capacidade diminuída para responder a um novo teste alérgico, devido a uma deficiência temporária do sistema imunológico (BRASIL, 2006).

Para realização do teste de diagnóstico alérgico-cutâneo da TB, é utilizada a tuberculina Purified Protein Derivative- Derivado Proteico Purificado (PPD), um extrato proteico adquirido por precipitação de proteínas após o cultivo de micobactérias em meio sintético, ocasionando uma reação de hipersensibilidade tardia tipo IV no animal sensibilizado (MONAGHAN et al., 1994). Em 48 a 72 horas, a região de inoculação pode mostrar-se endurecida e hiperêmica, se o animal apresentar a doença, que ocorre pela reação das células T sensibilizadas com as proteínas PPD avária e bovina (TORTORA; FUNKE; CASE, 1998). Para aplicação da tuberculina, são utilizados três métodos intradérmicos, como o teste da prega caudal, cervical

simples e comparativo (BRASIL, 2006). O Teste Cervical Simples (TCS) é adotado como prova de rotina, o Teste da Prega Caudal (TPC) é empregado exclusivamente em bovino de corte, sendo o Teste Cervical Comparativo (TCC) o teste confirmatório ou utilizado como prova de rotina em rebanhos com histórico de reações inespecíficas (BRASIL, 2016).

Existem outros testes diagnósticos imunológicos como a dosagem do IFN- γ que fundamenta-se na detecção da resposta imunológica precoce mediada por células (RAMOS; SILVA; DELLAGOSTIN, 2015) e o ensaio de imunoadsorção enzimático ou ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) indireto, que mensura a ligação de anticorpos específicos a um antígeno (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

3.7.3 Diagnóstico *post mortem*

A detecção das lesões *post mortem* sugestivas de tuberculose bovina é realizada principalmente durante a inspeção sanitária em matadouros-frigoríficos e no procedimento de necropsia quando o animal vem a óbito em fazendas, seja por tuberculose ou outra patologia (KANTOR; RITACCO, 2006; PAIXÃO et al., 2008). A inspeção nos matadouros-frigoríficos brasileiros é regulamentada pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) da divisão de normas técnicas do Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Animal (DIPOA) do MAPA, aprovado em março de 1952, sendo constantemente reavaliado (BRASIL, 2017).

Para que os achados *post mortem* sejam eficientes, é importante um entendimento dos locais mais prováveis do surgimento das lesões sugestivas de tuberculose (MILIAN-SUAZO et al., 2000). Os linfonodos (mediastínicos, retrofaríngeos, bronquiais, parotídeos, cervicais, inguinais superficiais e mesentéricos), pulmão e fígado apresentam lesão em 95% dos casos (BRASIL, 2006). Biffa et al. (2012), em estudo realizado na Etiópia, observaram que os pulmões e os linfonodos associados ao sistema respiratório apresentaram uma maior frequência de lesões, seguido dos linfonodos intestinais e mesentéricos.

Em relação à aparência da lesão, pode variar com o desenvolvimento da infecção (PAIXÃO et al., 2008). Amostras de carcaças abatidas durante a inspeção sanitária em matadouros-frigoríficos podem apresentar nódulos granulomatosos de aspectos purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa ou apresentar calcificação no centro da lesão com ranger durante o corte (SOUZA et al., 2016).

As lesões geradas pelo microrganismo não são patognomônicas da doença (BRASIL, 2006), pois existem outros patógenos como *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. que apresentam lesões macroscópicas similares a TB (FURLANETO et al., 2020). Por isso, é necessário um treinamento mais intensivo dos agentes, os quais podem confundir as lesões tuberculosas com outras patologias (MENDES et al., 2013).

3.7.4 Diagnóstico histopatológico

Os diagnósticos histopatológicos são empregados para contornar a desvantagem da demora nos resultados bacteriológicos e em países em desenvolvimento com elevada incidência de tuberculose e restrições financeiras. Técnicas histopatológicas como hematoxilina-eosina (HE) e o método de Ziehl-Neelsen (ZN) são utilizados como métodos complementares no diagnóstico da TB bovina. Embora a histopatologia seja um método rápido e sensível, carece de especificidade (STEWART et al., 2013; FRANÇA et al., 2016).

Na técnica de coloração por hematoxilina-eosina ocorre acúmulo de macrófagos com formação de células gigantes de Langerhans, circundadas por linfócitos, plasmócitos, fibrose periférica e necrose caseosa central, formando um granuloma (NEILL et al., 1994.)

A coloração de Ziehl-Neelsen consiste em pesquisar a presença de bacilos álcool ácidos resistentes, os quais podem reter o material aquecido por fucsina após o tratamento de álcool-ácido, podendo ser observados ao microscópio (MARAIS et al., 2008). Outras micobactérias podem compartilhar das mesmas propriedades tintoriais e, portanto, são identificadas como bacilos álcool-ácidos resistentes pela coloração de

Ziehl-Neelsen dificultando diagnóstico (SEVILLA et al., 2015). A observação da presença de bacilos álcool-ácido resistentes só é possível em concentrações superiores a 10^3 bactérias por mL (ZANINI, 2002).

3.7.5 Diagnóstico bacteriológico

O isolamento primário é o método de diagnóstico confirmatório definitivo considerado para tuberculose bovina, podendo levar de 30 a 90 dias para crescimento (BRASIL, 2006). A técnica pode ser realizada utilizando amostras de lesões sugestivas de tuberculose bovina as quais serão semeadas em meios de cultura a base de piruvato como o Stonebrink-Lesslie (ST) que estimula o crescimento de *M. bovis*, e em meios Lowenstein-Jensen (LJ), que contém glicerol e favorece o crescimento de *M. tuberculosis* (KANTOR; RITTACO, 1994). O meio escolhido para cultivo interfere no tempo de crescimento da micobactéria, a qual apresenta um desenvolvimento mais lento em meios sólidos quando comparado à inoculação em meios líquidos (MARCONDES et al., 2006), além de influenciar na taxa de recuperação da cultura microbiológica (YATES et al., 2017).

Antes de ser semeada nos meios de cultura, a amostra deve passar por processos de descontaminação, devido à provável presença de microrganismos menos exigentes que apresentam crescimento mais acelerado que *M. bovis*, consumindo os nutrientes do meio e tornando seu isolamento inviável (AMBROSIO et al., 2008). Diferentes reagentes químicos descontaminantes ácidos ou básicos são utilizados para este fim com protocolos distintos. Os métodos mais comuns são: Petroff, Petroff modificado, cloreto de 1-Hexadecilpiridínio (HPC), lauril sulfato de sódio, ácido oxálico, o de Corper e Stone modificado (fosfato trissódico a 23% e fosfato monossódico a 20%) e o de Kubica e Dye (NALC-NaOH) (DUARTE, 2010).

Assim, com objetivo de comparar três métodos de descontaminação, Medeiros et al. (2011) observaram uma maior recuperação de bacilos nas amostras com o método Hexadecilpiridínio (HPC) a 0,75 % em relação aos outros descontaminantes utilizados. Furlanetto et al. (2012) utilizaram o método Petroff para descontaminação de amostras

e observaram mais quantidade de colônias quando comparado ao HPC. Ambrosio et al. (2008) analisaram três tratamentos de descontaminação, que foram o NaOH a 4% (Método Petroff), Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) a 12% e Cloreto de 1-Hexadecilpiridínio (HPC) a 1,5%. Para o tratamento controle foi utilizada solução salina a 0,9%. O HPC proporcionou uma menor taxa de contaminação (3%) quando comparado ao controle (88%), NaOH (33%) e H_2SO_4 (21,7%). Em relação ao sucesso do isolamento, o método HPC foi melhor (40%) que o controle (3%), o hidróxido de sódio (NaOH) 13% e ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1,7%. Indicando que o HPC é uma alternativa ao método de Petroff.

É importante que todas as etapas do processo, desde a escolha das amostras de tecidos no exame *post mortem*, seleção do meio de cultura e condições empregadas para cultivar o microrganismo, tenham sido desempenhadas de forma ideal, pois contribui para a sensibilidade e especificidade do método e o sucesso do diagnóstico (GORMLEY et al., 2014). O método pode apresentar baixa sensibilidade, podendo estar relacionada com algumas etapas do processo como a descontaminação, que além de destruir contaminantes pode ocorrer perdas de bacilos, aumentando assim os resultados falso-negativos e o tempo prolongado para obter isolamento e identificação bioquímica do agente (CONER, 1994).

3.7.6 Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares tem sido implementadas no diagnóstico da TB como um teste auxiliar à cultura microbiológica, para detecção de DNA do bacilo em amostras de tecido (LORENTE-LEAL et al., 2019). As técnicas são baseadas em sua maioria na reação em cadeia da polimerase (PCR) e tem como alvo polimorfismos específicos, sequências de inserção e as regiões de diferença genômica de *Mycobacterium* spp. (REDDINGTON et al., 2011).

A PCR foi descoberta no início em 1986 por Kary Banks 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).

A PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade para identificar agentes infecciosos, não sendo necessário que os microrganismos estejam viáveis na amostra biológica. A técnica consiste em duplicar fitas de DNA *in vitro* através de modificação de temperatura. Sendo necessário para sua realização desoxinucleotídeos (dNTPs) do DNA (A-T-C-G), *primers* ou sequências de iniciadores específicos, DNA polimerase termoestável, DNA extraído da amostra clínica, um cofator para atividade da *Taq* DNA polimerase que é o cloreto de magnésio ($MgCl_2$), um tampão, geralmente cloreto de potássio (KCl), para conservar pH e condição adequada para atividade enzimática e água ultrapura, como diluente (HAAS; TORRES, 2016). Assim, para se obtenha sucesso com o emprego da técnica, é importante a escolha correta dos marcadores moleculares que serão detectados e amplificados, assim como, a sequência de *primers* utilizado e extração de DNA de qualidade (SAKAMOTO et al., 2008).

Quando há necessidade de distinção e identificação das espécies do complexo *M. tuberculosis*, pode ser empregada a técnica de PCR multiplex, que tem se mostrado uma ferramenta útil, como utilizada por Alzamora Filho et al. (2014), associada à inspeção *post mortem* de rotina, demonstrando ser uma técnica promissora para a vigilância da tuberculose bovina em abatedouros, contribuindo para o sucesso do programa de erradicação dessa enfermidade. Sposito et al. (2014) com objetivo de diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*, utilizaram PCR multiplex e confirmaram ser uma técnica benéfica para diferenciação de micobactérias do *Complexo Mycobacterium tuberculosis*.

Warren et al. (2006) utilizaram a técnica fundamentada em regiões de diferença (RD1, RD2, RD4, RD9 e RD12), onde o tamanho do produto gerado na amplificação, correspondem a ausência ou presença das regiões de diferença (RD). Essas regiões foram desenvolvidas para a identificação das espécies do *Complexo Mycobacterium tuberculosis*, resultantes da PCR multiplex. O autor destaca que este protocolo permite a diferenciação mais precisa, tornando-o adequado para fins de rotina de vigilância e laboratórios.

4 CONTROLE E PREVENÇÃO

Alguns países já erradicaram ou alcançaram bons níveis de controle da tuberculose em bovinos, como os países europeus e norte-americanos, assim como a Austrália e a Nova Zelândia. No entanto, existem países em que a situação epidemiológica da doença é mal compreendida (FERREIRA NETO, 2018).

Em todo o mundo, o controle da TB se dá pela identificação das fontes de infecção, por meio de testes tuberculínicos com posterior abate dos animais reagentes, bem como a realização de testes antes da entrada de novos animais no rebanho. Os animais devem ser testados na origem e logo após a entrada no quarentenário da unidade de criação, respeitando-se o intervalo mínimo de 60 dias entre os testes. Em relação aos produtos de origem animal destinados ao consumo humano, a principal forma de controle é através da inspeção sanitária da carne e derivados, pasteurização ou esterilização do leite e derivados, diminuindo os riscos de transmissão de *M. bovis* ao homem (BRASIL, 2006).

Entretanto, a grande dificuldade no controle e erradicação da doença é a presença de reservatório de animais silvestres, uma vez que o reservatório é frequentemente mal observado e difícil de gerenciar (KAO; CARTER; AUSTERMAN, 2016).

No Brasil a execução do PNCEBT implica em métodos para o controle ou mesmo a erradicação da tuberculose no país, os quais incluem certificação de propriedades livres ou monitoradas da doença, com adesão voluntária dos produtores; controle do trânsito de animais; normas sanitárias para participação de bovinos em eventos pecuários, incluindo exposições, feiras e leilões; credenciamento e capacitação de médicos-veterinários; diagnóstico e apoio laboratorial com participação do serviço veterinário oficial (SVO); e educação sanitária (BRASIL, 2016).

Neto et al. (2019), realizaram um estudo em 48 propriedades no estado do Espírito Santo, para determinar a prevalência e os fatores de risco da TB por meio de teste tuberculínico cervical simples e teste cervical comparativo. Concluíram que o principal fator de risco para a TB foi a aquisição de novos animais e, sobretudo,

quando estes não eram testados para a doença antes de serem introduzidos na propriedade.

Para o controle da tuberculose bovina, além da implantação de um programa sanitário no rebanho bovino, devem-se adotar medidas educativas com a população, a exemplo da utilização de equipamentos de proteção individual dos trabalhadores que lidam com animais, especialmente na indústria da carne (THOEN; LOBUE; KANTOR, 2006). A vacinação e o tratamento da tuberculose bovina, não podem ser adotados até o momento como forma de controle da doença, todo animal com diagnóstico positivo deve ser eliminado com abate sanitário em matadouros-frigoríficos que possuem inspeção sanitária (BRASIL, 2006).

Os resultados obtidos serão apresentados em forma de artigo científico, o qual será submetido para publicação na Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, desta forma, a formatação do manuscrito aqui apresentado seguirá as normas da revista.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO *Mycobacterium bovis* EM LESÕES TECIDUAIS DE BOVINOS ABATIDOS EM MATADOUROS- FRIGORÍFICOS LOCALIZADOS NO ESTADO DO CEARÁ

ARTIGO ORIGINAL**Isolamento e identificação molecular de *Mycobacterium bovis* em lesões teciduais de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos localizados no Estado do Ceará****Isolation and molecular identification of *Mycobacterium bovis* in tissue lesions of cattle slaughtered in slaughterhouses located in the State of Ceará**

Jaqueline Queiroz Amorim^{1*}, Bruno Ribeiro dos Santos¹, Hllytchaikra. F. Fehlberg¹, Alana V. da Silva¹, Felipe F. Ferreira², Joselito Nunes Costa³, Fernando Alzamora Filho¹

1 Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rod. Jorge Amado, Km 16 - Salobrinho, Ilhéus, BA, 45662-900, Brasil. amorimqueirozj@gmail.com*

2 Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará. Av. Bezerra de Menezes, 1820, São Gerardo, Fortaleza, CE 60.325-002. Brasil.

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

RESUMO

O objetivo do trabalho foi pesquisar *Mycobacterium bovis* em lesões sugestivas de tuberculose nas carcaças de bovinos no Estado do Ceará, por meio dos testes de diagnóstico bacteriológico e molecular. Entre agosto de 2017 e janeiro de 2019, o serviço de inspeção Estadual (SIE) inspecionou 59.512 bovinos, destes 7,4% (44/59.512) apresentaram lesões sugestivas. Desses animais foram enviadas 68 amostras, as quais estavam localizadas no pulmão 4,5% (31/68), linfonodos 2,9% (20/68), fígado 2,0% (14/68) e carcaça 0,4% (3/68). Ao realizar o isolamento bacteriológico, 15,9% (7/44) dos bovinos evidenciaram crescimento de colônias nas amostras. Os esfregaços dos isolados foram submetidos à coloração de Zielh-Neelsen e todos confirmaram bacilo álcool ácido resistente. A reação em cadeia da polimerase identificou todos os

31 isolados 100% (7/7) como *M. bovis*. A associação das técnicas de diagnóstico permitiu
32 identificar a presença do agente no Estado e a análise molecular demonstrou ser uma
33 técnica benéfica no monitoramento da tuberculose bovina, podendo ser utilizada como
34 um método auxiliar no programa de controle e erradicação da tuberculose bovina no
35 Estado do Ceará.

36 **Palavra-chave:** Diagnóstico. Epidemiologia. *Mycobacterium* ssp. PCR multiplex.

37

38 **Isolation and molecular identification of *Mycobacterium bovis* in tissue lesions of**
39 **cattle slaughtered in slaughterhouses located in the State of Ceará**

40 **ABSTRACT**

41 The objective of the research was to identify *Mycobacterium bovis* in lesions suggestive
42 of tuberculosis in bovine carcasses in the State of Ceará, by means of bacteriological
43 and molecular diagnostic tests. Between August 2017 and January 2019, the State
44 inspection service (SIE) inspected 59,512 cattle, of which 7.4% (44 / 59,512) presented
45 suggestive lesions. Of these animals, 68 samples were sent, which were located in the
46 lung 4.5% (31/68), lymph nodes 2.9% (20/68), liver 2.0% (14/68) and 0.4% carcass
47 (3/68). When performing bacteriological isolation, 15.9% (7/44) of bovines showed
48 colony growth in the samples. The smears of the isolates were submitted to Zielh-
49 Neelsen staining and all confirmed bacillus acid resistant alcohol. The polymerase chain
50 reaction identified all isolates 100% (7/7) as *M. bovis*. The association of diagnostic
51 techniques allowed to identify the presence of the agent in the State and the molecular
52 analysis proved to be a beneficial technique in the monitoring of bovine tuberculosis,
53 and can be used as an auxiliary method in the bovine tuberculosis control and
54 eradication program in the State of Ceará.

55 **Keyword:** Diagnosis, multiplex PCR, *Mycobacterium* ssp, Epidemiology.

56

57 **INTRODUÇÃO**

58 A tuberculose bovina (TB) é uma doença de evolução crônica causada pelo
59 *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) (CHIU et al., 2019), caracterizada por lesões nodulares
60 granulomatosas de desenvolvimento progressivo, denominado tubérculos e são
61 comumente observadas nos pulmões, pleura, linfonodos adjacentes, fígado, baço e
62 intestino (VORDERMEIER et al., 2012; OIE,2019). Sendo considerada uma das causas
63 de perdas econômicas importantes ao setor agropecuário, podendo originar morte dos
64 animais, redução no ganho de peso, diminuição na produção de leite e descarte precoce
65 de animais de alto valor zootécnico (PACHECO et al., 2009; AHAMAD et al., 2017).

66 *M. bovis* possui uma ampla cadeia de hospedeiros, podendo, ocasionar tuberculose
67 zoonótica, sendo transmitida, sobretudo, por meio do consumo de produtos de origem
68 animal infectado, principalmente em regiões em que a sanidade alimentar é deficiente.
69 O risco de transmissão é maior para trabalhadores ocupacionais, devido o contato direto
70 com os animais, já que o patógeno pode ser transmitido também por aerossóis (OIE,
71 2020). Neste contexto, a inspeção sanitária em matadouros-frigoríficos é uma
72 ferramenta de grande importância para a identificação de lesões sugestivas da doença e
73 rastreamento de focos, auxiliando a vigilância sanitária da tuberculose (SOUZA et al.,
74 2016). Alguns países como Estados Unidos, Canadá, Cuba, Austrália e a maioria da
75 Europa continental demonstraram que o monitoramento em frigoríficos é importante para
76 eliminação de animais infectados pela doença, podendo levar a redução da tuberculose
77 bovina nos rebanhos (AYELE et al., 2004). No Brasil, em 2001, um Programa Nacional
78 de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi instituído pelo
79 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o objetivo de
80 diminuir os impactos negativos dessas zoonoses na saúde humana e animal, (BRASIL,
81 2017). No estado do Ceará, mesmo com a presença de fatores que indique a existência
82 da doença em determinados rebanhos, não existem dados oficiais na agência de defesa
83 do estado, havendo necessidade de intensificação na fiscalização sanitária nos rebanhos
84 e nos matadouros-frigoríficos. Um estudo realizado no estado do Ceará utilizando
85 técnica de genotipagem molecular em conjunto com isolamento bacteriológico
86 confirmou a presença de *M. bovis* no estado, segundo os autores, a pesquisa pode

87 contribuir para criação de um banco de dados para posteriores estudos epidemiológicos.
88 (NASCIMENTO, 2014; FERREIRA et al., 2020).

89 O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser realizado por meio de isolamento e
90 identificação do agente etiológico no material biológico, conhecido como “padrão ouro”
91 (PACHECO et al., 2009). Entretanto, estudos vêm evidenciando o uso de métodos
92 moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção de *M. bovis*
93 em lesões sugestivas de tuberculose, permitindo assim, uma maior acurácia, contribuindo
94 para o controle e erradicação da tuberculose bovina (CARDOSO et al., 2009 ; COSTA
95 et al., 2013). Técnicas como a PCR multiplex tem mostrado uma ferramenta benéfica,
96 associada à inspeção *post mortem* de rotina e isolamento bacteriológico, evidenciando
97 ser um método promissor para a vigilância sanitária da tuberculose bovina
98 (ALZAMORA FILHO et al., 2014). Sendo assim, foi realizado um estudo com o
99 objetivo de identificar a presença de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos com
100 lesões características de tuberculose, observadas durante a inspeção *post mortem* em
101 matadouros-frigoríficos com serviço de inspeção oficial no estado do Ceará, utilizando
102 como diagnóstico confirmatório o método molecular associado ao teste bacteriológico.

103 MATERIAL E MÉTODOS

104 Durante o período de agosto de 2017 a janeiro de 2019, 59.512 bovinos foram
105 inspecionados em três frigoríficos com Serviço de Inspeção Estadual (SIE), situados nos
106 municípios de Maracanaú, Iguatu e Juazeiro do Norte. As lesões sugestivas de
107 tuberculose foram coletadas durante a inspeção das carcaças bovinas pelo inspetor
108 Médico Veterinário e acondicionadas em coletores universal estéril contendo solução
109 saturada de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 140g/L) como meio conservante, o qual
110 preserva micobactérias por até 60 dias em temperatura ambiente (RICHARDS e
111 WRIGHT, 1983). As amostras com até 30 dias em solução saturada de borato, foram
112 encaminhadas para o Laboratório de Micobacterioses da Universidade Estadual de
113 Santa Cruz (LAMVET-UESC) para isolamento e identificação de micobactérias. As
114 lesões sugestivas de tuberculose bovina foram descontaminadas pelo cloreto de 1-
115 hexadecilpiridínio (HPC) a 1,5%, inoculadas nos meios de cultura Stonebrink-Leslie e
116 Lowenstein-Jensen e incubadas a 37°C por até 90 dias e avaliadas semanalmente para
117 identificação de crescimento de colônias sugestivas de micobactérias (RODRIGUEZ,

118 2005; BRASIL, 2008). Foi realizada coloração de Ziehl-Neelsen nas colônias isoladas
119 nos meios de cultura para confirmação das características tintoriais de bacilo álcool-
120 ácido resistente (BAAR). Desses isolados caracterizados como BAAR, foi realizada
121 extração do DNA. Para identificação do *Mycobacterium bovis*, foi realizada PCR
122 multiplex, segundo protocolo descrito por Warren et al. (2006), incluindo os desenhos
123 dos *primers* que são baseados nas regiões genômicas de diferença do complexo
124 *Mycobacterium tuberculosis*: RD1, RD4, RD9 e RD12. A amplificação do material
125 genético foi realizada em um volume final de 25 µL com 0,2U de Taq DNA polymerase
126 (HotStarTaq plus DNA polymerase, QIAGEN), tampão de PCR 1X, tampão Q 1X, 2,8
127 µL de H₂O, 2 µL MgCl₂, 4 µL de dNTP e 0,5 µL de cada primer. O controle positivo foi
128 obtido no Laboratório de Micobacterioses da Universidade Estadual de Santa Cruz -
129 (LAMVET-UESC) e para controle negativo água ultra pura, para avaliar o surgimento
130 de contaminantes. As áreas de pré- PCR e PCR foram realizadas em locais separados.
131 As condições da reação no termociclador SimpliAmp (applied biosystems by life
132 technologies) para amplificação do DNA foram: 95°C por 5 minutos (fase de
133 desnaturação); 45 ciclos de 94°C por um minuto, 62°C por um minuto e 72°C por um
134 minuto (fase de anelamento); seguidos por uma fase de extensão final a 72°C por 10
135 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (60V/cm) em
136 gel de agarose 3% em tampão TBE 1X e visualizados por coloração com SYBR Safe
137 10.000 vezes diluído.

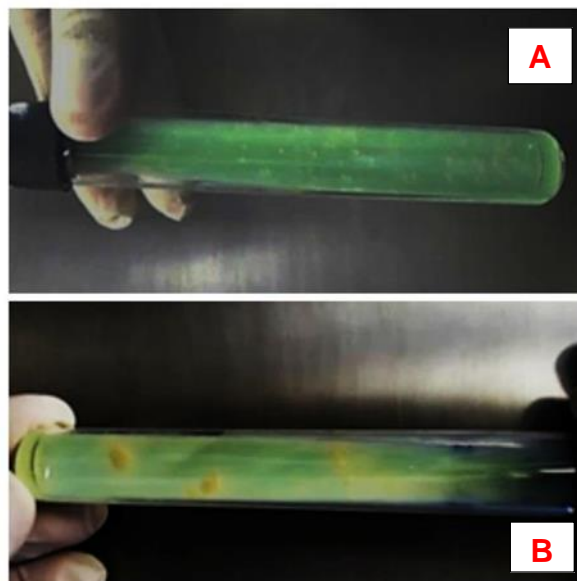
138

139 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

140 Dos 59.512 bovinos sadios inspecionados ao exame *ante mortem*, 44 bovinos
141 apresentaram lesões sugestivas. Destes, foram enviadas ao laboratório 68 lesões
142 sugestivas de tuberculose bovina durante o exame *post mortem*, obtidas durante a rotina
143 de abate pelo serviço de inspeção oficial. O método de diagnóstico por meio da
144 inspeção sanitária auxilia na identificação de lesões macroscópicas de tuberculose
145 bovina em regiões com elevada prevalência e contribui em reduzir a ocorrência da
146 doença nos bovinos e na transmissão a seres humanos e outros animais (CORNER,
147 1994). No presente estudo, a investigação de lesões sugestivas por meio da inspeção,
148 mostrou - se uma ferramenta eficiente para identificação de *M. bovis* e rastreamento de

149 focos da doença na região de estudo. De acordo com SOUZA et al (2016), a inspeção
150 deve ser realizada por profissionais capacitados para diminuir erros durante a detecção e
151 não gerar danos sanitários ao consumidor.

152 As lesões macroscópicas sugestiva de tuberculose bovina enviada para análise durante o
153 estudo estavam localizadas no pulmão (31), linfonodos (20), fígado (14) e carcaça (3).
154 Dados similares ao de Saidu et al. (2015), que inspecionaram 800 bovinos em
155 matadouros na Nigéria e observaram que as lesões estavam distribuídas no pulmão,
156 linfonodos e outros tecidos. Souza et al. (2014) avaliando a frequência de lesões
157 macroscópicas de bovinos abatido no estado de Minas Gerais, observaram ocorrência de
158 lesões semelhantes. O'REILLY; DABORN (1995) descrevem que a maior frequência
159 das lesões em sistema respiratório evidencia a importância da transmissão do bacilo pela
160 via respiratória, principalmente em animais que vivem em confinamento. Sendo assim,
161 os dados encontrados no estudo, onde a maior porcentagem de lesões foi observada no
162 pulmão, demonstra que a forma pulmonar pode ser uma via importante de transmissão
163 no estado do Ceará. Considerando a cultura como método padrão de diagnóstico de
164 tuberculose (CORNER, 1994), ao realizar o isolamento bacteriológico no presente
165 estudo, 15,9% (7/44) dos bovinos que apresentaram amostras com lesões sugestivas,
166 exibiram crescimento de colônias de coloração creme-amarelada, pequenas,
167 arredondadas, bordas irregulares, superfície granular em meio de cultura Stonebrink-
168 Leslie e o tempo médio observado para crescimento das colônias foi de 32 dias, sendo
169 mínimo de 23 dias e o máximo de 74 dias (Fig.1). Alzamora Filho et al. (2014)
170 demonstraram resultados semelhantes em meio de cultura Stonebrink-Leslie, com tempo
171 médio para o aparecimento das colônias de 34 dias.



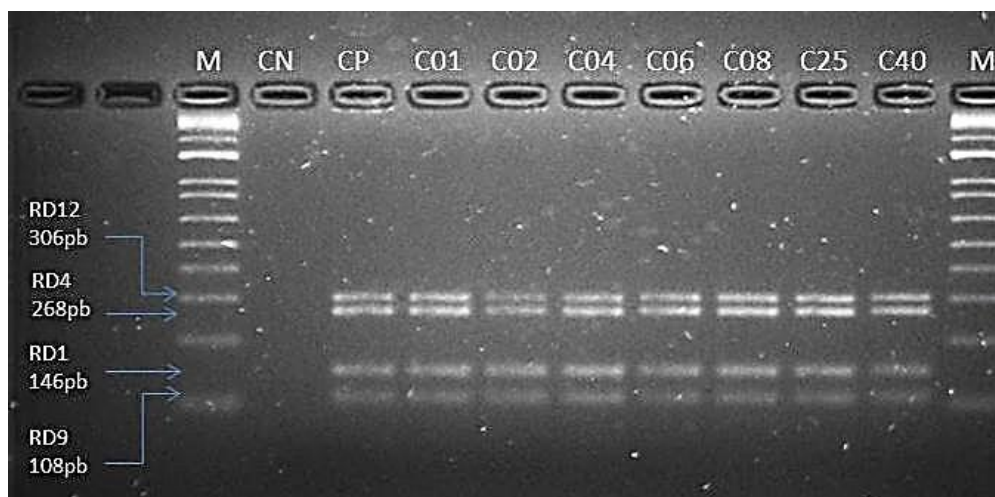
172

173 **Figura 1.** Colônias em meio Stonebrink- Leslie com 32 dias de cultivo (A) e após 60 dias de
174 cultivo (B).

175 A seleção dos meios de cultura disponíveis, procedimentos de descontaminação e
176 condições de incubação são fatores importantes, pois, podem interferir no resultado do
177 isolamento bacteriano (IKUTA et al., 2016). Yates et al. (2017) observaram que a
178 quantidade de bacilos nas amostras e o tempo de conservação destas até o
179 processamento pode influenciar na taxa de recuperação da cultura microbiológica,
180 podendo levar a resultados falso negativo. Sendo assim, no presente estudo todos os
181 métodos utilizados para o processamento da cultura mostraram ser eficientes.

182 As amostras que apresentaram crescimento de colônias foram submetidas à coloração
183 de Ziehl-Neelsen, visto que todos os esfregaços evidenciaram a presença de bacilos
184 álcool-ácido resistentes (BAAR). Souza et al. (2016), utilizaram a técnica de Ziehl-
185 Neelsen, para avaliarem 28 amostras com lesões em linfonodos bovinos, sendo que
186 13,6% demonstraram bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR), resultado semelhante ao
187 presente estudo.

188 Pela PCR multiplex, o *Mycobacterium bovis* foi identificado em 7/7 (100%) dos
189 isolados de acordo com o perfil de amplificação dos produtos esperados para a
190 micobactéria, dos quais apresentam amplificação dos fragmentos relativos às regiões
191 RD1 (146pb), RD4 (268pb), RD9 (108pb), RD12 (306pb) (Fig.2).



192

193 **Figura 2.** Perfil de amplificação de *Mycobacterium bovis* por PCR multiplex de isolados de
 194 cultivo bacteriano. M, marcador de peso molecular 100bp; CN, controle negativo (água ultra-
 195 pura); CP, controle positivo *Mycobacterium bovis*; C01, C02, C04, C06, C08, C25 e C40,
 196 amostras positivas para *M. bovis*.

197 A técnica de PCR multiplex em associação com a cultura bacteriológica mostrou-se
 198 valiosa para a confirmação da tuberculose bovina podendo ser utilizada para
 199 rastreamento e diferenciação de outras micobacterioses, assim como alcançado por Asil
 200 et al. (2013) que utilizou a técnica de PCR multiplex para detectar a tuberculose bovina
 201 no estado de Darfur do Sul, Sudão. A utilização da PCR multiplex como um método
 202 complementar para identificação de *M. bovis*, aumenta a segurança dos resultados,
 203 garantindo confiabilidade no diagnóstico. Furlanetto et al. (2012) em um estudo
 204 realizado no estado de Mato Grosso, empregando a PCR multiplex para identificação de
 205 *M. bovis*, demonstraram ser uma técnica benéfica, podendo ser utilizada para auxiliar a
 206 vigilância de tuberculose bovina em frigoríficos.

207 Com o objetivo de Identificação e diferenciação entre as micobactérias utilizando PCR
 208 multiplex, Ramos et al. (2018) avaliaram 31 (56,4%) amostras com lesões sugestivas
 209 de tuberculose, e destas, *M. bovis* foi identificado em 13 (41,9%) das amostras e
 210 *Mycobacterium spp.* identificadas em 18 (58,1%). Os autores apontaram que o
 211 isolamento e identificação de *M. bovis* e *Mycobacterium spp* em carcaças de bovinos,
 212 implica que os seres humanos estão expostos ao risco de infecção. Sendo assim, devido
 213 às consequências imprevisíveis causadas pela infecção por *M. bovis* na saúde animal e

214 humano, a caracterização molecular pode corroborar no controle e erradicação da
215 doença (CAZOLA et al., 2015).

216 Levando em consideração o sexo dos animais, os resultados dos isolados positivos na
217 PCR apresentaram 0,17% (6/7) para fêmeas e 0,08% (1/7) para machos. Esses
218 resultados estão em conformidade com os dados apresentados por Ahmad et al. (2017)
219 em um estudo realizado na Nigéria, os quais observaram 226 lesões sugestivas de
220 tuberculose, sendo que destas 79 eram provenientes de machos e 147 de fêmeas.
221 Admitindo o descrito por Acha e Szyfres, (2001) em que as fêmeas leiteiras são mais
222 susceptíveis em adquirir a doença do que os bovinos de corte, os quais são abatidos
223 precocemente, uma vez que, as fêmeas permanecem mais tempo no rebanho e tem
224 maior contato durante a ordenha.

225 A presença de *M. bovis* foi confirmada por meio da biologia molecular nas regiões
226 (Iguatu, Jucás e Quixelô) (Fig. 3). A presença do agente nessas regiões destaca a
227 importância da vigilância sanitária nos municípios, para que realize o controle contínuo
228 nas propriedades, buscando reforçar ou até mesmo implementar as principais medidas
229 preventivas estabelecidas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da
230 Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), prevenindo assim os riscos que a doença pode
231 causar a saúde animal e humana.



232

233 **Figura 3.** Mapa do estado do Ceará, destacando municípios de origem dos bovinos com lesões
234 sugestivas de Tuberculose Bovina (TB) condenados pelo Serviço de Inspeção Estadual e
235 municípios de procedência dos bovinos cujas lesões sugestivas tiveram diagnóstico
236 confirmatório para *M. bovis* pela biologia molecular.

237

238 **CONCLUSÕES**

239 O estudo demonstrou que associação dos métodos de diagnóstico *post mortem*,
240 bacteriológico e molecular proporcionou a identificação de *M. bovis* em municípios no
241 estado do Ceará. Esse resultado demonstra que o Ceará apresenta necessidade de
242 intensificação e melhoria das medidas de prevenção e controle previstas no PNCEBT,
243 como à certificação de propriedades rurais controladas e livres para tuberculose. O
244 Ceará não apresenta dados oficiais cadastrais para a tuberculose bovina e estudos
245 demonstrando a existência do microrganismo em propriedades rurais na região é
246 formidável para auxiliar a fiscalização sanitária na identificação da doença e elaboração
247 de estratégias para limitar a transmissão.

248 **AGRADECIMENTOS**

249 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo
250 suporte financeiro; à Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará (ADGRI)
251 pela colaboração na obtenção de informações e de amostras nos matadouros-frigoríficos
252 do Estado do Ceará e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal (PPGCA) da
253 UESC pelo suporte educacional.

254

255 **REFERÊNCIAS**

256 ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Tuberculosis Zoonótica. In: Zoonosis y Enfermidades
257 Transmissible Comunes al Hombre y a los animales. Washington: *Organización*
258 *Panamericana de la Salud*. 3 vol. (Publicación Científica y Técnica No. 580). 2001.

- 259 AHAMAD.I; KUDI, C.Y; ABDULKADIR, A.I; SAIDU, S.N.A. Occurrence and
260 distribution of bovine TB pathology by age, sex, and breed of cattle slaughtered in
261 Gusau Abattoir, Zamfara State Nigeria. *Tropical Animal Health and Production*.
262 49:583–589. 2017.
- 263 ALZAMORA FILHO, F.; REIS, V.M.; FEHLBERG, I.; ALCÂNTARA, A.C.; et al .
264 Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da
265 Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. *Arquivo Brasileiro Medicina*
266 *Veterinária e Zootecnia.*, v.66, n.5, p.1585-1591, 2014.
- 267 ASIL, E. T. A.; SANOUSI, S. M. E.; GAMEEL, A. et al. Bovine tuberculosis in South
268 Darfur State, Sudan: an abattoir study based on microscopy and molecular detection
269 methods. *Tropical Animal Health and Production.*, 45:469–472. 2013.
- 270 AYELE, W.Y.; NEILL, S. D.; ZINSSTAG, J. et al. Bovine tuberculosis: an old disease
271 but a new threat to Africa. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.*,
272 v.8, p.924-937, 2004.
- 273 BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da
274 Tuberculose e outras Microbactérias. Ministério da Saúde, Brasília. 2008, 436p.
- 275 BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
276 Animal PNCEBT. 2017. Disponível em:
277 <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude>
278 [animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/tb-1_pncebt.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/tb-1_pncebt.pdf)>. Acesso
279 em: 12 jun. 2018.
- 280 CAZOLA, D.O.; JORGE, K. S. G.; ZUMÁRRAGA, M. J. et al. Identificação e
281 genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para
282 tuberculose em Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, 35(2):141-147.
283 2015.
- 284 CARDOSO, M. A.; CARDOSO, R. F.; HIRATA, R. D. C. et al. Direct Detection of
285 *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. **Zoonoses and Public Health**,
286 v. 56, p. 465 - 470, 2009.

- 287 CHIU, L. J.V; TAUER, L.W; SMITH, R.L. et al. Assessment of the bovine tuberculosis
288 elimination protocol in the United States. *Journal of Dairy Science.*,102:2384–2400.
289 2019.
- 290 CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle.
291 *Veterinary Microbiology.*, v.40, p.53-63, 1994..
- 292 COSTA, P.; FERREIRA, A.S.; AMARO, A. et al. Enhanced Detection of Tuberculous
293 Mycobacteria in Animal Tissues Using a Semi-Nested Probe-Based RealTime PCR.
294 *PLoS ONE.*, Volume 8 | Issue 11 | e81337. 2013.
- 295 FERREIRA, F. F.; OLIVEIRA, M. L.M.; ALZAMORA FILHO, F. et al. Isolation and
296 genotyping of *Mycobacterium bovis* in suggestive lesions of tuberculosis in cattle
297 slaughtered in the state of Ceará, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 40(11):863-870, November
298 2020.
- 299 FURLANETTO, L.V.; FIGUEIREDO, E.E.S.; CONTE JÚNIOR, C.A. et al. Uso de
300 métodos complementares na inspeção *post-mortem* de carcaças com suspeita de
301 tuberculose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, v.32, p.1138-1144, 2012.
- 302 WARREN, R.M.; PITTUS, N. C. G. V.; BARNARD, M. et al. Differentiation of
303 *Mycobacterium tuberculosis complex* by PCR amplification of genomic regions of
304 difference. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.*, v. 10, n. 7, p. 818-
305 822, 2006.
- 306 IKUTA, C.Y.; MORATO, F.; SOUZA, G. et al. O. Influence of the incubation
307 conditions on culture media to optimize primary isolation of *Mycobacterium bovis*.
308 *Semina: Ciências Agrárias.*, v. 37, n. 5, p. 3693-3700, 2016.
- 309 NASCIMENTO, E.T.S. *Aspectos epidemiológicos da tuberculose bovina em*
310 *Quixeramobim (CE): bacia leiteira do sertão central do Ceará.* 2014, 71p. Dissertação
311 (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza: Ceará.
- 312 O'REILLY, L. M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* in
313 animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease.*, v.76, p.1-46, 1995.

- 314 OIE. Tuberculosis bovina. Disponível em: <[https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-](https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/)
315 [el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/](https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/)>. Acesso em: 18 dez.
316 2019.
- 317 OIE. Tuberculosis bovina. [https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-](https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/)
318 [mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/](https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/). Acesso em: 20 de out.
319 2020.
- 320 PACHECO, A. M.; HAMZÈ, A.L.; AVANZA, M.F.B. et al. Tuberculose bovina –
321 relato de caso. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.*, n. 13, 2009.
- 322 PAIXÃO, T.A.; BARBOSA, S.; NETA, A.V.C.; SANTOS, R. L. O Diagnóstico *Post-*
323 *mortem* da Tuberculose Bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootenia.*, v.59, p.
324 26 de 101,2008.
- 325 RAMOS, M. J.; HEINEMENN, M. B.; NETO, J. S. et al. Isolation and identification of
326 *Mycobacterium bovis* in bovines with positive reaction to the tuberculin test in the state
327 of Paraíba, northeast Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico.*, v.85, 1-7, e0842016.
328 2018.
- 329 RICHARDS, W. D.; WRIGHT, H.S. Preservation of tissue specimens during transport
330 to mycobacteriology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology.*, v.17, p.393-395,
331 1983.
- 332 RODRIGUEZ, C.A.R. *Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado*
333 *de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos.* 2005, 86f. (Tese
334 Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
335 Paulo, São Paulo.
- 336 SAIDU, A. S; OKOLOHA, E. C; GAMAWA, A.A. et al. Occurrence and Distribution
337 of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Slaughtered cattle in the abattoirs of
338 Bauchi State, Nigeria. *Veterinary World.*, 2231-0916. 2015.
- 339 SOUZA, M.A.; BOMONATO, N.G.; SOARES, P. M. et al. Frequência de lesões
340 macroscópicas em carcaças de bovinos reagentes ao teste tuberculínico. *Arquivos do*
341 *Instituto Biológico.*, v.81, n.4, p. 363-367, São Paulo. 2014.

- 342 SOUZA- FILHO, A. F.; OSÓRIO, A. L. A.; JORGE, S. G. et al. Genetic profiles of
343 *Mycobacterium bovis* from a cattle herd in southernmost Brazil. *Semina: Ciências*
344 *Agrárias.*, v. 37, n. 5, p. 3719-3726, Londrina. 2016.
- 345 VORDERMEIER, M.; AMENI, G.; BERG, S. et al. The influence of cattle breed on
346 susceptibility to bovine tuberculosis in Ethiopia. *Comparative Immunology*
347 *Microbiology and Infectious Diseases.* 35. 227– 232. 2012.
- 348 YATES, G.F.; PRICE-CARTER, M.; BLAND, K. et al. Comparison of the BBL
349 mycobacteria growth indicator tube, the BACTEC 12B, and solid media for the
350 isolation of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, vol.
351 29(4) 508– 512, 2017.
- 352 IKUTA, C.Y.; MORATO, F.; SOUZA, G. et al. O. Influence of the incubation
353 conditions on culture media to optimize primary isolation of *Mycobacterium bovis*.
354 *Semina: Ciências Agrárias.*, v. 37, n. 5, p. 3693-3700, 2016.
- 355 NASCIMENTO, E.T.S. *Aspectos epidemiológicos da tuberculose bovina em*
356 *Quixeramobim (CE): bacia leiteira do sertão central do Ceará.* 2014, 71p. Dissertação
357 (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza: Ceará.
- 358 O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* in
359 animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease.*, v.76, p.1-46, 1995.
- 360 OIE. Tuberculosis bovina, 2019. Disponível em: <[https://www.oie.int/es/sanidad-](https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/)
361 [animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/](https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/)>. Acesso em:
362 18 Dezembro de 2019.
- 363 PACHECO, A.M.; HAMZÈ, A.L.; AVANZA, M.F.B. et al. Tuberculose bovina –
364 relato de caso. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.*, n. 13, 2009.
- 365 PAIXÃO, T.A.; BARBOSA, S.; NETA, A.V.C.; SANTOS, R. L. O Diagnóstico *Post-*
366 *mortem* da Tuberculose Bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootenia.*, v.59,p.
367 26 de 101,2008.
- 368 RAMOS, M. J.; HEINEMENN, M. B.; NETO, J. S. et al. Isolation and identification of
369 *Mycobacterium bovis* in bovines with positive reaction to the tuberculin test in the state

- 370 of Paraíba, northeast Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico.*, v.85, 1-7, e0842016.
371 2018.
- 372 RICHARDS, W.D.; WRIGHT, H.S. Preservation of tissue specimens during transport
373 to mycobacteriology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology.*, v.17, p.393-395,
374 1983..
- 375 RODRIGUEZ, C.A.R. *Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado*
376 *de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos.* 2005, 86f. (Tese
377 Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
378 Paulo, São Paulo.
- 379 SAIDU, A. S; OKOLOHA, E. C; GAMAWA, A.A. et al. Occurrence and Distribution
380 of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Slaughtered cattle in the abattoirs of
381 Bauchi State, Nigeria. *Veterinary World.*, 2231-0916. 2015.
- 382 SOUZA, M.A.; BOMONATO, N.G.; SOARES, P. M. et al. Frequência de lesões
383 macroscópicas em carcaças de bovinos reagentes ao teste tuberculínico. *Arquivos do*
384 *Instituto Biológico.*, v.81, n.4, p. 363-367, São Paulo. 2014.
- 385 SOUZA- FILHO, A. F.; OSÓRIO, A. L. A.; JORGE, S. G. et al. Genetic profiles of
386 *Mycobacterium bovis* from a cattle herd in southernmost Brazil. *Semina: Ciências*
387 *Agrárias.*, v. 37, n. 5, p. 3719-3726, Londrina. 2016.
- 388 VORDERMEIER, M.; AMENI, G.; BERG, S. et al. The influence of cattle breed on
389 susceptibility to bovine tuberculosis in Ethiopia. *Comparative Immunology*
390 *Microbiology and Infectious Diseases.* 35. 227– 232. 2012.
- 391 YATES, G.F.; PRICE-CARTER, M.; BLAND, K. et al. Comparison of the BBL
392 mycobacteria growth indicator tube, the BACTEC 12B, and solid media for the
393 isolation of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, vol.
394 29(4) 508– 512, 2017.

6 CONCLUSÕES GERAIS

As informações alcançadas demonstraram a ocorrência da tuberculose bovina em determinadas regiões do Estado do Ceará a partir de lesões sugestivas, encaminhadas de matadouros-frigoríficos com Serviço de Inspeção Estadual.

A identificação da espécie por meio do diagnóstico molecular utilizando a PCR multiplex associado com inspeção *post-mortem* e isolamento bacteriológico foi hábil, além de ser um método rápido, podendo ser utilizado para auxiliar o programa de controle e erradicação da tuberculose bovina no estado do Ceará.

A partir dos resultados obtidos no estudo, pode-se recomendar um plano de vigilância ativa em matadouros-frigoríficos sob serviço de inspeção em busca de focos de tuberculose no Estado do Ceará.

REFERÊNCIAS

- ADRA, P. N.; SZYFRES, B. Tuberculosis Zoonótica. In: Zoonosis y Enfermedades Transmisible Comunes al Hombre y a los animales. Washington: **Organización Panamericana de la Salud**. 2001.
- AHAMAD.I; KUDI, C.Y; SAIDU, S.N.A. Occurrence and distribution of bovine TB pathology by age, sex, and breed of cattle slaughtered in Gusau Abattoir, Zamfara State Nigeria. **Tropical Animal Health and Production.**, 49:583–589. 2017.
- ALZAMORA FILHO, A. F. et al . Identificação de Mycobacterium bovis em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.66, n.5, p.1585-1591, 2014.
- AMBROSIO, S. R. et al. Comparison of three decontamination methods for Mycobacterium bovis Isolation. **Brazilian Journal of Microbiology.**, V.39, p241-244, 2008.
- ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. **Revista da Associação Médica Brasileira.**, v.39, p.175-186, 1993.
- ANAELOM, N.J. et al. Zoonotic tuberculosis: A review of epidemiology, clinical presentation, prevention and control. **Journal of Public Health and Epidemiology.**, v.2, n.6, p.118-124, 2010.
- ARAÚJO, C.P. **Isolamento de Mycobacterium bovis em cultura e sua identificação pela reação de polimerase em cadeia**. 2004. 52p. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande: Mato Grosso do Sul.
- ARANAZ, A. et al. Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.**, v.53, n.6, p.1785-1789, 2003.
- ARIAS, T.S.C. **Identificacion Molecular de Bacterias Asociadas a Cuadros Clinicos de Tuberculosis – AREQUIPA**. Tese de Doutorado para obtenção de título de Bióloga. 2018.
- ASIL, E. T. A. et al. Bovine tuberculosis in South Darfur State, Sudan: an abattoir study based on microscopy and molecular detection methods. **Tropical Animal Health and Production.**, 45:469–472. 2013.
- AYELE, W.Y. et al. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.**, v.8, p.924-937, 2004.
- BAHIENSE, L. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias.**, v.37, n.5, p.3549-3560, 2016.
- BARBIERI, J.M. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias.**, v.37, n.5, p.3531-3548, 2016.

BAPAT, P.R. et al. Prevalence of zoonotic tuberculosis and associated risk factors in Central Indian populations. **Journal of Epidemiology and Global Health.**, 7. 277–283. 2017.

BIFFA, D; BOGALE, A; GODEFROID, J; SKJERVE, E. Factors associated with severity of bovine tuberculosis in Ethiopian cattle. **Tropical Animal Health and Production.** 44:991–998. 2012.

BRASIL. **Manual Técnico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT. Brasília-DF, 192p. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobacterias.** Ministério da Saúde, Brasília. 2008, 436p.

BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). **Diagnóstico e apoio laboratorial.** 2016. <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/tb-7-diagnostico.pdf> > Acesso em 06 de Fevereiro de 2020.

BRASIL. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal-PNCEBT.** 2017. <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/tb-1-pncebt.pdf>> Acesso em: 12 Junho de 2018.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico- Ministério da Saúde.** 2019. Vol. 50, Nº 59. Tuberculose Notificações registradas no Ceará: Banco de Dados. <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/tubercce.de>> Acesso em: 19 de Dezembro 2019.

CAGIOLA, M. et al. Analysis of Possible Factors Affecting the Specificity of the Gamma Interferon Test in Tuberculosis-Free Cattle Herds. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.**, v.11, n. 5, p.952- 56, 2004.

CARDOSO, M. A. et al. Direct Detection of Mycobacterium bovis in Bovine Lymph Nodes by PCR. **Zoonoses Public Health.**, v.56, p.465-470, 2009.

CARVALHO, T. C. R. et al. Use of PCR for detection of bovine tuberculosis bacillus in milk of positive skin test cows Braz. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 42-48, 2014.

CARVALHO, R.C.T. et al. Evaluation of the efficiency of nested q-PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from tuberculosis-suspected lesions in post-mortem macroscopic inspections of bovine carcasses slaughtered in the state of Mato Grosso, Brazil. **Meat Science.**, 106, 11–15. 2015.

- CAZOLA, D.O. et al. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, 35(2):141-147. 2015.
- CHIU, L .J. V. e al. Assessment of the bovine tuberculosis elimination protocol in the United States. **Journal of Dairy Science.**,102:2384–2400. 2019.
- CORNER, L. A. Post mortem Diagnosis of Mycobacterium bovis Infection in cattle. **Veterinary Microbiology.**, v. 40, n.1-2, p. 53- 63, 1994.
- CONER, L. A. L. The role of wild animal populations the epidemiology of tuerculosis in domestic animals: **Veterinary Microbiology.**, Vol.112, p. 303 a 312, 2006.
- CORNER, L. A. L.; MURPHY.; D.; GORMLEY, E. Mycobacterium bovis Infection in the Eurasian Badger (*Meles meles*): the Disease, Pathogenesis, Epidemiology and **Control Engineering Practice.**,Vol. 144, 1- 24, 2011.
- COSTA, P. et al. Enhanced Detection of Tuberculous Mycobacteria in Animal Tissues Using a Semi-Nested Probe-Based RealTime PCR. **PLoS ONE.**, Volume 8 | Issue 11 | e81337. 2013.
- CASAL, C. et al. Effect of the inoculation site of bovine purified protein derivative(PPD) on the skin fold thickness increase in cattle from officiallytuberculosis free and tuberculosis-infected herds. **Preventive Veterinary Medicine.**, 2015.
- COUSINS, D.V.; WILTON, S.D .; FANCIS, B.R. Use of DNA amplification for the rapid identification of Mycobacterium bovis. **Veterinary Microbiology.**, V.27, p.187-195. 191.
- CUNHA, M. V. et al. Tuberculose animal: diagnóstico, epidemiologia, investigação e controlo. **SANIDADE ANIMAL. Vida Rural.**, 2019.
- DE LA RUA-DOMENECH, R. Human Mycobacterium bovis infection in the United 310 Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of 311 bovine tuberculosis. **Tuberculosis.**, v. 86, n. 2, p. 77–109, 2006.
- DIAS, R.A. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias.**, v.37, n.5, p.3673-3684, 2016.
- DOMINGO M, VIDAL .; MARCO A. Pathology of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science.**, 97:S20–S29. 2014.
- DUARTE, L.F.C. **Investigação de Mycobacterium bovis em bovinos abatidos no município de Feira de Santana, Bahia.** (Dissertação Mestrado). Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Salvador. Bahia. 2010.
- DVORSKA, L. et al. Study of Mycobacterium avium complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. **Veterinary Microbiology.**, v.99, p.239-250, 2004.

FAO; OIE; OMS. **Hoja de ruta contra la tuberculosis zoonótica.** 2017. <<https://www.oie.int/es/para-los-periodistas/comunicados-de-prensa/detalle/article/tb-partners-launch-first-roadmap-to-jointly-stop-the-transmission-of-bovine-and-zoonotic-tuberculosis/>>. Acesso em: 18 de Dezembro de 2019.

FERREIRA NETO, J.S. et al. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias.**, v.37, n.5, p.3385-3402, 2016.

FRANCIS, J. Tuberculosis in animals and man: A Study in Comparative Pathology. 1. ed, London, **Cassell and Company.**, 1958.

FRANÇA, L. R. et al. Diagnóstico pelas técnicas histopatológicas e Ziehl-Neelsen da Tuberculose Bovina de carcaça condenada em um frigorífico no estado a Bahia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas.**, 15(1): 52-55. 2016.

FURLANETTO, L.V. et al. Uso de métodos complementares na inspeção post-mortem de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v.32, p.1138-1144, 2012.

FURLANETTO, I. P. et al. Molecular epidemiology of Mycobacteria among herds in Marajó Island, Brazil, reveals strains genetically related and potential zoonotic risk of clinical relevance. **Journal Pre-proof.**, S1567-1348(19)30271-0. 2020.

GALVIS, J.O.A. et al. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias.**, v.37, n.5, p.3567-3578, 2016.

GARCIA- SAENZ, A. et al. Estimation of the individual slaughterhouse surveillance sensitivity for bovine tuberculosis in Catalonia (North- Eastern Spain). **Preventive Veterinary Medicine.**, v. 121, 2015.

GARRO, C. et al. Tuberculosis en terneros: resultados de un estudio prospectivo. **Revista Electrónica de Veterinária**, v.12, n.12, p.1-11, 2011.

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

GOLLNICK, N. S. et al. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. **Veterinary Immunology and Immunopathology.**, v.120. 2007.

GORMLEY, E.; CONER. A.L. Control Strategies for Wildlife Tuberculosis in Ireland. **School of Veterinary Medicine, University College Dublin (UCD), Dublin.**, Ireland. 2012.

GORMLEY, E. et al. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of Mycobacterium bovis and Mycobacterium caprae. **Research in Veterinary Science.**, v. 97, p. 30-43, 2014.

- GUEDES, I.B. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias.**, v.37, n.5, p.3579-3588, 2016.
- HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das Técnicas de PCR no Diagnóstico de Doenças Infecciosas dos Animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária** - ISSN:1679-7353 Ano XIV, Número 26 – Janeiro de 2016.
- HAYDAY, AC. Cells: $\gamma\delta$ a right time and a right place for a conserved third way of protection. **Annual Review of Immunology.** 2000;18:975–1026.
- HEINEMANN, M.B. et al. Tuberculose bovina: uma introdução à etiologia, cadeia epidemiológica, patogenia e sinais clínicos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1-12, 2008.
- IKUTA, C.Y. et al. O. Influence of the incubation conditions on culture media to optimize primary isolation of *Mycobacterium bovis*. **Semina: Ciências Agrárias.**, v. 37, n. 5, p. 3693-3700, 2016.
- WARREN, R.M. et al. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.**, v. 10, n. 7, p. 818-822, 2006.
- WATERS, W.R. Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: Historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 159. 113–132. 2014.
- WHO, FAO, OIE. **Zoonotic Tuberculosis.** 2017, < <https://www.who.int/tb/areas-of-work/zoonotic-tb/ZoonoticTBfactsheet2017.pdf>. > Acesso em: 07 de Janeiro 2020.
- KAO, R. R.; CARTER, M. P.; AUSTERMAN, S.R. Use of genomics to track bovine tuberculosis transmission. *Revue scientifique et technique.* 2016,
- KHATTAK, I. et al. Zoonotic tuberculosis in occupationally exposed groups in Pakistan. **Occupational Medicine**; 66:371–376. 2016.
- KU, B.K. et al. Investigation of bovine tuberculosis outbreaks by using a trace-back system and molecular typing in Korean Hanwoo beef cattle. **Journal of Veterinary Science.**, 19(1), 45-50, 2018.
- L, MEDEIROS. et al. Comparison of decontamination methods for primary isolation of *Mycobacterium bovis* in paucibacillary bovine tissues. **Applied Microbiology**, 54, 182–186. 2011.
- LIMA, P.B. et al. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Pernambuco, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, p.3601-3610, 2016.
- LORENT-LEAL, V. et al. Validation of a Real-Time PCR for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members in Bovine Tissue Samples. **Frontiers in Veterinary Science.** 2019.

- MARAIS, B. J. et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. **Clinical Infectious Diseases.**, vol. 47. 2008
- MARCONDES, A.G. et al. 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.
- MCFADYEAN, J. The connection between human and animal tuberculosis. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics.** 1888.
- MENDES, R.E. et al. Estudo anatomopatológico em tecidos condenados pelo serviço de inspeção federal (SIF) por suspeita de tuberculose. **Ciência Animal Brasileira.**, v.14, n.4, p.448-453, 2013.
- MILIAN-SUAZO,F. et al. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. **American Journal of Veterinary Research.**,V.61, p.86-9. 2000.
- MONAGHAN, M.L. et al. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology.**, v.40, n.1-2, p.111-124, 1994.
- MORRIS, R.S.; PFEIFEER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of Mycobacterium bovis infection. **Veterinary Microbiology.**, v.40. 1994.
- MOTA, P. M. P. C. et al. Diagnóstico Alérgico da Tuberculose Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia.**, v.59,p.13 de 101,2008.
- NASCIMENTO, E.T.S. **Aspectos epidemiológicos da tuberculose bovina em Quixeramobim (CE): bacia leiteira do sertão central do Ceará.** 2014, 71p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza: Ceará.
- NEILL, S. D. et al. Patogenesis of Mycoacterium bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology.** V.40, n.1-2, p. 41-52. 1994.
- NÉSPOLI, J.M.B. et al. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, p.3589-3600, 2016.
- NETO, G. M. et al. Epidemiologia da Tuberculose Bovina no Município de Ibitirama-ES. **Enciclopédia Biosfera.**, v.16 n.30; p. 2019.
- NUGENT, G. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: A New Zealand case study. **Veterinary Microbiology.**, 2011.
- OIE. **Tuberculose Bovina.** <<https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/>>. 2019. Acesso em: 20 Dezembro de 2019.
- OLEA-POPELKA, F. et al. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by Mycobacterium bovis-a call for action. World Health Organization. **Published by Elsevier.** 2016.

OLEA-POPELKA, F.; FUJWARA, P. Building a Multi-Institutional and Interdisciplinary Team to Develop a Zoonotic Tuberculosis Roadmap. **Integrated Approach for Zoonotic Tuberculosis**. 2018.

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

PACHECO, A.M. et al. Tuberculose bovina – relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.**, n. 13, 2009.

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

PAIXÃO, T.A. et al. O Diagnóstico *post- mortem* da Tuberculose Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootenia.**, v.59,p. 26 de 101,2008.

PALOMINO J.C. et al Tuberculosis. **From basic science to patient care**. 1aria. Ed. Bourcillier Kamps. 687p. 2007.

PALMER, M.V. et al. Early Pulmonary Lesions in Cattle Infected via Aerosolized *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Pathology**. 2019.

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

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária – um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737p.14, 2002.

RAHMAN, Md. M. et al. Molecular diagnosis of bovine tuberculosis in bovine and human samples: implications for zoonosis. **Future Microbiolog.**,10(4), 527–535 ISSN 1746-0913. 2015.

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.

RAMOS, M. J.; HEINEMENN, M. B.; NETO, J. S. et al. 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, 1-7, e0842016. 2018.

REDDINGTON, K. et al. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. **PLoS One.**, vol. 6, 2011.

RICHARDS, W.D.; WRIGHT, H.S. Preservation of tissue specimens during transport to mycobacteriology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.17, p.393-395, 1983

RIBEIRO, L.A. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the Federal District of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, p.3561-3566, 2016.

ROCHA, V.C.F. et al. Mycobacterium Bovis Como Agente Causal da Tuberculose Humana / MYCOBACTERIUM BOVIS AS CAUSAL AGENT OF HUMAN TUBERCULOSIS / **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV.**, v. 10, n. 2 e 3 (2012), p. 22–31, 2012.

ROCHA, W.V. et al. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Goiás, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, p.3625-3628, 2016.

RODRIGUEZ, C.A.R. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos**. 2005, 86f. (Tese Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RUGGIERO, A.P. et al. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico.**, v.74, n.1, p.55-65, 2007.

SAIDU, A. S; OKOLOHA, E. C; GAMAWA, A.A. et al. Occurrence and Distribution of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Slaughtered cattle in the abattoirs of Bauchi State, Nigeria. **Veterinary World.**, 2231-0916. 2015.

SALES, M.L. et al. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. **Folia Microbiologica**, 59:433–438, 2014.

SANCHEZ, J. et al. Aspectos microscópicos e imunológicos do granuloma tuberculoide e da tuberculose pulmonar cavitária em cabras naturalmente infectadas. **Journal of Comparative Pathology**. 2011.

SANTIAGO, P.A.; MUNÓZ, R. J.; MARTÍNEZ, M. L. **Identificación de espécies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante patrones de restricción**. 2014.

SAKAMOTO, S.M. et al. Métodos auxiliares de Diagnóstico de Tuberculose Bovina. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**. v 59, p. 43 de 101, 2008.

SEVILLA, I. A. et al. Detection of *Mycobacteria*, *Mycobacterium avium* Subspecies, and *Mycobacterium tuberculosis* Complex by a Novel Tetraplex Real-Time PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**. 2015.

SILVA, D.A.V. C. **Comparação Entre Métodos de Diagnósticos da Tuberculose em Bovinos Abatidos em Matadorouro-Frigorífico do Estado de São Paulo**. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinária-UNESP-SP. 2015.

SILVA, M.C.P. et al. Prevalence and herd-level risk factors for bovine tuberculosis in the state of Paraná, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, p.3611-3624, 2016.

SICHEWO, P. R. et al. Risk Factors for Zoonotic Tuberculosis at the Wildlife–Livestock–Human Interface in South Africa. **Pathogens.**, 2019.

- SOUZA, M.A. et al. Frequência de lesões macroscópicas em carcaças de bovinos reagentes ao teste tuberculínico. **Arquivos do Instituto Biológico.**, v.81, n.4, p. 363-367, São Paulo. 2014.
- SOUZA- FILHO, A. F. et al. Genetic profiles of *Mycobacterium bovis* from a cattle herd in southernmost Brazil. **Semina: Ciências Agrárias.**, v. 37, n. 5, p. 3719-3726, Londrina. 2016.
- SPOSITTO, F. L. E. et al. Multiplex-PCR for differentiation of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis complex*. Brazilian, **Journal of Microbiology**. 2014.
- STEWART L. D. et a. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-Based Methods. **PLoS ONE**. 2013.
- SKUCE R.A., ALLEN A.R.; McDOWWLL, W.J. 2012. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. **Veterinay Medicine International.**, 2012:1-10
- THOEN, C.; LOBUE, P.; KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**. 2006.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6.ed. São Paulo: **Artmed Editora S.A.**, 1998.
- UNE, Y.; MORI, T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. Comparative Immunology, **Microbiology and Infectious Diseases.**, v.30, n.5-6, p.415-425, 2007.
- VALENTE, L. C. M.; VALE, S. M. L. R.; BRAGA, M. Determinantes do Uso de Medidas Sanitárias de Controle da Brucelose e Tuberculose Bovinas. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Piracicaba, SP, vol. 49, nº 01, p. 215-232, jan/mar 2011 – Imprensa em maio 2011.
- VELOSO, F.P. et al. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, p.3659-3672, 2016.
- VORDERMEIER, M. etal. The influence of cattle breed on susceptibility to bovine tuberculosis in Ethiopia. Comparative Immunology **Microbiology and Infectious Diseases.** 35. 227– 232. 2012.
- VENDRAME, F.B. et al. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n.5, p.3639-3646, 2016.
- 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.

YATES, G.F. et al. Comparison of the BBL mycobacteria growth indicator tube, the BACTEC 12B, and solid media for the isolation of *Mycobacterium bovis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.**, vol. 29(4) 508– 512, 2017.

ZANINI, M.S. **Polimorfismo de DNA em *Mycobacterium bovis* e sensibilidade à isoniazida no Brasil.** 2002, 59 p. (Tese Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, Belo Horizonte: Minas Gerais.

ANEXO

Orientações para publicação de artigos na revista **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

INSTRUÇÕES AOS AUTORES



ISSN 1678-4162 *versão online*

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientações Gerais](#)
- [Comitê de Ética](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

Política Editorial

O periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPE Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)** citado como **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao **ABMVZ**.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

- O ABMVZ recebe submissões de artigos, somente em Inglês.
- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Leia "[PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE](#)"
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 2).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O **ABMVZ** comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em "Ethics Committee" (Step 2). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do

Projeto deve ser mencionado na Seção Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Title (português e inglês), Authors and Affiliation (somente na "Title Page" - Step 2), Resumo, Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (ou Results and Discussion), Conclusions, Acknowledgements (quando houver) e References.

É recomendado que o número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências e que o número de Referências não exceda a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Title (português e inglês), Authors and Affiliation (somente na "Title Page" - Step 2), Resumo, Abstract, Introduction, Casuistry, Discussion e Conclusions (quando pertinentes), Acknowledgements (quando houver) e References.

É recomendado que o número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras e que o número de Referências não exceda a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico. Seções do texto: Title (português e inglês), Authors and Affiliation (somente na "Title Page" - Step 2). Resumo (em Português). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem.

É recomendado que o número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras e que o número de Referências não exceda a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 2), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Title: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Authors and Affiliation: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com o número do ORCID (de todos os autores) e com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no "Title Page" (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*. * na submissão usar somente o Keyword (Step 3) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introduction: Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material and Methods: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA.**

(verificar o Item Comitê de Ética).

Results: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda de tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento, mas deve ser completa o suficiente para ser entendida independente do texto principal.. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussion: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusions: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Acknowledgements: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

References: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar

interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de

Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.