



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE PATOS**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE  
*Mycobacterium* spp. EM BOVINOS POSITIVOS NO TESTE DE  
TUBERCULINIZAÇÃO**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
do Centro de Saúde e Tecnologia Rural  
da Universidade Federal de Campina  
Grande, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre.**

**JOELSON MARCOLINO RAMOS**

**PATOS – PB  
JUNHO – 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS DE PATOS**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE**  
*Mycobacterium* spp. EM BOVINOS POSITIVOS NO TESTE DE  
**TUBERCULINIZAÇÃO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.**

**Mestrando: Joelson Marcolino Ramos**

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo**

PATOS – PB  
JUNHO – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

- R175i Ramos, Joelson Marcolino  
Isolamento e identificação de *Mycobacterium* spp. em bovinos positivos no teste de tuberculinização / Joelson Marcolino Ramos. – Patos, 2016.  
52f.: il. color.
- Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.
- "Orientação: Prof. Dr. Sergio Santos de Azevedo"  
"Coorientação: Prof. Dr. Albério Antônio de Barros Gomes"
- Referências.
1. Isolamento micobacteriano. 2. Identificação molecular. 3. Leite. 4. *Mycobacterium bovis*. 5. Tuberculose. I. Título.

CDU 614: 619

**JOELSON MARCOLINO RAMOS**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE  
*Mycobacterium* spp. EM BOVINOS POSITIVOS NO TESTE DE  
TUBERCULINIZAÇÃO**

Dissertação aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo  
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG

---

Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higinio  
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vivianne Cambuí Figueiredo Rocha  
Instituto Federal da Paraíba

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente á Deus por me permitir realizar mais uma conquista em minha vida, pois sem ele nada seria possível, amigo verdadeiro e companhia de todas as horas e situações.

Agradeço aos meus amados pais, Albenor e Maria Nazareth, por terem me apoiado sempre em toda a caminhada da minha vida.

As minhas irmãs, Jacksciene, Jaciara e Janayna pela amizade, companheirismo, carinho, briga, e atenção uns com os outros. Amo muito vocês.

A minha querida companheira Janaina por sempre estar me suportando e mostrando o que é amar sem questionar, nestes 8 anos, mesmo antes de iniciar esta caminhada, sempre esteve ao meu lado me ajudando a superar todas dificuldades impostas pela vida. Te amo.

A todos os professores pelos ensinamentos que me foram dados durante o trabalho para a minha formação, em especial para as professoras Maria das Graças e Márcia Melo, e para os professores Almir, Pedro Isidro, Eldinê Miranda, Clebert Alves e Albério entre outros.

Ao orientador Prof. Sérgio Santos de Azevedo, pela atenção, e compromisso, pelos conhecimentos imprescindíveis que me passou, sendo extremamente importante para meu crescimento profissional, por ter acreditado desde o primeiro dia de trabalho. Só tenho a agradecer a oportunidade e os conhecimentos adquiridos nesse período de trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Patologia Animal por toda ajuda prestada e pela amizade em especial ao Prof. Antônio Flavio pela disposição em todos os momentos do trabalho.

A todos que trabalham no Laboratório de Doenças Transmissíveis do CSTR/UFCG que deram sua contribuição para minha formação.

Ao apoio que os funcionários da SEDAP de cada ULSAV, Carpejane, Aluizio, Sóstenes, Petrônio e Aricélio. Que me ofereceram todo o suporte técnico para a realização da pesquisa a campo.

Aos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho, como Samara amiga de todas as horas.

Muito obrigado!

## RESUMO

Em áreas onde a tuberculose humana e a tuberculose bovina coexistem, a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é importante para monitorar a disseminação de *M. bovis* entre bovinos e destes para os seres humanos, de maneira que o objetivo deste estudo foi isolar e identificar *M. bovis* em bovinos com diagnóstico positivo pelo teste de tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Foram utilizados 32 bovinos positivos ao teste de tuberculinização, dos quais foram colhidas amostras de qualquer órgão com lesões sugestivas de tuberculose, e nos casos em que não foram observadas lesões sugestivas foram colhidas amostras de linfonodos parotídeo, sublingual, retrofaríngeo, mediastínico e mesentérico. Amostras de leite foram coletadas de 16 animais de sete propriedades. Foram realizados exames histopatológicos, cultivo micobacteriológico, coloração de Ziehl Neelsen e diagnóstico molecular. Vinte e um (65,6%) animais apresentaram lesões sugestivas de tuberculose. Macroscopicamente, foram observadas lesões granulomatosas nodulares, de aspecto caseoso e/ou calcificado, focal e disseminadas, de tamanho e forma variados. Microscopicamente, foi evidenciado processo inflamatório do tipo granulomatoso em diferentes estágios de evolução, com extenso granuloma caracterizado por área central de necrose de coagulação, material eosinofílico homogêneo, núcleos fragmentados, restos nucleares e focos de mineralização, circundado por infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos e células epitelioides encapsulado por abundante tecido conjuntivo fibroso associado a várias camadas de células mononucleares. Com relação à distribuição das lesões de acordo com a região corporal, 77,7% localizavam-se na cavidade torácica, 12,4% na cabeça e 9,9% na cavidade abdominal. De 55 amostras de tecido submetidas ao cultivo de micobactérias, em 31 (56,4%) foram isoladas micobactérias, sendo que em 13 (41,9%) foi identificado *M. bovis* e nas demais 18 (58,1%) foi identificado *Mycobacterium* spp. Foram isoladas micobactérias de cinco (31,25%) das 16 amostras de leite, sendo três amostras classificadas como *M. bovis*, e duas como *Mycobacterium* spp. Conclui-se que o isolamento e a identificação de *M. bovis* e *Mycobacterium* spp. em bovinos positivos na tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, sugere que os seres humanos estão expostos ao risco de infecção. Isso reforça a necessidade de intensificação e otimização de medidas de prevenção e controle previstas no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT), como o incentivo à certificação de propriedades rurais controladas e

livres para tuberculose e medidas de controle de trânsito e feiras de animais. Particular atenção deve ser dada à importância da inspeção sanitária de animais de abate na identificação de focos de tuberculose, bem como sugere-se a realização de estudos de isolamento e identificação de micobactérias em outros Estados do Nordeste.

**Palavras-chave:** Isolamento micobacteriano, identificação molecular, leite, *Mycobacterium bovis*, tuberculose.

## ABSTRACT

In areas where human and bovine tuberculosis coexist, the differentiation between *M. bovis* and *M. tuberculosis* is important for monitoring the spread of *M. bovis* among cattle and from cattle to humans, so that the objective of this study was to isolate and identify *M. bovis* from cattle with a positive diagnosis identified using tuberculin test in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. It were used 32 bovines positive at the tuberculin test, from which samples of any organ with tuberculosis suggestive lesions were collected, or samples of parotid, sublingual, retropharyngeal, mediastinal or mesenteric lymph nodes were collected when no gross lesions were observed. Milk samples were collected from 16 cows from seven herds. Histopathological exams, mycobacteriological culture, Ziehl Neelsen staining and molecular diagnosis were performed. Twenty-one (65.6%) animals presented tuberculosis suggestive lesions. Macroscopically, it were observed caseous and/or calcified nodular granulomatous lesions, focal and disseminated, of varying size and shape. Microscopically, it were evidenced inflammation of granulomatous type at different stages, with extensive granuloma characterized by central area of coagulation necrosis, homogeneous eosinophilic material, fragmented nuclei, nuclear debris and mineralization foci surrounded by inflammatory infiltrate predominantly macrophages and epithelioid cells encapsulated by abundant fibrous connective tissue associated with several layers of mononuclear cells. Related to distribution of lesions according to body region 77.7% were from thoracic cavity, 12.4% from head and 9.9% from abdominal cavity. Of 55 samples submitted to mycobacterial culture in 31 (56.4%) mycobacteria were isolated, being 13 (41.9%) identified as *M. bovis* and 18 (58.1%) as *Mycobacterium* spp. Mycobacteria were isolated from five (31.25%) of the 16 milk samples; three samples were classified as *M. bovis*, and two as belonging to the *Mycobacterium* genus. It is concluded that the isolation and identification of *M. bovis* and *Mycobacterium* spp. in bovines positive at tuberculin test in the State of Paraíba, Northeastern Brazil suggests that humans are exposed to the risk of infection. This reinforces the need for intensification and optimization of prevention and control measures foreseen in the Bovine Brucellosis and Tuberculosis National Control and Eradication Program (PNCEBT) as encouraging certification of tuberculosis-controlled and free rural properties and control of animal movement and fairs. Particular attention should be given to the importance of sanitary inspection of slaughtered animals in the

identification of tuberculosis foci, and it is suggested to carry out mycobacteria isolation and identification surveys in other Northeastern states.

**Key words:** Mycobacterial isolation, molecular identification, milk, *Mycobacterium bovis*, tuberculosis.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	12
REFERÊNCIAS .....	13
CAPÍTULO I.....	14
Isolamento e identificação de <i>Mycobacterium bovis</i> no leite de vacas no Nordeste do Brasil.....	14
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO II.....	22
Isolamento e identificação de <i>Mycobacterium bovis</i> em bovinos positivos no teste de tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil .....	22
INTRODUÇÃO .....	25
MATERIAL E MÉTODOS .....	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
CONCLUSÕES .....	30
REFERÊNCIAS.....	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	36
ANEXO I.....	37
ANEXO II .....	44
ANEXO III .....	49

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

### CAPÍTULO II

Quadro 1- Resultados da análise de cultivo e identificação de amostras realizadas por meio de TB Multiplex PCR com amplificação para complexo <i>M. tuberculosis</i> e primers RD-4 para identificação de <i>M. bovis</i> no Estado da Paraíba.....	34
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

Figura 1. (A) Linfonodo mediastino apresentando nódulos de aspecto caseoso. (B) Pulmão com nódulos de aspecto caseoso disseminados, de tamanho e formas variadas.....35

Figura 2. (A) Linfonodo mediastínico com área central de necrose, com material eosinofílico homogêneo, núcleos fragmentados, restos nucleares e focos de mineralização. Adjacente à área de necrose há inflamação granulomatosa constituída por macrófagos, células epitelioides e linfócitos abundantes. Observa-se também proliferação discreta de tecido conjuntivo fibroso. Obj. 10X, HE. Escala de barra = 100µm; (B) Pulmão com extenso granuloma caracterizado por área central de necrose de coagulação, circundado por infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos e células epitelioides encasulado por abundante tecido conjuntivo fibroso associado a várias camadas de células mononucleares. Obj. 5X, HE. Escala de barra = 200µm.....35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
AFB	Acid Fast Bacilli
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
Bp	Pares de bases
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	DesoxinucleotídeoTrifosfato
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HPC	1 - hexadecilpiridínio Cloreto
KCl	Cloreto de Potássio
<i>M. avium</i>	<i>Micobacterium avium</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Micobacterium bovis</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>Micobacterium intracellulare</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Micobacterium Tuberculosis</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milímetros
NTM	Micobactérias não tuberculosas
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pmol	Picomoles
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
Rpm	Rotação por minuto
S	Sul
W	Oeste

## INTRODUÇÃO GERAL

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium bovis*, que pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A doença é responsável por perdas econômicas relacionadas à reduzida eficiência reprodutiva, diminuição da produção de leite e menor ganho de peso, condenação de carcaças, e restrições ao comércio internacional de animais e produtos de origem animal (BRASIL, 2006).

O diagnóstico presuntivo pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Os diretos envolvem detecção e identificação do agente etiológico em material biológico, sendo que a combinação do isolamento em meio de cultura e a identificação e genotipagem molecular tem contribuído para melhor compreensão da epidemiologia das infecções por *M. bovis*, o que proporciona aumento na eficiência dos programas de controle (CAZOLA et al., 2015).

Enquanto a maioria dos casos de tuberculose em humanos é causada por *M. tuberculosis*, estima-se que cerca de 3,1% dos casos de tuberculose humana no mundo são causados por *M. bovis* (EL SAYED et al., 2015). A distinção dos vários membros do complexo *M. tuberculosis* é essencial para a investigação epidemiológica de casos bovinos (OCEPEK et al., 2005), de maneira que a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é importante para a identificação da possível fonte de infecção e das vias de transmissão da doença, que são fundamentais para melhor controle e erradicação (ZANINI et al. 2001, RODRIGUEZ et al., 2004).

A presente Dissertação é composta por dois capítulos. No primeiro capítulo é apresentado um artigo submetido ao periódico Ciência Rural acerca do isolamento e identificação de micobactérias em leite de bovinos positivos no teste de tuberculinização, e o segundo capítulo contempla outro artigo científico submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira, cujo objetivo foi o isolamento e identificação de micobactérias a partir de tecidos de bovinos positivos no teste de tuberculinização no Estado da Paraíba.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) - Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006.188p.

CAZOLA, D.O.; JORGE, K.S.G.; ZUMÁRRAGA, M.J.; SOUZA-FILHO, A.F.; FLÁBIO R. ARAÚJO, F.R.; ANA LUIZA A.R. OSÓRIO, A.R.O. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* v.35, n.2, p.141-147, 2015.

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

OCEPEK, M.; PATE, M.; ZOLNIR-DOVC, M.; POLJAK, M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J. Clin. Microbiol.* v.43, n.7, p.3555–3557, 2005.

RODRIGUEZ, C.A.R.; ZUMÁRRAGA, M.J.; OLIVEIRA, E.M.D.; CATALDI, A.A., ROMANO, M.I.; OTTO, H.H.; BONAFÉ, V.L.; FERREIRA NETO, J.S. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de spoligotyping. *Arq. Inst. Biol.* v.71, n.3, p.277-282, 2004.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C. FIORAVANTI, R.I.; R OXO, E.; ZUMÁRRAGA, M.;ROMANO, M.I.; CATALDI, A.; SALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by *Spolygotyping* and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Mem. Inst. OswaldoCruz*, v.96, p.809-813, 2001.

## **CAPÍTULO I**

### **Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* no leite de vacas no Nordeste do Brasil**

(Artigo científico submetido ao periódico Ciência Rural)

**Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* no leite de vacas no Nordeste do Brasil**

**Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* in milk from cows in Northeastern Brazil**

Joelson Marcolino Ramos<sup>I</sup> Marcos Bryan Heinemann<sup>II</sup> José Soares Ferreira Neto<sup>II</sup> Antônio Francisco de Souza Filho<sup>II</sup> Nicolás Céspedes Cárdenas<sup>II</sup> Clebert José Alves<sup>I</sup> Sérgio Santos de Azevedo<sup>I\*</sup>

**RESUMO**

Amostras de leite de 16 vacas positivas no teste de tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, foram utilizadas para o isolamento e identificação de micobactérias. Foram isoladas micobactérias em cinco (31,25%) amostras de leite; três amostras foram classificadas como *M. bovis*, e duas como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de isolamento e identificação de *M. bovis* no leite de vacas no Nordeste do Brasil, o que sugere que os seres humanos estão expostos ao risco de contaminação por ingestão.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium bovis*; isolamento; leite

**ABSTRACT**

Milk samples from 16 cows that tested positive on the tuberculin test in the State of Paraíba, Northeastern Brazil, were used for mycobacteria isolation and identification. Mycobacteria were isolated from five (31.25%) of the 16 milk samples; three samples were classified as *M. bovis*, and two as belonging to the *Mycobacterium* genus. To our knowledge, this is the first study of isolation and identification of *M. bovis* in milk from cows in Northeastern Brazil, which suggests that humans are at risk of contamination by ingestion.

**Key words:** *Mycobacterium bovis*; isolation; milk

---

<sup>I</sup>Laboratório de Doenças Transmissíveis, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brasil. E-mail:sergio@vps.fmvz.usp.br.  
\* Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium bovis*, que pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A doença é responsável por perdas econômicas relacionadas à redução da eficiência reprodutiva, queda na produção de leite e no ganho de peso, condenação de carcaças e restrições ao comércio internacional de animais e produtos de origem animal (BRASIL, 2006).

Enquanto a maioria dos casos de tuberculose em humanos é causada por *M. tuberculosis*, estima-se que cerca de 3,1% dos casos de tuberculose humana no mundo são causados por *M. bovis* (EL SAYED et al., 2015). No entanto, a infecção em seres humanos geralmente não é confirmada por isolamento e identificação do agente, o que torna impossível identificar a possível fonte de infecção. Além disso, as doenças humanas causadas por *M. tuberculosis* e *M. bovis* são indistinguíveis usando métodos clínicos, radiológicos e patológicos (ROCHA et al., 2011). A transmissão de *M. bovis* para os seres humanos ocorre através do consumo de leite cru e produtos lácteos, consumo de carne de animais infectados ou através do contato com secreções de abscessos fistulados.

No Estado da Paraíba, dados oficiais indicam a ocorrência de 1.015 casos de tuberculose humana em 2014 (BRASIL, 2015). Em áreas onde a tuberculose humana e bovina coexistem, a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é importante para monitorar a disseminação de *M. bovis* nos rebanhos e de bovinos para os seres humanos. Assim, o objetivo deste estudo foi isolar e identificar *M. bovis* no leite de vacas com diagnóstico positivo identificado por meio do teste da tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

Foram utilizadas amostras de leite de 16 vacas que apresentaram resultado positivo no teste de tuberculinização de sete propriedades diferentes, localizadas nos municípios de Cacimba de Areia, Patos, Piancó e São Mamede. As propriedades foram denominadas: A (Coordenadas: 07°13'28,9"S 37°56'21,7"W), B (07°08'41,7"S 37°07'16,7"W), C (06°56'41,7"S 37°10'22,6"W), D (06°58'37,3"S 37°16'38,7"W), E (06°57'53,5"S 37°20'32,2"W), F (06°58'36,0"S 37°17'21,9"W) e G (07°00'24,3"S 37°16'15,6"W). O leite foi coletado diretamente das tetas dos animais antes da ordenha, seguindo todos os métodos de antissepsia. Uma média de 15 ml de leite por animal foi recolhido, utilizando frascos estéreis e previamente identificados. Estes foram enviados para o laboratório em caixas isotérmicas com gelo.

Para o isolamento de *Mycobacterium* spp. utilizou-se uma alíquota de 5 ml de leite, centrifugou-se a 3000 rpm durante 20 minutos. Deste modo, foram obtidas duas fases de leite, gordura e sedimentos, que foram acondicionadas em frascos diferentes e descontaminadas

pelo método de Petroff (KANTOR, 1979), inoculadas em duplicata nos meios de Stonebrink-Leslie e Lowenstein-Jensen, e incubadas posteriormente a 37 °C durante 90 dias. Colônias sugestivas de micobactérias foram coradas pelo método de Ziehl Neelsen; As amostras identificadas como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR) foram submetidos à identificação molecular. O DNA foi extraído usando termólise (MAZARS et al., 2001).

A identificação de micobactérias e diferenciação do complexo *M. tuberculosis*, complexo *M. avium*, complexo *M. intracellulare* e *Mycobacterium* spp. foram feitas usando o TB Multiplex PCR (WILTON & COUSINS, 1992). Para isso, os primers utilizados foram: MYCGEN-F (G1) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e MYCGEN-R (G2) (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3') – relacionados ao gênero; TB-1F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') e TB-1R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3') - relacionados ao complexo *M. tuberculosis*; MYCAV-R (5'-ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3') - relacionado com o complexo *M. avium*; e MYCINT-F (5'-CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3') - relacionado ao complexo *M. intracellulare*. Foram utilizadas como controles positivos as estirpes AN5 para *M. bovis* e H37Rv para *M. tuberculosis*. Reações com 50µL foram realizadas contendo o tampão de reação dNTP (1,25mM cada), 20pmol de cada oligonucleótido, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10pmol/µL de primers, 1,25 unidades de Taq polimerase (1,0µL ) e 5µL do DNA em estudo. Os ciclos de amplificação utilizados foram: uma vez a 94°C durante 10 minutos, a 61°C durante 2 minutos, e 72°C durante 3 minutos; 33 vezes a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 2 minutos, e 72°C durante 3 minutos; uma vez a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 2 minutos, e 72°C durante 10 minutos. Amostras com amplificação de 1030pb foram identificadas como pertencendo ao gênero *Mycobacterium*, e amostras com fragmentos de 372pb foram consideradas membros do complexo *M. tuberculosis* (WILTON & COUSINS, 1992).

Todas as amostras de DNA com amplificação consistente para *M. tuberculosis* utilizando o TB Multiplex PCR foram amplificadas com os iniciadores RD4 (RD4-1 5'-ATG TGCGAGCTGAGCGATG-3'; RD4-2 5'-TGTACTATGCTGACCCATGCG-3'; e RD4-3 5'-AAAGGAGCACCATCGTCCAC-3') para identificação de *M. bovis* (WARREN et al., 2006). Reações com 25µL foram realizadas contendo o tampão de reação de dNTP (1,25 mM cada), 20pmol de cada oligonucleótido, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, primers, 1,25 unidades de Taq polimerase, e 5µL do DNA genômico estudado. Os controles positivos utilizados foram a estirpe AN5 para *M. bovis* e H37Rv para *M. tuberculosis*. Os ciclos de PCR utilizados foram: uma vez a 95°C durante 15 minutos, 45

vezes a 94°C durante 1 minuto, 62°C durante 1 minuto, e 72°C durante 1 minuto, e uma vez a 72°C durante 10 minutos. Amostras com produtos amplificados de 268pb foram identificadas como *M. bovis*, e de 172pb como outras micobactérias do complexo *M. tuberculosis*.

Foram isoladas micobactérias em cinco (31,25%) das 16 amostras de leite; três amostras foram classificadas como *M. bovis*, e duas como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de isolamento e identificação de *M. bovis* no leite de vacas no Nordeste do Brasil. Vários estudos foram realizados em outros Estados a fim de isolar e identificar micobactérias no leite das vacas. Em São Paulo, PARDO et al. (2001) isolaram *M. bovis* em uma amostra de leite cru; LEITE et al. (2003), utilizando amostras de leite dos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Pará, isolaram *M. bovis* em uma amostra de leite cru. FRANCO et al. (2013), na região sudeste de São Paulo, isolaram *M. bovis* a partir de uma amostra de leite de tanque de resfriamento individual.

O leite e os seus derivados, quando contaminados e não pasteurizados, apresentam risco significativo de transmissão da tuberculose para os seres humanos. Estima-se que cerca de 50% ou mais do leite produzido no Brasil não é pasteurizado (LEITE et al., 2003), atribuindo sérios riscos de transmissão de várias doenças para os seres humanos, incluindo a tuberculose causada por *M. bovis*. Vale destacar que é comum no Nordeste do Brasil o consumo de leite cru.

Um aspecto importante foi o isolamento e identificação de *Mycobacterium* spp. em duas amostras, provavelmente micobactérias não tuberculosas ambientais (NTM), que estão presentes no meio ambiente e podem ser transmitidas aos animais e seres humanos (FRANCO et al., 2013) através de inalação ou ingestão, resultando na colonização permanente ou temporária do trato respiratório e digestivo (PRIMM et al., 2004). O número crescente de indivíduos infectados com HIV predispõe ao aumento no número de casos de doenças emergentes e reemergentes, especialmente as causadas por agentes oportunistas, tais como *Mycobacterium* spp. Neste contexto, o leite não pasteurizado contaminado com micobactérias representa sério risco para indivíduos com HIV (FRANCO et al., 2013).

A presença de *M. bovis* e *Mycobacterium* spp. no leite de vacas no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil sugere que os seres humanos estão em risco de contaminação por ingestão. Isso reforça a necessidade de implementar medidas preventivas para evitar a contaminação do leite com NTM e *M. bovis* durante e após a ordenha, otimização dos programas de leite e de produtos lácteos de qualidade, melhorar inspeções sanitárias desses produtos, e realizar estudos para isolar e identificar micobactérias no leite de outros Estados do Nordeste.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (processo no. 302131/2012-4).

## COMITÊ DE ÉTICA

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Universidade Federal de Campina Grande – UFCG) (protocolo 25-2012).

## REFERÊNCIAS

BRASIL – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006. 188p.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan**, 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/setembro/24/Casos-novos-tuberculose-1990-2014-base-jun-2015.pdf>.

EL-SAYED, A. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in humans and cattle. **Zoonoses and Public Health**, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/zph.12242/abstract;jsessionid=0BD56CCA865867B220F15F41ACCAA9AE.f02t01>> doi: 10.1111/zph.12242>. Acesso em: 20 mar. 2016. doi: 10.1111/zph.12242.

FRANCO, M.M.J. et al. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p.746-6148, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3650655/>>. Acesso em: 20 jan. 2016. doi: 10.1186/1746-6148-9-85.

KANTOR, I.N. **Bacteriología de latuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis, Organización Panamericana de la Salud, 1979. 63p.

LEITE, C.Q.F. et al. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens

and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p.319-323, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762003000300005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000300005)>. Acesso em: 20 jan. 2016. doi: 10.1590/S0074-02762003000300005.

MAZARS, E. et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p.1901-1906, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29354/>>. Acesso em: 20 jan. 2016. doi: 10.1073/pnas.98.4.1901.

PARDO, R.B. et al. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p.284-287, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-95962001000600007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962001000600007)>. Acesso em: 18 fev. 2016. doi: 10.1590/S1413-95962001000600007.

PRIMM, T. P. et al. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 98–106, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321467/>>. Acesso em 12 jan. 2016. doi: 10.1128/CMR.17.1.98–106.2004.

ROCHA, A. et al. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. **Tuberculosis (Edinburgh)**, v. 91, n. 1, p.14–21, 2011. Disponível em: <[http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792\(10\)00129-0/fulltext](http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792(10)00129-0/fulltext)>. Acesso em: 20 jan. 2016. doi: 10.1016/j.tube.2010.10.003.

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. Disponível em: <<http://docserv.ingentaconnect.com/deliver/connect/iuatld/10273719/v10n7/s19.pdf?expires=1461095505&id=86722049&titleid=3764&accname=Guest+User&checksum=69A041568F1DEA686ED74EF48B6DE8B5>>. Acesso em 02 fev.

WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. **PCR Methods and Applications**, v. 1,

n. 4, p.269-273, 1992. Disponível em:<<http://genome.cshlp.org/content/1/4/269.long>>. Acesso em 20 jan. 2016.

## **CAPÍTULO II**

### **Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste de tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil**

(Artigo científico submetido ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

**Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste de tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil<sup>1</sup>**

Joelson M. Ramos<sup>2</sup>, Marcos B. Heinemann<sup>3</sup>, José S. Ferreira Neto<sup>3</sup>, Antonio F. Souza Filho<sup>2</sup>,  
Nicolás C. Cárdenas<sup>3</sup>, Antônio F. M. Dantas<sup>2</sup>, Clebert J. Alves<sup>2</sup>, Sérgio S. Azevedo<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.** -Ramos J.M., Heinemann M.B., Ferreira Neto J.S., Souza Filho A.F., Cárdenas N.C., Dantas A.F.M., Alves C.J. and Azevedo S.S. 2016. **[Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* from bovines positive catthe tuberculin test in the State of Paraíba, Northeastern Brazil]** Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste de tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):000-000. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária s/n, Caixa Postal 61, Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. E-mail: [sergio@vps.fmvz.usp.br](mailto:sergio@vps.fmvz.usp.br)

In areas where human and bovine tuberculosis coexist, the differentiation between *M. bovis* and *M. tuberculosis* is important for monitoring the spread of *M. bovis* among cattle and from cattle to humans, so that the objective of this study was to isolate and identify *M. bovis* from cattle with a positive diagnosis identified using tuberculin test in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. It were used 32 bovines positive at the tuberculin test, from which samples of any organ with tuberculosis suggestive lesions were collected, or samples of parotid, sublingual, retropharyngeal, mediastinal or mesenteric lymph nodes were collected when no gross lesions were observed. Samples were submitted to histopathological exam, mycobacteriological culture, Ziehl Neelsen staining and molecular diagnosis. Twenty-one (65.6%) animals presented tuberculosis suggestive lesions. Macroscopically, it were observed caseous and/or calcified nodular granulomatous lesions, focal and disseminated, of varying size and shape. Microscopically, it were evidenced inflammation of granulomatous type at different stages, with extensive granuloma characterized by central area of coagulation necrosis, homogeneous eosinophilic material, fragmented nuclei, nuclear debris and mineralization foci surrounded by inflammatory infiltrate predominantly macrophages and epithelioid cells encapsulated by abundant fibrous connective tissue associated with several layers

<sup>1</sup>Recebido em.....

Aceito para publicação em XXXXX

<sup>2</sup> Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Caixa Postal 61, Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil. \*Autor para correspondência: [sergio@vps.fmvz.usp.br](mailto:sergio@vps.fmvz.usp.br)

<sup>3</sup>Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Butantã, São Paulo, SP 05508-270, Brasil.

of mononuclear cells. Related to distribution of lesions according to body region 77.7% were from thoracic cavity, 12.4% from head and 9.9% from abdominal cavity. Of 55 samples submitted to mycobacterial culture in 31 (56.4%) mycobacteria were isolated, being 13 (41.9%) identified as *M. bovis* and 18 (58.1%) as *Mycobacterium* spp. It is concluded that the isolation and identification of *M. bovis* and *Mycobacterium* spp. in bovines positive at tuberculin test in the State of Paraíba, Northeastern Brazil suggests that humans are exposed to the risk of infection. This reinforces the need for intensification and optimization of prevention and control measures foreseen in the Bovine Brucellosis and Tuberculosis National Control and Eradication Program (PNCEBT) as encouraging certification of tuberculosis-controlled and free rural properties and control of animal movement and fairs. Particular attention should be given to the importance of sanitary inspection of slaughtered animals in the identification of tuberculosis foci, and it is suggested to carry out mycobacteria isolation and identification surveys in other Northeastern states.

INDEX TERMS: Mycobacteria, bovine, immunodiagnosis, isolation and molecular identification, Northeastern Brazil.

**RESUMO.** – Em áreas onde a tuberculose humana e a tuberculose bovina coexistem, a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é importante para monitorar a disseminação de *M. bovis* entre bovinos e destes para os seres humanos, de maneira que o objetivo deste estudo foi isolar e identificar *M. bovis* em bovinos com diagnóstico positivo pelo teste de tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Foram utilizados 32 bovinos positivos ao teste de tuberculinização, dos quais foram colhidas amostras de qualquer órgão com lesões sugestivas de tuberculose, e nos casos em que não foram observadas lesões sugestivas foram colhidas amostras de linfonodos parotídeo, sublingual, retrofaríngeo, mediastínico e mesentérico. As amostras foram submetidas a exame histopatológico, cultivo micobacteriológico, coloração de Ziehl Neelsen e diagnóstico molecular. Vinte e um (65,6%) animais apresentaram lesões sugestivas de tuberculose. Macroscopicamente, foram observadas lesões granulomatosas nodulares, de aspecto caseoso e/ou calcificado, focal e disseminadas, de tamanho e forma variados. Microscopicamente, foi evidenciado processo inflamatório do tipo granulomatoso em diferentes estágios de evolução, com extenso granuloma caracterizado por área central de necrose de coagulação, material eosinofílico homogêneo, núcleos fragmentados, restos nucleares e focos de mineralização, circundado por infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos e células epitelioides encapsulado por abundante tecido conjuntivo fibroso associado a várias camadas de células mononucleares. Com relação à distribuição das lesões de acordo com a região corporal, 77,7% localizavam-se na

cavidade torácica, 12,4% na cabeça e 9,9% na cavidade abdominal. De 55 amostras submetidas ao cultivo de micobactérias, em 31 (56,4%) foram isoladas micobactérias, sendo que em 13 (41,9%) foi identificado *M. bovis* e nas demais 18 (58,1%) foi identificado *Mycobacterium* spp. Conclui-se que o isolamento e a identificação de *M. bovis* e *Mycobacterium* spp. em bovinos positivos na tuberculização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, sugere que os seres humanos estão expostos ao risco de infecção. Isso reforça a necessidade de intensificação e otimização de medidas de prevenção e controle previstas no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT), como o incentivo à certificação de propriedades rurais controladas e livres para tuberculose e medidas de controle de trânsito e feiras de animais. Particular atenção deve ser dada à importância da inspeção sanitária de animais de abate na identificação de focos de tuberculose, bem como sugere-se a realização de estudos de isolamento e identificação de micobactérias em outros Estados do Nordeste.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Micobactérias, bovino, imunodiagnóstico, isolamento e identificação molecular, Nordeste do Brasil.

## INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium bovis*, que pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Brasil 2006). O diagnóstico pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Os diretos envolvem detecção e identificação do agente etiológico em material biológico, sendo que a combinação do isolamento em meio de cultura e a identificação e genotipagem molecular tem contribuído para melhor compreensão da epidemiologia das infecções por *M. bovis*, o que proporciona aumento na eficiência dos programas de controle (Cazola et al. 2015).

Enquanto a maioria dos casos de tuberculose em humanos são causados por *M. tuberculosis*, estima-se que cerca de 3,1% dos casos de tuberculose humana no mundo são causados por *M. bovis* (El Sayed et al. 2015). No entanto, a infecção em seres humanos geralmente não é confirmada por isolamento e identificação do agente, o que torna impossível identificar a possível fonte de infecção. Além disso, as doenças humanas causadas por *M. tuberculosis* e *M. bovis* são indistinguíveis usando métodos clínicos, radiológicos e patológicos (Rocha et al. 2011). A distinção dos vários membros do complexo *M. tuberculosis* é essencial para a investigação epidemiológica de casos bovinos (Ocepek et al. 2005), de maneira que a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é importante para a identificação da possível fonte de infecção e das vias de transmissão da doença, que são fundamentais para um melhor controle e erradicação da doença (Zanini et al. 2001, Rodriguez et al. 2004). A transmissão de *M. bovis* para seres humanos ocorre através do consumo

de leite cru e produtos lácteos, consumo de carne de bovinos infectados ou do contato com secreções de abscessos fistulados e aerossóis.

No Estado da Paraíba, dados oficiais indicam a ocorrência de 1.015 casos de tuberculose humana em 2014 (Brasil 2015). Em áreas onde a tuberculose humana e a tuberculose bovina coexistem, a diferenciação entre *M. bovis* e *M. tuberculosis* é importante para monitorar a disseminação de *M. bovis* entre bovinos e destes para os seres humanos. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi isolar e identificar *M. bovis* em bovinos com diagnóstico positivo pelo teste de tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 32 bovinos de dois a 10 anos de idade, positivos ao teste de tuberculinização, procedentes de oito propriedades rurais com características de exploração pecuária mista, sem histórico de tuberculose, localizadas nos municípios de Cacimba de Areia, Patos e São Mamede, na mesorregião do Sertão do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. As propriedades foram denominadas A (Coordenadas: 07°08'41.7"S 37°07'16.7"O), B (07°08'39.1"S 37°06'42.6"O), C (06°56'41.7"S 37°10'22.6"O), D (06°58'37.3"S 37°16'38.7"O), E (06°58'36.0"S 37°17'21.9"O), F (07°00'24.3"S 37°16'15.6"O), G (07°01'46.5"S 37°16'26.4"O) e H (06°57'53.5"S 37°20'32.2"O). O sacrifício e necropsia dos animais seguiram as normas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com colaboração com o Serviço de Defesa Agropecuária do Estado da Paraíba.

Foram colhidas amostras de qualquer órgão com lesões sugestivas de tuberculose. Nos casos em que não foram observadas lesões sugestivas foram colhidas amostras de linfonodos parotídeo, sublingual, retrofaríngeo, mediastínico e mesentérico. Uma parte de cada amostra foi congelada para posterior utilização no isolamento e identificação de micobactérias; a outra parte foi fixada em formol a 10% para exame histopatológico.

As amostras fixadas em formol a 10% foram clivadas e processadas rotineiramente para confecção de lâminas histopatológicas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), seguindo-se a técnica de Behmer et al. (1976). Para isolamento de micobactérias, os fragmentos de tecidos foram submetidos à descontaminação pelo método de HPC (Ambrosio et al. 2008) com posterior inoculação em duplicata nos meios de Stonebrink-Leslie e Lowenstein-Jensen e incubação a 37 °C durante 90 dias. Colônias sugestivas de micobactérias foram extraídas para preparação de lâmina para coloração de Ziehl Neelsen e extração de DNA, por meio de termólise (Mazars et al. 2001). Foram submetidas à identificação molecular apenas amostras identificadas como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), na coloração de Ziehl Neelsen.

A identificação de micobactérias e diferenciação do complexo *M. tuberculosis*, complexo

*M. avium*, complexo *M. intracellulare* e *Mycobacterium* spp. foram feitas usando o TB Multiplex PCR (Wilton & Cousins 1992). Para isso, os primers utilizados foram: MYCGEN-F (G1) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e MYCGEN-R (G2) (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3') – relacionados ao gênero; TB-1F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') e TB-1R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3') - relacionados ao complexo *M. tuberculosis*; MYCAV-R (5'-ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3') - relacionado com o complexo *M. avium*; e MYCINT-F (5'-CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3') - relacionado ao complexo *M. intracellulare*. Foram utilizadas como controles positivos as estirpes AN5 para *M. bovis* e H37Rv para *M. tuberculosis*. Reações com 50µL foram realizadas contendo o tampão de reação dNTP (1,25mM cada), 20pmol de cada oligonucleótido, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10pmol/µL de primers, 1,25 unidades de Taq polimerase (1,0µL) e 5µL do DNA em estudo. Os ciclos de amplificação utilizados foram: uma vez a 94°C durante 10 minutos, a 61°C durante 2 minutos, e 72°C durante 3 minutos; 33 vezes a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 2 minutos, e 72°C durante 3 minutos; uma vez a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 2 minutos, e 72°C durante 10 minutos. Amostras com amplificação de 1030pb foram identificadas como pertencendo ao gênero *Mycobacterium*, e amostras com fragmentos de 372pb foram considerados membros do complexo *M. tuberculosis* (Wilton & Cousins 1992).

Todas as amostras de DNA com amplificação consistente para o complexo *M. tuberculosis* utilizando o TB Multiplex PCR, foram amplificadas com os iniciadores RD4 (RD4-1 5'-ATG TGC GAGCTGAGCGATG-3'; RD4-2 5'-TGTACTATGCTGACCCATGCG-3'; e RD4-3 5'-AAAGGA GCACCATCGTCCAC-3') para identificação de *M. bovis* (Warren et al. 2006). Reações com 25µL foram realizadas contendo o tampão de reação de dNTP (1,25 mM cada), 20pmol de cada oligonucleótido, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, primers, 1,25 unidades de Taq polimerase, e 5µL do DNA genômico estudado. Os controles positivos utilizados foram a estirpe AN5 para *M. bovis* e H37Rv para *M. tuberculosis*. Os ciclos de PCR utilizados foram: uma vez a 95°C durante 15 minutos, 45 vezes a 94°C durante 1 minuto, 62°C durante 1 minuto, e 72°C durante 1 minuto, e uma vez a 72°C durante 10 minutos. Amostras com produtos amplificados de 268pb foram identificadas como *M. bovis*, e de 172pb como outras micobactérias do complexo *M. tuberculosis*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 32 bovinos utilizados no estudo, apenas dois (6,3%) apresentaram linfonodos submandibulares edemaciados, sinais clínicos sugestivos de tuberculose. A infecção de bovinos por *M. bovis* é de evolução lenta e os sinais clínicos são pouco frequentes. Em estágios avançados, e dependendo da localização das lesões, os bovinos podem apresentar caquexia progressiva, hiperplasia de

linfonodos superficiais e/ou profundos, dispneia, tosse, mastite e infertilidade, entre outros (Heinemann et al. 2008). Portanto, para uma vigilância *ante mortem* eficaz para tuberculose bovina deve assentar-se principalmente na detecção de animais infectadas em fase inicial através da utilização de testes de imunodiagnóstico sensíveis (Rua-Domenech et al. 2006). Por outro lado, na necropsia, 21 (65,6%) animais apresentaram lesões sugestivas de tuberculose. De fato, o reconhecimento das lesões macroscópicas associadas à tuberculose, principalmente durante a inspeção sanitária de rotina nos abatedouros, é uma importante ferramenta no diagnóstico da infecção, contribui para a identificação de focos nos rebanhos (Cazola et al. 2015) ademais, é uma das estratégias de ação do PNCEBT em colaboração com o serviço de inspeção sanitária oficial, o que é fundamental para a garantia da oferta de produtos de baixo risco para a saúde pública e, conseqüentemente, proteção do consumidor (Biffa et al. 2010, Cazola et al. 2015). Em países como EUA, Reino Unido e Espanha, que possuem satisfatório desempenho nos seus serviços de inspeção nos abatedouros e programa de erradicação de tuberculose consolidado, a prevalência da doença foi reduzida (Rua-Domenech 2006, Kantor & Ritacco 2006).

Macroscopicamente, foram observadas lesões granulomatosas nodulares, de aspecto caseoso e/ou calcificado, focal e disseminadas, de tamanho e formas variados (Fig. 1A e 1B). Microscopicamente, foi evidenciado processo inflamatório do tipo granulomatoso em diferentes estágios de evolução, com extenso granuloma caracterizado por área central de necrose de coagulação, material eosinofílico homogêneo, núcleos fragmentados, restos nucleares e focos de mineralização, circundado por infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos e células epitelioides encasulado por abundante tecido conjuntivo fibroso associado a várias camadas de células mononucleares (Fig. 2A e 2B). Achados similares foram observados por Mendes et al. (2013), que utilizaram bovinos abatidos em estabelecimento com Serviço de Inspeção Federal (SIF) no Estado de Santa Catarina e verificaram lesões microscópicas caracterizadas por necrose de caseificação central composta por material eosinofílico homogêneo, debris celulares e quantidade variável de mineralização circundado por grande quantidade de macrófagos e células gigantes multinucleadas de Langhans, neutrófilos em alguns casos e tecido conjuntivo. Da mesma forma, França et al. (2013) utilizaram bovinos abatidos na Bahia e descreveram lesões tuberculosas com estrutura discretamente diferente do tecido adjacente e nódulos com massa amorfa repleta de material caseoso encapsulado, por vezes sendo observadas áreas multifocais coalescentes.

No total, foram colhidas 121 amostras com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, distribuídas da seguinte forma: 80 (66,1%) amostras de linfonodos (41 mediastínicos, nove mesentéricos, sete submandibulares, 13 traqueobrônquicos, oito retrofaríngeos, e dois mamários), 37 (30,6%) de pulmão, uma (0,83%) de fígado e três (2,5%) de lesão miliar em musculo. Com relação à distribuição das lesões de acordo com a região corporal, 94 (77,7%) lesões foram da

cavidade torácica, 15 (12,4%) da cabeça e 12 (9,9%) da cavidade abdominal. Proaño-Pérez et al. (2011) avaliaram a distribuição de lesões em órgãos a partir de bovinos abatidos no Equador, como um indicativo da possível via de transmissão, e verificaram lesões macroscópicas em linfonodos mediastínicos (51,3%), linfonodos traqueobrônquicos (23,7%), linfonodos retrofaríngeos (9,2%), fígado (11,8%) e em outros sítios (3,9%). Na Etiópia, 84% das lesões visíveis foram encontradas nos pulmões e nódulos linfáticos torácicos (Teklul et al. 2004); já Biffa et al. (2012) avaliaram 337 carcaças com lesões sugestivas de tuberculose e observaram que as lesões mais frequentes estavam nos pulmões e linfonodos respiratórios (50,9%), seguidos por linfonodos mesentéricos e intestinais (16,5%). No Brasil, Alzamora Filho et al. (2014) constataram a ocorrência de lesões sugestivas de tuberculose no parênquima pulmonar e nos linfonodos da cabeça e mediastínicos em 75% (135/180) dos achados na inspeção sanitária. Cazola et al. (2015) verificaram que dos 13 bovinos positivos na tuberculinização, sete (53,8%) apresentaram pelo menos uma lesão sugestiva de tuberculose em linfonodos retrofaríngeos, parotídeos e pulmonares ou no pulmão, e em seis (46,2%) não foram encontradas lesões sugestivas da doença. Esses resultados corroboram os achados do presente estudo e reforçam a importância da via respiratória na transmissão de micobactérias. A menor frequência de lesões sugestivas na cavidade abdominal pode ser atribuída ao fato da via oral ser uma porta de entrada secundária à respiratória, justificando maior frequência de lesões nos linfonodos da cavidade torácica (Palmer & Walters 2006, Taylor et al. 2007).

Para isolamento e identificação de micobactérias foram utilizadas 55 amostras, sendo destas 31 (56,4%) com lesões sugestivas de tuberculose e 24 (43,6%) sem lesões macroscópicas. No total, foram isoladas micobactérias em 31 (56,4%) amostras, sendo que em 13 (41,9%) foi identificado *M. bovis* e nas demais 18 (58,1%) foi identificado *Mycobacterium* spp. (Quadro 1). Do ponto de vista epidemiológico é muito importante a identificação da espécie de micobactéria e da possível fonte de infecção para o ser humano, uma vez que a doença em humanos, causada por *M. tuberculosis* e *M. bovis*, é indistinguível usando métodos clínicos, radiológicos e patológicos (Rocha et al. 2011, Wedlock et al. 2002). No entanto, são escassas as informações acerca da prevalência da infecção por *M. bovis* em seres humanos, uma vez que na maioria dos casos não são procedidos o isolamento e a identificação do agente, o que torna impossível a identificação da fonte de infecção. Por outro lado, estima-se que cerca de 3,1% dos casos de tuberculose humana no mundo são causados por *M. bovis* (El Sayed et al. 2015). Dessa maneira, a combinação do isolamento micobacteriano a partir de tecidos bovinos e a identificação molecular contribui para melhor compreensão da epidemiologia das infecções por *M. bovis*, o que contribui para o aumento da eficiência dos programas de controle da doença (Cazola et al. 2015).

Um importante aspecto no presente trabalho foi a identificação de *Mycobacterium* spp. em 18 (58,1%) amostras com isolamento positivo, sendo a maioria dos isolamentos a partir de

linfonodos mediastínicos (seis; 33,3%) e mesentéricos (quatro; 22,2%). Esses isolados provavelmente tratam-se de micobactérias não tuberculosas (MNT), que estão presentes no meio ambiente e podem ser transmitidas aos animais e seres humanos (Franco et al. 2013) através de inalação ou ingestão, resultando na colonização permanente ou temporária dos tratos respiratório e digestivo (Primm et al. 2004). Atualmente, o aumento no número de casos de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) predispõe à elevação do número de casos de doenças emergentes e reemergentes, especialmente aquelas causadas por agentes etiológicos oportunistas, como é o caso de *Mycobacterium* spp. Neste contexto, o contato direto com fontes de infecção e o consumo de carne, leite e produtos lácteos contaminados representam sério risco de transmissão do agente para indivíduos com HIV ou outras condições imunossupressoras.

### CONCLUSÕES

Conclui-se que o isolamento e a identificação de *M. bovis* e *Mycobacterium* spp. em bovinos positivos na tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, sugere que os seres humanos estão expostos ao risco de infecção. Isso reforça a necessidade de intensificação e otimização de medidas de prevenção e controle previstas no PNCEBT, como o incentivo à certificação de propriedades rurais controladas e livres para tuberculose e medidas de controle de trânsito e feiras de animais. Particular atenção deve ser dada à importância da inspeção sanitária de animais de abate na identificação de focos da doença, bem como sugere-se a realização de estudos de isolamento e identificação de micobactérias em outros Estados do Nordeste.

### REFERÊNCIAS

- Alzamora Filho F., Vasconcelos S.E.G., Gomes H.M., Cavalcante M.P., Suffy P.N. & Costa J.N. 2014. Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. *Pesq. Vet. Bras.* 34(2): 103-108.
- Ambrosio S.R., Oliveira E.M.D., Rodriguez C.A.R., Ferreira Neto J.S. & Amaku M. 2008. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Braz. J. Microbiol.* 39(2):241-244.
- Behmer O.A., Tolosa E.M.C. & Freitas Neto A.G. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Ed. Art. EDUSP, São Paulo. 259p.
- Biffa D., Bogale A., Godfroid J. & Skjerve E. 2012. Factors associated with severity of bovine tuberculosis in Ethiopian cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 44(5):991–998.
- Biffa D., Bogale A. & Skjerve E. 2010. Diagnostic efficiency of abattoir meat inspection service in Ethiopia to detect carcasses infected with *Mycobacterium bovis*: Implications for public health. *BMC Public Health.* 10(462):1-12.

- Brasil. 2015 - Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan. url: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/setembro/24/Casos-novos-tuberculose-1990-2014-base-jun-2015.pdf>
- Brasil 2006. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF.
- Cazola D.O., Jorge K.S.G., Zumárraga M.J., Souza-Filho A.F., Flábio R., Araújo F.R., Ana Luiza A.R., & Osório A.R.O. 2015. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 35(2):141-147.
- El-Sayed A., El-Shannat S., Kamel M., Castañeda-Vazquez M.A. & Castañeda-Vazquez H. 2015. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in humans and cattle. *Zoonoses Public Health.*63(4):251-264.
- França L.R., Cruz J.F., Neves V.B.F., & Cerqueira R.B. 2013. Prevalência e histopatologia de lesões sugestivas de tuberculose em carcaça de bovinos abatidos no Sudoeste da Bahia. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 14(4):721-733.
- Franco M.M.J., Paes A.C., Ribeiro M.G., Pantoja J.C.F., Santos A.C.B., Miyata M., Leite C.Q.F., Motta R.G. & Listoni F.J.P. 2013. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of São Paulo, Brazil. *BMC Vet. Res.* 9(85):1-8.
- Heinemann M.B., Mota P.M.P.C., Lobato F.C.F., Leite R.C. & Lage A.P. 2008. Tuberculose bovina: uma introdução à etiologia, cadeia epidemiológica, patogenia e sinais clínicos. *Cad. Téc. Vet. Zootec.* 59:1-12.
- Kantor I.N. & Ritacco V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet. Microbiol.* 112(2-4):111-118.
- Mazars E., Lesjean S., Banuls A., Gilbert M., Vicent V., Gicquel B., Tibayrenc M., Locht C. & Supply P. 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(4):1901-1906.
- Mendes R.E., Schneider A.F., Werlich D.E., Lucca N.J., Lorenzetti M.P. & Pilati C. 2013. Estudo anatomopatológico em tecidos condenados pelo serviço de inspeção federal (SIF) por suspeita de tuberculose. *Cienc. Anim. Bras.* 14(4):448-453.
- Ocepek M., Pate M., Zolnir-Dovc M. & Poljak M. 2005. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J. Clin. Microbiol.* 43(7):3555–3557.

- Palmer M.V. & Waters W.R. 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112(2-4):181-190.
- Primm T.P., Lucero C.A. & Falkinham J.O. 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1):98-106.
- Proaño-Pérez F., Benitez-Ortiz W., Desmecht D., Coral M., Ortiz J., Ron L., Portaels F., Rigouts L. & Linden A. 2011. Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. *Prev. Vet. Med.* 101(1-2):65-72.
- Rocha A., Elias A.R., Sobral L.F., Soares D.F., Santos A.C., Marsico A.G., Hacker M.A., Caldas P.C., Parente L.C., Silva M.R., Fonseca L., Suffys P. & Boéchat N. 2011. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. *Tuberculosis.* 91(1):14–21.
- Rodriguez C.A.R., Zumárraga M.J., Oliveira E.M.D., Cataldi A.A., Romano M.I., Otto H.H., Bonafé V.L. & Ferreira Neto J.S. 2004. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de spoligotyping. *Arq. Inst. Biol.* 71(3):277-282.
- Rua-Domenech R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 86(2):77-109.
- Rua-Domenech R., Goodchild A.T., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Christiansen K.H. & Clifton-Hadley R.S. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81(2):190–210.
- Taylor G.M., Worth D.R., Palmer S., Jahans K. & Hewinson G. 2007. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *Vet. Res.* 3(12): 1-11.
- Teklu A., Asseged B., Yimer E., Gebeyehu M. & Woldesenbet Z. 2004. Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. *Rev. Sci. Tech. OIE.* 23(3):957-964.
- Warren R.M., Gey Van Pittius N.C., Barnard M., Hesselting A., Engelke E., de Kock M., Gutierrez M.C., Chege G.K., Victor T.C., Hoal E.G. & Van Helden P.D. 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 10(7): 818–822.
- Wedlock D.N., Skinner M.A., Lisle G.W. & Buddle B.M. 2002. Review Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect.* 4(4):471–480.
- Wilton S. & Cousing D. 1992. Detection and Identification of Multiple Mycobacterial Pathogens

by DNA Amplification in a Single Tube. *Genome Res.* 1(4):269-273.

Zanini M.S., Moreira E.C., Lopes M.T.P., Oliveira R.S., Leão S.C., Fioravanti R.I., Roxo E., Zumárraga M., Romano M.I., Cataldi A. & Salas C.E. 2001. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by *Spolygotyping* and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96(6):809-813.

### Legenda das Figuras

Fig. 1. (A) Linfonodo mediastino apresentando nódulos de aspecto caseoso. (B) Pulmão com nódulos de aspecto caseoso disseminados, de tamanho e formas variadas.

Fig. 2. (A) Linfonodo mediastínico com área central de necrose, com material eosinofílico homogêneo, núcleos fragmentados, restos nucleares e focos de mineralização. Adjacente à área de necrose há inflamação granulomatosa constituída por macrófagos, células epitelioides e linfócitos abundantes. Observa-se também proliferação discreta de tecido conjuntivo fibroso. Obj. 10X, HE. Escala de barra = 100µm; (B) Pulmão com extenso granuloma caracterizado por área central de necrose de coagulação, circundado por infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos e células epitelioides encasulado por abundante tecido conjuntivo fibroso associado a várias camadas de células mononucleares. Obj. 5X, HE. Escala de barra = 200µm.

## O Quadro

**Quadro 1. Resultados da análise de cultivo e identificação de amostras realizadas por meio de TB Multiplex PCR com amplificação para complexo *M. tuberculosis* e primers RD-4 para identificação de *M. bovis* no Estado da Paraíba.**

Bovino	Município	Propriedade	Tecido	Cultivo	Identificação molecular
03	Cacimba de Areia	A	Linfonodo (L.) mesentérico	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp. <i>M. bovis</i>
04	Cacimba de Areia	A	L. mediastínico	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
06	Cacimba de Areia	B	L. submandibular	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
07	São Mamede	C	Pulmão	Positivo	<i>M. bovis</i>
08	São Mamede	C	L. mesentérico	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
09	São Mamede	C	Pulmão	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
11	Patos	D	Lesão no pescoço	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
12	Patos	D	Pulmão	Positivo	<i>M. bovis</i>
13	Patos	D	L. submandibular	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
14	Patos	D	L. mediastínico	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
15	Patos	D	Lesão no pescoço	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
16	Patos	D	L. traqueobrônquico	Positivo	<i>M. bovis</i>
17	Patos	D	L. mediastínico	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
18	Patos	E	Pulmão	Positivo	<i>M. bovis</i>
19	Patos	E	L. retrofaríngeo	Positivo	<i>M. bovis</i>
20	Patos	E	L. mediastínico	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
21	Patos	E	L. traqueobrônquico	Positivo	<i>M. bovis</i>
23	Patos	F	Pulmão	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
24	Patos	G	L. mamário	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
25	Patos	G	Lesão miliar (Torax)	Positivo	<i>M. bovis</i>
26	Patos	G	L. mediastínico	Positivo	<i>M. bovis</i>
28	Patos	H	L. traqueobrônquico	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
29	Patos	H	Pulmão	Positivo	<i>M. bovis</i>
31	Patos	H	Pulmão	Positivo	<i>M. bovis</i>
32	Patos	H	L. mediastínico	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp.
			L. mesentérico	Positivo	<i>Mycobacterium</i> spp. <i>M. bovis</i>

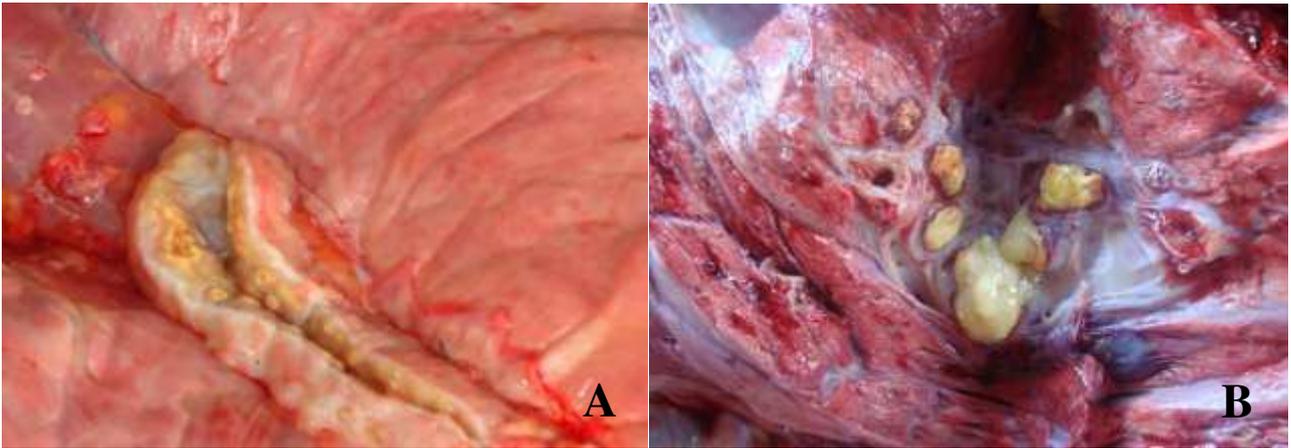


Fig. 1

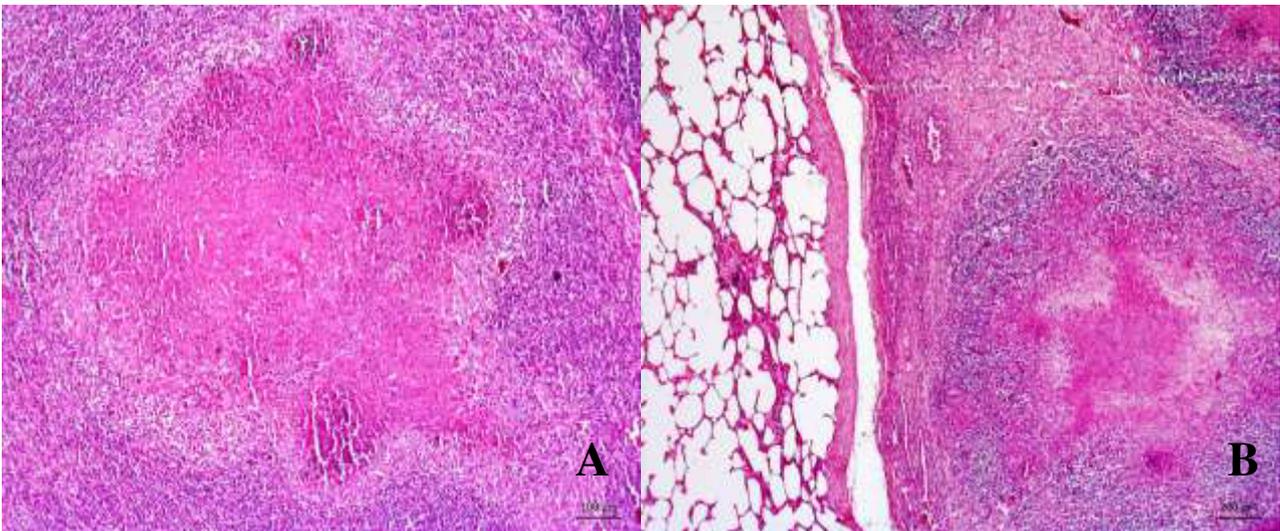


Fig. 2

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi constatado pela primeira vez o isolamento de micobactérias no leite, com destaque para *M. bovis*, o que sugere que a população está exposta ao risco de infecção pela ingestão deste produto de origem animal e reforça a necessidade de intensificação do controle da tuberculose no rebanho bovino do Nordeste do Brasil, onde é comum o consumo de leite cru.

Da mesma forma, o isolamento e a identificação de *M. bovis* em tecidos de bovinos positivos na tuberculinização no Estado da Paraíba sugere a importância de intensificação e otimização de medidas de prevenção e controle previstas no PNCEBT, como o incentivo à certificação de propriedades rurais controladas e livres para tuberculose e medidas de controle de trânsito, feiras de animais e medidas compulsórias de saneamento de focos de tuberculose bovina. Deve ser intensificada a inspeção sanitária de animais de abate na identificação de focos da doença, bem como sugere-se a realização de estudos de isolamento e identificação de micobactérias em outros estados do Nordeste do Brasil.

## ANEXO I

### Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* in milk from cows in Northeastern Brazil

### Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* em leite de vacas no Nordeste do Brasil

Joelson Marcolino Ramos<sup>I</sup> Marcos Bryan Heinemann<sup>II</sup> José Soares Ferreira Neto<sup>II</sup> Antônio Francisco de Souza Filho<sup>II</sup> Nicolás Céspedes Cárdenas<sup>II</sup> Clebert José Alves<sup>I</sup> Sérgio Santos de Azevedo<sup>I\*</sup>

#### ABSTRACT:

Milk samples from 16 cows that tested positive on the tuberculin test in the State of Paraíba, Northeastern Brazil, were used for mycobacteria isolation and identification. Mycobacteria were isolated from five (31.25%) of the 16 milk samples; three samples were classified as *M. bovis*, and two as belonging to the *Mycobacterium* genus. To our knowledge, this is the first study of isolation and identification of *M. bovis* in milk from cows in Northeastern Brazil, which suggests that humans are at risk of contamination by ingestion.

**Key words:** *Mycobacterium bovis*; isolation; milk.

#### RESUMO:

Amostras de leite de 16 vacas positivas no teste da tuberculinização no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, foram utilizadas para isolamento e identificação de micobactérias. Foram isoladas micobactérias em cinco (31,25%) das 16 amostras de leite; três amostras foram classificadas como *M. bovis*, e duas como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*. De acordo com nosso conhecimento este é o primeiro estudo de isolamento e identificação de *M. bovis* em leite de vacas no Nordeste do Brasil, o que sugere que os seres humanos estão em risco de contaminação por ingestão.

---

<sup>I</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brasil. E-mail: Sergio@vps.fmvz.usp.br. \* Corresponding author.

<sup>II</sup> Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium bovis*; isolamento; leite.

Bovine tuberculosis is a chronic, zoonotic disease caused by *Mycobacterium bovis*, which belongs to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The disease is responsible for economic losses due to reduced reproductive efficiency, decreased milk production and decreased weight gain, carcass condemnation, and restrictions on international trade of animals and animal products (BRASIL, 2006).

While most cases of tuberculosis in humans are caused by *M. tuberculosis*, it is estimated that about 3.1% of the cases of human tuberculosis in the world are caused by *M. bovis* (EL SAYED et al., 2015). However, infection in humans is generally not confirmed by isolation and identification of the agent, making it impossible to identify the possible source of infection. In addition, the human diseases caused by *M. tuberculosis* and *M. bovis* are indistinguishable using clinical, radiological and pathological methods (ROCHA et al., 2011). Transmission of *M. bovis* to humans occurs through consumption of raw milk and dairy products, consumption of meat from infected animals, or through contact with secretions from fistulated abscesses.

In the state of Paraíba, official data indicate the occurrence of 1,015 cases of human tuberculosis in 2014 (BRASIL, 2015). In areas where human and bovine tuberculosis coexist, the differentiation between *M. bovis* and *M. tuberculosis* is important for monitoring the spread of *M. bovis* among cattle and from cattle to humans. Thus, the objective of this study was to isolate and identify *M. bovis* in milk from cows with a positive diagnosis identified using tuberculin test in the state of Paraíba, Northeastern Brazil.

Milk samples from 16 cows that tested positive on the tuberculin test from seven different properties located in the municipalities of Cacimba de Areia, Patos, Piancó and São Mamede were used. The properties were labeled A (Coordinates: 07°13'28.9"S 37°56'21.7"W), B (07°08'41.7"S 37°07'16.7"W), C (06°56'41.7"S 37°10'22.6"W), D (06°58'37.3"S 37°16'38.7"W), E (06°57'53.5"S 37°20'32.2"W), F (06°58'36.0"S 37°17'21.9"W) and G (07°00'24.3"S 37°16'15.6"W). The milk was collected directly from the teats of the animals before milking, following all methods of antisepsis. An average of 15 mL of milk per animal was collected, utilizing sterile and previously identified vials. These were sent to the laboratory in isothermal boxes with ice.

For the isolation of *Mycobacterium* spp., a 5 mL aliquot of milk was used, centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes. In this way, two phases of milk were obtained, fat and sediment, which were packaged in different vials and both decontaminated using the Petroff method

(KANTOR, 1979), inoculated in duplicate in Stonebrink and Lowenstein-Jensen mediums, and incubated at 37 °C for 90 days. Colonies suggestive of mycobacteria were stained using the Ziehl Neelsen method; DNA was extracted using thermolysis (MAZARS et al., 2001). Samples identified as Acid Fast Bacilli (AFB) in Ziehl Neelsen were subjected to molecular identification.

Identification of *Mycobacterium* species and differentiation of the *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex, *M. intracellulare* complex, and other *Mycobacterium* spp. was done using the TB Multiplex PCR (WILTON & COUSINS, 1992). For this, the primers used were: MYCGEN-F (G1) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and MYCGEN-R (G2) (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3') – associated with genus; TB-1F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') and TB-1R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3') - related to the *M. tuberculosis* complex; MYCAV-R (5'-ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3') – related to *M. avium*; and MYCINT-F (5'-CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3') – related to *M. intracellulare*. Positive controls used were the *M. bovis* strain AN5 and *M. tuberculosis* strain H37Rv for the *M. tuberculosis* complex. 50µL reactions were performed containing the reaction buffer dNTP (1.25mM each), 20pmol of each oligonucleotide, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10pmol/ µL of primers, 1.25 units of TAQ polymerase (1.0µL) and 5µL of the DNA under study. The amplification cycles used were the following: once at 94 °C for 10 minutes, 61 °C for 2 minutes, and 72 °C for 3 minutes; 33 times at 94 °C for 30 seconds, 61 °C for 2 minutes, and 72 °C for 3 minutes; once at 94 °C for 30 seconds, 61 °C for 2 minutes, and 72 °C for 10 minutes. Samples containing an amplification of 1030bp were identified as belonging to the *Mycobacterium* genus, and samples with 372bp fragments were considered members of the *M. tuberculosis* complex (WILTON & COUSINS, 1992).

All DNA samples with consistent amplification for *M. tuberculosis* using the TB Multiplex PCR were amplified with the following primers: RD4 (RD4-1 5'-ATGTGCGAGCTGAGCGATG-3'; RD4-2 5'-TGTAATATGCTGACCCATGCG-3'; and RD4-3 5'-AAAGGAGCACCATCGTCCAC-3') for identification of *M. bovis* (WARREN et al., 2006). 25µL reactions were conducted containing the reaction buffer dNTPs (1.25mM each), 20pmol of each oligonucleotide, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, primers, 1.25 units of TAQ polymerase, and 5µL of the genomic DNA being studied. The positive controls used were the *M. bovis* AN5 strain and *M. tuberculosis* strain H37Rv. PCR cycles used were: once at 95 °C for 15 minutes, 45 times at 94 °C for 1 minute, 62 °C for 1 minute, and 72 °C for 1 min, and once at 72 °C for 10 minutes. The sizes of the PCR products

indicate that the region studied is absent or present in the respective members of the *M. tuberculosis* complex. Thus, the 268bp fragment resulting from amplification is consistent with the RD4 absent in the sample, characteristic of the *M. bovis* species.

Mycobacteria were isolated from five (31.25%) of the 16 milk samples; three samples were classified as *M. bovis*, and two as belonging to the *Mycobacterium* genus. To our knowledge, this is the first study of isolation and identification of *M. bovis* in milk from cows in Northeastern Brazil. Several studies have been conducted in other states in order to isolate and identify mycobacteria in milk from cows. In São Paulo, PARDO et al. (2001) isolated *M. bovis* in one sample of raw milk; LEITE et al. (2003), using milk samples from the states of São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás and Pará, isolated *M. bovis* in one sample of raw milk. FRANCO et al. (2013), in the southeast region of São Paulo, isolated *M. bovis* from one milk sample from an individual cooling tank.

Milk and its derivatives, when contaminated and unpasteurized, present a significant risk of tuberculosis transmission to humans. It is estimated that around 50% or more of milk produced in Brazil is unpasteurized (LEITE et al., 2003), attributing serious risks of transmission of various diseases to humans, including tuberculosis caused by *M. bovis*. It is worth highlighting that it is common in northeastern Brazil to consume raw milk.

An important aspect was the isolation and identification of *Mycobacterium* spp. in two samples, probably nontuberculous environmental mycobacteria (NTM), which are present in the environment and can be transmitted to animals and humans (FRANCO et al., 2013) through inhalation or ingestion, resulting in permanent or temporary colonization of the respiratory and digestive tracts (PRIMM et al., 2004). The increasing number of individuals infected with HIV predisposes an increase in the number of cases of emerging and re-emerging diseases, especially those caused by opportunistic agents, such as *Mycobacterium* spp. In this context, non-pasteurized milk infected with mycobacteria poses a serious risk to individuals with HIV (FRANCO et al., 2013).

The presence of *M. bovis* and *Mycobacterium* spp. in milk from cows in the state of Paraíba in Northeastern Brazil suggests that humans are at risk of contamination by ingestion. This reinforces the need to implement preventative measures against the contamination of milk during and after milking with NTM, optimization of milk and dairy products quality programs, enhancing sanitary inspections of these products, and conducting studies for isolating and identifying mycobacteria in milk from other Northeastern states.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by financial support under the code 302131/2012-4.

## ETHICS COMMITTEE

This study was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Universidade Federal de Campina Grande – UFCG) (protocol 25-2012).

## REFERENCES:

BRASIL – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006. 188p.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan**, 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/setembro/24/Casos-novos-tuberculose-1990-2014-base-jun-2015.pdf>.

EL-SAYED, A. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in humans and cattle. **Zoonoses and Public Health**, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/zph.12242/abstract;jsessionid=0BD56CCA865867B220F15F41ACCAA9AE.f02t01>> doi: 10.1111/zph.12242>. Acesso em: 20 mar. 2016. doi: 10.1111/zph.12242.

FRANCO, M.M.J. et al. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p.746-6148, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3650655/>>. Acesso em: 20 jan. 2016. doi: 10.1186/1746-6148-9-85.

KANTOR, I.N. **Bacteriología de latuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis, Organización Panamericana de la Salud, 1979. 63p.

LEITE, C.Q.F. et al. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens

and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p.319-323, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762003000300005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000300005)>. Acesso em: 20 jan. 2016. doi: 10.1590/S0074-02762003000300005.

MAZARS, E. et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p.1901-1906, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29354/>>. Acesso em: 20 jan. 2016. doi: 10.1073/pnas.98.4.1901.

PARDO, R.B. et al. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p.284-287, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-95962001000600007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962001000600007)>. Acesso em: 18 fev. 2016. doi: 10.1590/S1413-95962001000600007.

PRIMM, T. P. et al. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 98–106, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321467/>>. Acesso em 12 jan. 2016. doi: 10.1128/CMR.17.1.98–106.2004.

ROCHA, A. et al. Genotyping did not evidence any contribution of *Mycobacterium bovis* to human tuberculosis in Brazil. **Tuberculosis (Edinburgh)**, v. 91, n. 1, p.14–21, 2011. Disponível em: <[http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792\(10\)00129-0/fulltext](http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792(10)00129-0/fulltext)>. Acesso em: 20 jan. 2016. doi: 10.1016/j.tube.2010.10.003.

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. Disponível em: <<http://docserv.ingentaconnect.com/deliver/connect/iuatld/10273719/v10n7/s19.pdf?expires=1461095505&id=86722049&titleid=3764&accname=Guest+User&checksum=69A041568F1DEA686ED74EF48B6DE8B5>>. Acesso em 02 fev.

WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. **PCR Methods and Applications**, v. 1,

n. 4, p.269-273, 1992. Disponível em:<<http://genome.cshlp.org/content/1/4/269.long>>. Acesso em 20 jan. 2016.

## ANEXO II

### NORMAS DO PERIÓDICO CIÊNCIA RURAL

1. CIÊNCIA RURAL- Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados preferencialmente em idioma Inglês. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1º rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso não traduzidos nesta etapa e se aprovados para publicação, terão que ser obrigatoriamente traduzidos para o Inglês por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR. As despesas de tradução serão por conta dos autores. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.

3. O artigo científico (Modelo.doc.,.pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

4. A revisão bibliográfica (Modelo.doc.,.pdf) deverá conter os seguintes

tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

5. A nota (Modelodoc, pdf) deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

6. O preenchimento do campo "cover letter" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, exceto para artigos submetidos em português (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

a) What is the major scientific accomplishment of your study?

b) The question your research answers?

c) Your major experimental results and overall findings?

d) The most important conclusions that can be drawn from your research?

e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte tutorial.

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas

seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

10.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. The practice of large animal surgery. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Manaus: INPA, 1979. 95p.

10.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. The thyroid. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

10.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. Sampling techniques. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte. São Paulo: Roca, 1985. p.29-40.

10.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrionid molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Product Research, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. Ciência Rural, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010384782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

## 10.5.Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. Anais...Santa Maria :Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

## 10.6.Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B.Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad). 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

## 10.7.Boletim:

ROGIK, F.A. Indústria da lactose. São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

## 10.8.Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

## 10.9.Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico. São Paulo: Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. Proceedings...Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. Transgênicos. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. Maturitas, (Ireland), v.34,

n.2, p.179-184, Feb 15, 2000.Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000.

Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. Anais...Corrientes: Facultad de Ciências Veterinárias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

11. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

12. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

15. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (com decisão de Reject and Resubmit) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por decurso de prazo não terão a taxa de tramitação reembolsada.

20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

### ANEXO III

#### NORMAS DO PERIÓDICO PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link , com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico. Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review). NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;

c) o ABSTRACT deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o RESUMO deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica

sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir

nota de fim”, do Word. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada em caixa alta e baixa, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto auto explicativas, independente do texto).

5. Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. Não há traços verticais, nem fundos cinzas. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.