



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Wellington Erasmo de Lima Silva

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium* spp. EM
RUMINANTES NA MICRORREGIÃO DE PETROLINA-PE**

PETROLINA-PE
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

WELLINGTON ERASMO DE LIMA SILVA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium* spp. EM
RUMINANTES NA MICRORREGIÃO DE PETROLINA-PE**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Co-orientadora: Dr^a Gisele Veneroni Gouveia

PETROLINA – PE
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Wellington Erasmo de Lima Silva

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium* spp. EM
RUMINANTES NA REGIÃO DO VALE DO SÃO FRANCISCO**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF,
Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr^a. Josir Laine Aparecida Veschi
Embrapa Semiárido

PETROLINA-PE
2013

Agradecimentos

À Deus, Pai todo poderoso, pelas as diversas graças concedidas em toda minha trajetória de vida...

A minha filha Emilly Beatriz, por ter abrilhantado meus dias, nestes últimos três anos. A minha esposa Icleia, pelo amor, convívio, dedicação e muita paciência.

Aos meus Pais (seu Juraci e dona Rosa), homens simples que pouco conseguem escrever seus próprios nomes, mas que na vida souberam arquitetar princípios.

Ao Pe. José Porfirio, tia Iracy e tio Edésio, pelo o carinho e acolhimento em suas casas. Aos meus irmãos (Fábio e Silvandro), meus avos (Joel e Anizia) e *in memoria* madrinha Severina e Dona Cesarina.

Ao Professor Dr^o. Mateus Matiuzzi da Costa, pela amizade, orientação, ensinamento e apoio. Professor, destes anos de convívio fica um dos grandes aprendizados, “confiança ao próximo”.

Aos professores(as) Gisele Veneroni Gouveia, Rodolfo de Moraes Peixoto, Luciana Jatobá, Helena, Clarice, Adriana e Frankilin Riet Correa, pelas contribuições na realização neste trabalho.

A todas as outras pessoas que ajudaram diretamente para conclusão deste trabalho, em especial: Icleia, Silvandro, Marielly, Chirler, Ceixa, Evandro, Carina, Bruna, Vanuzia, Jarbas, Valdenice, André (Recife), Renata, Edimilson, Keide, Alan, Renan, Josival, Marcelo e Jonieudes.

Aos colegas do laboratório de microbiologia e imunologia Animal da UNIVASF, Gisele, Marielly, Chirler, Samira, Naedja, Renilde, Jusciêne, Carina, Evandro, Ceixa, Jamile, Rafael, Izabela, Grace, Jarbas, Valdenice, Renata, Jennifer, Aldo, Milka e Eugênio.

A prefeitura Municipal de Araripina - PE, em especial ao secretário de Desenvolvimento Rural (Brenno Ramos) pela compreensão, paciência e apoio na conclusão deste trabalho. Agradeço também aos colegas de trabalho e veterinários desta mesma secretaria, Gustavo Modesto e Joaquim Afonso.

Aos produtores de caprinos e bovinos de leite, que permitiram as coletas em suas propriedades. Os amigos do matadouro Municipal de Petrolina pela paciência e permissão na realização deste projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação.

A todos, meu muito OBRIGADO.

RESUMO

A pecuária na região nordeste do Brasil é uma das principais fontes de renda e alimentos para a população que habitam as áreas rurais. Porém, ainda é bastante comum à ausência de tecnologias sobre os rebanhos explorados, principalmente na criação de caprinos e ovinos. As técnicas de manejo ainda são bastante rústicas, as medidas sanitárias deixam de ser aplicadas por não existir informações epidemiológicas das criações. Desta forma, objetivou-se isolar e identificar espécies do gênero *Mycobacterium* spp. a partir de amostras de leite e abscessos encontrados no exame *post mortem* de caprinos, ovinos e bovinos, no município de Petrolina-PE e região. Neste estudo foram avaliados 272 caprinos oriundos de rebanhos leiteiros, 679 caprinos de corte, 1.838 ovinos deslanados e 105 bovinos de leite organiza melhor estes números... Para o cultivo de micobactérias as amostras de leite e os abscessos foram descontaminadas (método de Petrof), cultivadas em meio Lowenstein Jensen (LJ) contendo piruvato ou glicerol. No diagnóstico diferencial das amostras de abscessos foram cultivadas em meio Agar Sangue 5%. A identificação molecular de *Mycobacterium* spp. foi realizada com a utilização da técnica de Reação em cadeia de Polimerase (PCR) onde foram utilizados *primers* que amplificam parte do gene *hsp65*. As amostras positivas para micobactérias foram submetidas ao sequenciamento de DNA. O cultivo no meio LJ foram isolados micobactérias em 1,9% (2/106) das amostras de abscessos, 0,4% (1/272) das amostras de leite caprino e 1/105 (1,0%) no leite bovino. Com PCR direta das amostras clínicas foram visualizada amplificação para parte do gene *hsp65* em 0,9% (1/106) das amostras de abscessos e 1,8% (5/272) das amostras de leite de cabras. No sequenciamento nenhuma espécie do complexo *Mycobacterium tuberculosis* foi identificada, porém, foram identificadas micobactérias não tuberculosas de relevância a saúde humana.

Palavras-Chave: micobactérias, diagnóstico, cultivo, biologia molecular, ruminantes.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1: Lesão de linfadenite caseosa. No centro observa-se uma área de deposição de sais de cálcio (C) rodeada por uma extensa área de necrose (N). Dentro da área de necrose observam-se grandes colônias (setas), características da doença. A área de necrose é rodeada por células inflamatórias dispostas em camadas (A, B e C) e na periferia observa-se tecido linfoide.

Anexos

Figura1: Eletroferograma parcial de uma sequência de DNA de *Mycobacterium* spp. oriundo de uma amostra de leite capino, obtida no sequenciador automático *ABI-PRIM 3100 Genetic Analyzer*.

Figura 2: Amplificação de parte do gene *hsp65* para identificação de *Mycobacterium* spp. a partir de DNA extraído direto de leite caprino e bovino, com os iniciadores específicos descritos por Telenti et al. (1993). Coluna s da esquerda para a direita: 1- Marcador de peso molecular de 100 pb; 2 - Controle positivo; 3 á 7 - Amostras extraídas de leite de cabras e vacas na microrregião de Petrolina; e 8 – Controle negativo.

Figura 3: Distribuição espacial das propriedades de caprinos leiteiros onde foram realizadas as coletas de leite, microrregião de Petrolina, PE, 2012.

LISTA DE QUADROS

Anexos

Quadro 1: Relação e caracterização das amostras de leite bovino e caprino que apresentaram-se positivas por algumas das técnicas de diagnóstico para *Mycobacterium* spp.

Quadro 2: Relação e caracterização das três amostras de abscessos que apresentaram-se positivas por algumas das técnicas de diagnóstico para *Mycobacterium* spp.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1: Frequências absoluta e relativa de *Mycobacterium* spp. no leite caprino e bovino, em meio específico adicionando glicerol ou piruvato.

Tabela 2: Resultado do sequenciamento de DNA das amostras que apresentaram amplificação do fragmento de parte do gene *hsp65* pb pela técnica de PCR.

Artigo 2

Tabela 1: Distribuição de caprinos e ovinos inspecionados no *post mortem* e frequência (freq.) absoluta e relativa de animais com abscessos por espécies, Petrolina-PE.

Tabela 2: Distribuição de micro-organismos por órgãos, isolados de abscessos em meio ágar sangue, no matadouro municipal de Petrolina-PE, 2012.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BA	Bahia
BAAR	Bacilos Álcool-ácido Resistente
BLAST	Basic Local Align Sequence Tool
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LJ	Lowenstein Jensen
LJP	Lowenstein Jensen com Piruvato
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Pernambuco
PPD	Derivado Proteico Purificado
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
SRD	Sem Raça Definida
TCC	Teste Cervical Comparativo
TCS	Teste Cervical Simples
UV	Ultra-Violeta
ZN	Ziehl-Neelsen

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µm	Micrômetro
□	Maior
M	Mol
µl	Microlitro
mM	Milimolar
pH	Potencial Hidrogeniônico
°C	Grau Celsius
H	Hora
ml	Mililitro
mg	Miligrama

SUMÁRIO

Resumo.....	09
Listra de figuras.....	10
Listra de quadros.....	
Listra de tabelas.....	
Listra de abreviaturas e siglas.....	
Listra de símbolos.....	
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. Bovinocultura.....	14
2.2. Caprino e ovinocultura.....	15
2.3. <i>Mycobacterium</i> spp.....	16
2.4. Tuberculose em bovinos.....	19
2.5. Tuberculose em caprinos e ovinos.....	21
2.6. Tuberculose e micobacterioses em humanos.....	23
2.7. Formas de Diagnóstico da Tuberculose.....	26
2.7.1. Exames Clínicos.....	26
2.7.2. Achados macroscópicos.....	27
2.7.3. Coloração de Ziehl-Neelsen.....	28
2.7.4. Exame Histopatológico.....	28
2.7.5. Diagnóstico alérgico cutâneo.....	29
2.7.6. Isolamento bacteriano.....	31
2.7.7. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	32
2.8. Diagnóstico diferencial.....	33
ARTIGO 1.....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	36
1. Introdução.....	37
2. Material e Métodos.....	38
2.1. Animais avaliados.....	38

2.2. Coleta do material.....	38
2.3. Cultivo e identificação microbiológica.....	38
2.4. Ziehl–Neelsen.....	39
2.5. Extração DNA das amostras de leite.....	39
2.6. Extração de DNA do cultivo bacteriano.....	39
2.7. PCR para detecção de <i>Mycobacterium</i> spp.....	40
2.8. Sequenciamento de DNA.....	41
3. Resultados e Discussão.....	41
4. Conclusão.....	47
Referências bibliográficas.....	48
ARTIGO 2.....	53
Resumo.....	53
Abstract.....	54
1. Introdução.....	55
2. Material e Métodos.....	56
2.1. Local e coleta.....	56
2.2. Exame histopatológico.....	56
2.3. Cultivo e diagnóstico diferencial.....	57
2.4. Extração de DNA.....	57
2.5. PCR para detecção de <i>Mycobacterium</i> spp.....	57
2.6. Sequenciamento do DNA.....	59
3. Resultados e Discussão.....	59
4. Conclusão.....	66
Referências bibliográficas.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	87

1. INTRODUÇÃO

A pecuária é uma das atividades mais antigas praticadas no Brasil, sendo realizada desde o início da colonização pelos portugueses. Nas últimas décadas tem-se observado grandes avanços no setor agrícola e pecuário brasileiro, a exemplo, da produção de carne de frangos, suínos e bovinos, bem como na produção de leite bovino (FAO 2008).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) apontaram uma produção média de 3 bilhões de litros de leite no ano 2009, com 22,9 milhões de vacas ordenhadas, correspondendo o valor de 10,9% do rebanho efetivo brasileiro daquele ano. Outras culturas, além da bovinocultura também vêm se firmando na pecuária brasileira. Para Resendes et al. (2008) a criação de caprinos e ovinos vem sofrendo grandes modificações nos diversos elos da cadeia produtiva, ocorrendo devido a expansão do mercado interno e externo.

O rebanho caprino-ovino brasileiro é o maior da América do Sul e o oitavo maior rebanho do mundo, com cerca de 27,041 milhões de cabeças. A região nordeste é detentora do maior rebanho nacional, onde se encontra mais de 91% dos caprinos e 56% dos ovinos. Alguns municípios da microrregião de Petrolina-PE são citados como detentores dos maiores rebanhos de caprinos e ovinos do Brasil (IBGE, 2011).

Essas culturas desempenham importantes funções socioeconômicas na região semiárida do nordeste, gerando renda e como fonte de proteína de alta qualidade (carne e leite) para as famílias. Sendo responsáveis, também, por manter os gastos de milhares de produtores.

Apesar dos avanços na criação de ruminantes no Brasil, vários problemas sanitários ainda são muito comuns (NOBREGA JUNIOR et al., 2008), a exemplo das enfermidades de origem bacteriana, fúngica e/ou viral (LORES et al., 2005; JARDIM et al., 2006). Dentre as doenças de origem bacteriana, o gênero *Mycobacterium* spp. destaca-se por reunir espécies com grande potencial patogênico tanto para os animais como para os seres humanos (OLIVEIRA et al., 2010). (OLIVEIRA et al., 2010).

Esses micro-organismos caracterizam-se por apresentar na parede celular grande quantidade de lipídios. Os lipídios são responsáveis por estabilidade ácida e propriedades patogênicas e imunológicas (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003).

Apresentam taxa de crescimento lento, com tempo de geração variando entre 2 e 20 horas (QUINN et al., 1994).

Essas bactérias possuem afinidade com os gêneros *Nocardia*, *Corynebacterium* e *Rhodococcus*. As micobactérias, além de estarem envolvidas na etiologia da tuberculose, podem também está envolvida em outras enfermidades dos seres humanos e animais (JONES et al., 2000). Entre elas o *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. leprae* e *M. abscessus*, que estão envolvidos com paratuberculose nos ruminantes, hanseníase e doenças oportunistas, respectivamente (HARRIS & BARLETTA, 2001; CARDONA-CASTRO et al., 2005).

O *M. bovis* é o principal agente etiológico da tuberculose bovina, como também dos caprinos e ovinos. Acreditou-se por muito tempo que os caprinos e ovinos apresentassem resistência ao *M. bovis*, porém estudos revelaram a ocorrência da tuberculose tanto nos caprinos como nos ovinos em alguns países, com os primeiros relatos na Europa e na África (MALONE et al., 2003; PINHEIRO et al., 2007; BENESI et al., 2008). Os animais afetados pelo *M. bovis* geralmente são assintomáticos ou podem apresentar sintomas característicos como emagrecimento progressivo, tosse, dispneia, aumento de linfonodos, redução na produção, entre outros (OLIVEIRA et al., 2007).

A disseminação dessa doença nos rebanhos ocorre principalmente pelas vias oral e respiratória, sendo os rebanhos criados em sistema intensivo os mais acometidos. O maior rigor das medidas sanitárias nos abatedouros e na pasteurização do leite junto a outras técnicas como os testes intradérmicos e sorológicos, tem contribuído na redução da tuberculose (COSIVI et al., 1998). Além das infecções pelas bactérias do complexo *M. tuberculosis*, o isolamento de micobactérias não tuberculosas (MNT) a partir de amostras clínicas também tem se tornando muito freqüente nos últimos anos (TORTOLI, 2009).

Considerando a escassez de informações referente às infecções por micobactérias nos ruminantes de produção criados na região do Vale do São Francisco, e a importância deste gênero bacteriano para a saúde pública, objetivou-se isolar e identificar espécies do gênero *Mycobacterium* spp. a partir de amostras de leite e abscessos encontrados no exame *post mortem* de caprinos, ovinos e bovinos, no município de Petrolina-PE e região.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Bovinocultura

O rebanho bovino brasileiro apresentou em 2011 um crescimento de 1,6% em relação a 2010 (209,5 milhões de cabeças), totalizando um efetivo de cerca de 212,8 milhões de cabeças. Neste ano de 2011, o Brasil ocupava a 2ª posição mundial em rebanho de gado bovino, atrás da Índia, cujo rebanho era de 324,5 milhões, cerca de 1,5 vezes maior que o brasileiro e, na sequência, destacaram-se China e os Estados Unidos (IBGE, 2012).

O crescimento do rebanho bovino ocorreu com maior intensidade, entre 2010 e 2011, nas regiões Nordeste (2,9%), Sudeste (2,8%) e Norte (2,7%), onde se destacaram os estados do Pará e Rondônia. Quanto ao aumento na produção dos produtos de origem animal, a atividade leiteira teve um crescimento de 4,5%. Em 2011, a região Nordeste do Brasil apresentou um rebanho bovino com 29,5 milhões de cabeças. Com relação ao estado de Pernambuco, este apresentou um número estimado de 2,5 milhões de cabeças (IBGE, 2012).

A bovinocultura leiteira na região do Vale do São Francisco ainda é pouco expressiva no contexto da produção estadual (NEVES et al., 2011). Em 2007, produziu aproximadamente 10,8 milhões de litros de leite de vaca, o que representou apenas 1,7% da produção do estado. Segundo Yamaguchi et al. (2009), o sertão do São Francisco pernambucano apresentou redução da produtividade em 1,9 % nos últimos dez anos. Neves et al. (2011) estudando as características dos produtores e o sistema de produção de leite de vaca em Petrolina-PE, observou que existem muitas falhas nas propriedades produtoras de leite deste município. Essas falhas estão relacionadas principalmente ao manejo sanitário, procedimentos de higiene na ordenha e resfriamento do leite, podendo acarretar prejuízos econômicos e danos à saúde pública, uma vez que existe o risco de zoonoses serem transmitidas pelo consumo de leite ou dos produtos lácteos.

Em relação à sanidade dos bovinos, Domingues & Langoni (2001) relatam a importância do manejo sanitário com o intuito de minimizar e eliminar a incidência de enfermidades no rebanho, visando aumento na produção e produtividade. A deficiência do manejo sanitário pode acarretar doenças no plantel, levando a gastos

com medicamentos e, conseqüentemente, a prejuízos econômicos e diminuição na lucratividade da fazenda (VIEIRA, 2008).

2.2. Caprino e ovinocultura

O efetivo de caprinos e ovinos no Brasil somou 27,041 milhões de cabeças em 2011. Destes, 9,379 milhões de cabeças de caprinos estão, em sua maioria, localizados na região semiárida do Nordeste. O estado da Bahia detém 29,2% do efetivo desta espécie, seguido por Pernambuco, com 20,5%, e Piauí, com 14,7% (IBGE, 2011).

Já o efetivo de ovinos apurado em 2011 foi de 17,662 milhões de cabeças, representando aumento de 1,6% em relação ao número registrado em 2010. O estado do Rio Grande do Sul detém 22,6% do rebanho nacional, sendo acompanhado pelo estado da Bahia com 17,4% e, Ceará com 12,1%. No Rio Grande do Sul, a principal finalidade do rebanho é a produção de lã, enquanto na Região Nordeste é a produção de carne (IBGE, 2011).

Nas últimas décadas o setor primário da economia brasileira vem sendo beneficiado pelo crescimento vertiginoso da produção de caprinos e ovinos em diversas linhas de produção. Por exemplo, a participação de cortes e carcaças de ovinos na importação tem aumentado significativamente, sinalizando um aumento de consumo interno, mas também uma maior exportação de produtos industrializados (SILVA, 2002).

A criação de caprinos e ovinos no nordeste vem se modernizando, podendo-se observar criatórios comerciais bem organizados, com grandes estruturas de produção e na maioria das vezes, com agregação de valor, através do beneficiamento e comercialização dos produtos (RIBEIRO, 1997). Porém, ainda são comuns os sistemas de produção voltados para subsistência, onde os animais são a principal fonte de proteína, principalmente para aquelas populações localizadas em regiões áridas, já que os caprinos têm elevada adaptabilidade às condições edafoclimáticas do semiárido brasileiro.

A produção e a produtividade desses animais podem ser influenciadas por uma série de fatores, destacando-se aqueles de origem nutricional, de manejo em geral e sanitária. Segundo Ribeiro (1998) para se obter bons resultados produtivo e econômico na criação, é de suma importância a condição sanitária do plantel. Se a

saúde não estiver bem, haverá queda na produção, comprometimento da reprodução, gastos veterinários e em alguns casos morte do animal.

No que se refere aos problemas de ordem sanitária, destacam-se as doenças de origem infecciosa e parasitária, sendo responsáveis por inúmeras perdas econômicas, devido à baixa na produção de carne e/ou leite, além das altas taxas de mortalidade (VIEIRA et al., 1999). Nesse contexto, surgem as enfermidades causadas por vírus e bactérias, que representam uma ameaça ao desenvolvimento da caprinovinocultura brasileira.

Desta forma faz-se necessário o desenvolvimento de estudos sobre caracterização zoonosológica nos rebanhos brasileiros, estudos epidemiológicos que determinem a incidência e prevalência das principais enfermidades, desenvolvimento e uso de métodos moleculares para identificação e tipagem dos patógenos, técnicas para diagnóstico diferencial e quantificação dos prejuízos oriundos dos problemas sanitários (PINHEIRO et al., 2000).

2.3 *Mycobacterium* spp.

As micobactérias estão agrupadas taxonomicamente no filo Actinobacteria, Ordem *Actinomycetales*, Família *Mycobacteriaceae* e Gênero *Mycobacterium*. Na década de 90 foram descritas várias novas espécies neste gênero. Atualmente já foram descritas mais de 100 espécies no gênero *Mycobacterium* (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GARRITY, et al., 2004).

São bacilos ácido-resistentes em forma de bastão, aeróbios, imóveis, não formadores de esporos, catalase positiva e com exigências nutricionais complexas. Espécies diferem em tamanho, por exemplo, os *Mycobacterium bovis* e *M. avium subsp. avium* são delgados e atingem até 4 micrômetros de comprimento, enquanto os de *M. avium subsp. paratuberculosis* são largos e geralmente têm menos de 2 µm de comprimento (QUINN et al, 2005, HOLT et al., 1994).

São intracelulares, que infectam e proliferam-se no interior de macrófagos. A velocidade de crescimento entre as espécies do gênero é bastante variável, diferenciando-as entre os grupos de crescimento lento e rápido. Outra propriedade das micobactérias é a retenção de fucsina básica pela parede celular, mesmo na presença de álcool e ácido, conferindo-lhes a designação de bacilos álcool-ácido resistentes(BAAR) (TRABULSI, 2005).

As células das micobactérias são ricas em lipídios. Os lipídios são responsáveis por estabilidade ácida, propriedades patogênicas e imunológicas. As camadas sub superficiais de cadeia-longa dividem-se em ácidos micólicos, e seus ésteres constituem uma grande quantidade de lipídios na parede celular. A estabilidade ácida depende de alguma forma destes constituintes da parede celular. Os ácidos micólicos são ligados à camada de peptidoglicano interior pela via dos arabinolactanos (HIRSH & ZEE 2003).

Esses micro-organismos são moderadamente resistentes ao calor, podendo ser inativados pela pasteurização. Apresentam uma alta resistência à maioria dos desinfetantes comuns. Podem sobreviver no meio ambiente por longos períodos de tempo (por mais de dois anos), sob condições favoráveis (DUFFIELD & YOUNG 1985). Segundo Zanon et al. (1974) alguns fenóis orgânicos conseguem matar as micobactérias em meia hora, quando utilizados em concentrações a 3%.

O gênero é representado por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae* além de outras, normalmente saprófitas, conhecidas como micobactérias não tuberculosas (MAZA et al., 1999; KATOCH 2004). As micobactérias não tuberculosas (MNT), ao contrário das outras espécies do gênero, apresentam patogenicidade variável (UEKI et al., 2005; FREITAS et al., 2003). As infecções causadas pela MNT são conhecidas como micobacteriose, que nos animais tem como principais causadores, os membros do complexo *Mycobacterium avium-intracellulares* e por outras micobactérias menos definidas, como o *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. aquae*, *M. cookii*, *M. scrofulaceum* e outras (RADOSTITD et al., 2002).

Alguns estudos vêm revelando o potencial patogênico de algumas espécies das MNT isoladas de infecções em animais e seres humanos (PEDRO et al., 2008; TORTOLI, 2009). Duarte (2010) encontrou uma frequência de 12% de MNT em amostras de pulmões e linfonodos de bovinos condenados pela inspeção, na microrregião de Feira de Santana-BA e destacou que estes micro-organismos podem vir a desenvolver infecções nos animais e serem humanos, além de interferir nos resultados de diagnóstico imunológico da tuberculose.

Algumas das MNT encontram-se também agrupadas no Complexo *M. avium*, a exemplo do *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, responsável pela paratuberculose ou doença de Johne. Esta é uma doença infecciosa entérica e crônica que afeta com maior frequência os bovinos, ovinos e caprinos (KRUZE et al, 2006). Essa enfermidade tem importância mundial, visto que proporciona prejuízo econômico,

principalmente nos rebanhos leiteiros, por aumentar os custos sanitários (COSTA et al., 2010), e também por tratar-se de uma zoonose. Pesquisadores indicam o *M. avium* subespécie *paratuberculosis* como responsável pela íleocolite granulomatosa em humanos, conhecida como doença de Crohn (CHIODINI & ROSSITER 1996).

No Brasil, a primeira publicação sobre a ocorrência da doença é referente à espécie bovina e foi realizada em 1915, no estado do Rio de Janeiro. Outros quatro relatos foram feitos no mesmo estado (SANTOS & SILVA, 1956; DACORSO FILHO et al., 1960; SILVA & PIZELLI, 1961; SILVA, 1968). A doença também foi relatada nos estados de Minas Gerais (NAKAJIMA et al., 1991); Santa Catarina (PORTUGAL et al., 1979); Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 1986; DRIEMEIER et al., 1999) e Pernambuco (MOTA et al., 2007). Recentemente, foi diagnosticado o primeiro caso da doença em búfalos no Brasil, especificamente no estado de Pernambuco (MOTA et al., 2010). Medeiros et al (2012), encontraram anticorpos para paratuberculose em 10% dos bovinos avaliados no sertão paraibano. No ano 2010 foi relatado o primeiro caso da infecção pelo *Mycobacterium paratuberculosis* de forma natural nos pequenos ruminantes do Brasil (OLIVEIRA et al, 2010).

Também na Paraíba, foi avaliada a frequência de anticorpos para paratuberculose em pequenos ruminantes, sendo encontrados 48,3% em caprinos e 50,63% em ovinos (MEDEIROS et al. 2012). Para os autores, a alta frequência deve-se ao confinamento ou semi-confinamento em condições higiênicas que favorecem a transmissão da enfermidade (MEDEIROS et al. 2012). Esses resultados confirmam a existência das doenças causadas pelas micobactérias nos ruminantes da região nordeste do Brasil.

2.4. Tuberculose em bovinos

A tuberculose é uma doença infecciosa e crônica que acomete várias espécies de animais, inclusive os bovinos. O agente etiológico da tuberculose nos bovinos pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Este, além de infectar os bovinos pode ser transmitido para outros mamíferos e seres humanos, constituindo risco a saúde pública (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é composto pelas espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, Bacille Calmette-Guérin (BCG), *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*,

Mycobacterium caprae e *Mycobacterium pinnipedii*. Dentre esses, os *M. tuberculosis* e o *M. bovis* destacam-se por serem os agentes causadores da tuberculose humana e bovina, respectivamente (FIGUEIREDO et al., 2008).

Outro grupo de importância no diagnóstico da tuberculose bovina é o complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*, o qual inclui as espécies *M. avium* e *M. intracellulare*. Esses micro-organismos provocam reações cruzadas no teste da tuberculina, técnica oficial utilizada no diagnóstico da tuberculose bovina (DVORSKA et al., 2004). Infecção por *M. avium* também pode provocar lesões piogranulosas nos bovinos. Essas lesões podem persistir nos linfonodos mesentéricos, meninge, útero e úbere, sendo esporádicos casos de tuberculose pulmonar aberta (RADOSTITS et al., 2002).

A tuberculose nos bovinos é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas específicas e progressivas ou tubérculos no tecido pulmonar, nódulos linfáticos ou outros órgãos (AYELE et al., 2004). Essa enfermidade representa várias perdas para a economia de um país, pois acarreta a morte e sacrifício de animais, diminui o rendimento de carne e leite dos bovinos e impõe barreira entre países. Sendo, a baixa produtividade e a condenação de carcaças em matadouros consideradas as principais perdas causadas pela doença (RUGGIERO et al., 2007).

Um animal tuberculoso pode apresentar de 10 a 25% de queda na sua capacidade produtiva. Estudos também revelam que as perdas na produção de vacas leiteiras infectadas com a tuberculose podem chegar a 18% da produção (KANTOR; RITACCO, 1994; ROXO, 1996). Entre outras perdas, também ligadas à doença, estão a redução na fertilidade dos animais, eliminação de animais de alto valor zootécnico e custos com os testes de diagnósticos e com as medidas de controle (COUSINS et al., 2004; BRASIL, 2006).

A transmissão dessa doença se dá principalmente pelas vias respiratória ou digestória. Para Neill et al. (1991), a infecção pela inalação pode ocorrer pelo contato com um único bacilo da tuberculose. Essas vias, pelas quais os bovinos são infectados, têm influência de diversos fatores como: idade, meio ambiente e práticas de manejo adotadas na propriedade. A via orofaríngea é o principal caminho de contaminação para bezerros jovens que se alimentam de leite proveniente de vacas tuberculosas (NEILL et al., 1994).

Os bovinos acometidos pelo *M. bovis*, na maioria das vezes, não apresentam

sintomas, mas, quando estes estão presentes são representados pelo emagrecimento progressivo, aumento de linfonodos, redução na produção, sinais respiratórios caracterizados por dispneia, tosse e corrimento nasal seroso ou purulento, entre outros. Animais com sinais clínicos de tuberculose apresentam uma evolução de vários meses e morrem por emaciação. Na maioria dos animais infectados a enfermidade é subclínica, mas pode ocasionar maiores perdas (RADOSTITS et al., 2002).

As lesões iniciais da tuberculose bovina localizam-se no denominado complexo primário, que nos animais infectados pela via respiratória, encontra-se nos linfonodos bronquiais e mediastínicos e parênquima pulmonar. Quando os animais são infectados pela via digestiva o complexo primário localiza-se, preferentemente, nos linfonodos mesentéricos. As lesões primárias também podem se disseminar, afetando outros órgãos (RIET-CORREA & GARCIA, 2001).

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser realizado a partir de achados clínicos, teste sorológico, cultivo bacteriano e através da reação em cadeia de polimerase (PCR). Porém, o método de diagnóstico mais utilizado para a detecção de animais tuberculosos é a prova da tuberculina, que pode ser realizada de três formas: teste simples cervical, teste cervical comparativo ou teste da prega caudal.

Entre 1989 e 1998 dados de notificação oficiais de tuberculose bovina indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados (BRASIL, 2006). ROXO (2004), citada por KANTOR E RITACCO (2006), estimou as seguintes prevalências de animais reativos à tuberculina: a região Norte com 3,62%; Nordeste com 3,31%; Centro-Oeste com 0,37%; Sudeste com 0,92% e Sul com 0,58%.

Para o controle da tuberculose bovina no Brasil foi criado, no ano de 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT, o qual foi aprovado pela secretaria de defesa agropecuária, do Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento, sendo a Instrução Normativa nº 6, de 8 de janeiro de 2004, o Regulamento Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006; BRASIL, 2009).

Os principais objetivos do regulamento são reduzir a prevalência e a incidência da tuberculose e certificar um número elevado de estabelecimentos de criação, nos quais o controle e erradicação destas enfermidades sejam executados com rigor e eficácia, objetivando aumentar a oferta de produtos de baixo risco para o mercado consumidor. Para bovinocultura leiteira foram empregadas medidas sanitárias como o teste cervical simples, o teste confirmatório cervical comparativo e abate de animais

reagentes em frigorífico com inspeção sanitária (BRASIL, 2009).

2.5. Tuberculose em caprinos e ovinos

As micobactérias são micro-organismos de grande interesse na sanidade dos pequenos ruminantes. Vários estudos vêm mostrando o envolvimento de bactérias deste gênero na sanidade dos caprinos e ovinos no mundo (KORMENDY et al., 1989; ANDERSON & KING, 1993; SALDANHA et al., 2005; LOSINGER, 2006). Dentre as espécies do gênero que podem causar doenças nesses animais, destacam-se as espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, responsáveis pela tuberculose nos mamíferos.

As doenças causadas por *Mycobacterium* spp. acarretam vários impactos negativos, tanto na pecuária nacional e como mundial. Principalmente porque muitas dessas bactérias apresentam potencial zoonótico (CHAMBERLIN et al., 2001; GUMI et al., 2012), além das implicações econômicas, que na sua maioria são derivadas da diminuição na produção de leite e carne dos animais infectados (CVETNIC et al., 2007;. LOBUE et al., 2010).

Para Bernabé et al. (1991), a tuberculose dos caprinos compartilha os mesmos sinais clínicos, aspectos patológicos, agente etiológico, epidemiologia e o caráter zoonótico da tuberculose nos bovinos. Acredita-se que a principal fonte de infecção dos caprinos para a tuberculose seja a presença de bovinos infectados com o *M. bovis* em área próxima a criação de caprinos (PUGH, 2005).

Esses pequenos ruminantes quando afetados com o *M. bovis* apresentam tosse seca, emagrecimento progressivo, diarreia e ocasionalmente a morte. No exame anatomopatológico são observados frequentemente lesões caseosa, localizadas principalmente nos pulmões, linfonodos mediastino e/ou linfonodos mesentéricos (CRAWSHAW et al., 2008;. QUINTAS et al., 2010; SHARPE et al., 2010).

Segundo Bezos et al. (2009), a tuberculose em caprinos (causada pelo *Mycobacterium caprae* e *M. bovis*) tornou-se uma grande preocupação nos últimos anos por causa de sua alta prevalência nos rebanhos caprinos de alguns países europeus e também pelo potencial de transmissão para outros animais e seres humanos.

Quanto aos ovinos, há relatos da ocorrência da tuberculose em muitos países como EUA, Inglaterra, Nova Zelândia, África, Irlanda e Alemanha, sendo o diagnóstico da tuberculose realizado pelo achado de lesões típicas em necrópsias ou análises histopatológicas, isolamento bacteriológico, levantamentos da doença em inspeção nos abatedouros e por meio do teste tuberculínico (BARTON & ACLAND, 1973; CORDES et al., 1981; DAVIDSON et al., 1981).

Alguns fatores podem influenciar a maior ocorrência da tuberculose nos pequenos ruminantes. Entre esses, destacam-se o tamanho do rebanho (onde propriedades que possuem um número maior de animais (>25) ficam mais propícias a ocorrência da doença), à criação de bovinos associados com os mesmos e às propriedades que não realizam o teste tuberculínico nos bovinos (PIGNATA et al., 2009). Objetivando determinar a prevalência da tuberculose caprina, Pignata et al. (2008) realizaram a tuberculinização, através do teste comparativo cervical (TCC) em 1.866 caprinos oriundos de 84 propriedades no Estado da Paraíba, sendo observada prevalência em 0,47% dos animais avaliados. No mesmo estudo a prevalência das propriedades positivas no TCC para a tuberculose caprina foi de 10,71 %.

No estado de Pernambuco, estudos vêm sendo realizados desde 2005 com o objetivo de elucidar a etiopatogenia de síndromes respiratórias que ocorrem em caprinos leiteiros. Inicialmente, foram identificados caprinos reagentes ao teste tuberculínico em 7,7% dos animais avaliados (MELO, 2008), alertando-se, inclusive, para a possibilidade de sua intercorrência com a tuberculose bovina. Melo et al. (2012), em um estudo avaliando os aspectos nosológicos, radiológicos, anátomo-histopatológicos, baciloscópicos e biomoleculares da tuberculose em caprinos leiteiros no estado de Pernambuco, descreveram o primeiro caso de diagnóstico molecular com caracterização do envolvimento do *Mycobacterium bovis* na tuberculose caprina no Brasil.

Com base nas últimas descobertas sobre a tuberculose caprina no Brasil, Melo et al. (2012) destacam o surgimento de um novo paradigma na sanidade caprina nacional, junto a novos desafios para as autoridades sanitárias, comunidade científica e produtores. Isso não apenas pelos prejuízos econômicos causados pela doença, mas, também pelas possíveis implicações na saúde pública.

2.6. Tuberculose e micobacterioses em humanos

A tuberculose humana é uma doença infecciosa e contagiosa, causada por algumas micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, também denominado de bacilo de Koch, incluindo *M. bovis*, *M. africanum* e principalmente *M. tuberculosis* (TRABULSI, 2005).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose como emergência mundial, devido ao recrudescimento da doença principalmente em países em desenvolvimento, permanecendo como a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos no mundo. Segundo estimativas da OMS, um terço da população mundial está infectada pelo *M. tuberculosis* em risco de desenvolver a doença. O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 82% do total de casos de tuberculose no mundo. A OMS considera que o Brasil detectou 88% de casos novos em 2010, sendo que anualmente notificam-se no Brasil aproximadamente 85 mil casos de tuberculose sendo que, destes, 71 mil são casos novos. Além disso, morrem cerca de 4.600 pessoas com tuberculose no país por ano (SINAN/MS, 2010).

Em relação a infecção por *M. tuberculosis* em pessoas portadoras do vírus da AIDS, a OMS relata que cerca de 10 milhões de pessoas estão co-infectadas com o HIV e a tuberculose. A tuberculose é a infecção oportunista mais comum, que afeta indivíduos HIV soropositivos. É também a causa mais comum de morte em pacientes com AIDS, sendo que isso ocorre principalmente por falhas na detecção de casos e falta de adesão dos pacientes ao tratamento (DUSZA et al., 2009).

Para Maddocks et al. (2009), após o início da epidemia da AIDS ocorreu um ressurgimento da tuberculose no mundo, além do surgimento de *M. tuberculosis* resistente e multirresistente aos medicamentos. As principais causas que podem ter levado a seleção de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos foram situações como a monoterapia, prescrição imprópria e/ou falta de colaboração do paciente para o uso do esquema terapêutico recomendado no tratamento da tuberculose (ROSSETTI et al., 2002).

Estudos mostram que a resistência dos *M. tuberculosis* aos antimicrobianos está na maioria das vezes ligada a mutações gênicas, e com habitual alteração no sítio alvo do fármaco (WENGENACK et al., 1998; MORLOCK et al., 2000). Segundo Zhang et al. (1992) os *M. tuberculosis* multirresistentes surgem após uma sequência de mutações nos diferentes genes envolvidos com cada um dos fármacos.

A principal maneira de transmissão da tuberculose no homem dá-se através de gotículas infectantes, que se propagam através do ar. Quando estas gotículas são inaladas por pessoas saudáveis, provocam a infecção tuberculosa e o risco de desenvolver a doença (BRASIL, 2002). Em pacientes com tuberculose ativa, a tosse caracteriza sintomas de inflamação pulmonar crônica, além de ser o principal mecanismo de disseminação do micro-organismo para novos hospedeiros. Esses, expelidos pela tosse, espirro ou perdigotos são propelidos do pulmão para o ar, podendo permanecer em suspensão durante algumas horas (TRABULSI, 2005).

Segundo Ayele et al. (2004), o *M. tuberculosis* é amplamente conhecido como grande causador da tuberculose humana, no entanto, uma proporção desconhecida é causada pelo *M. bovis*. Isso é explicado pela limitação dos métodos de diagnósticos usados em muitos laboratórios, onde a técnica não consegue distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis*.

Para Ruggiero et al. (2007) a transmissão do *M. bovis* ao homem dá-se principalmente pela ingestão de alimentos contaminados, tendo como um agravante, a escassez de dados sobre prevalência deste agente tuberculoso na população. Um levantamento realizado dos anos 1954 a 1970 estimou que 3,1% da tuberculose no homem têm como agente causador o *M. bovis* (COSIVI et al., 1998). Estudos mostram que em países onde a tuberculose bovina não é controlada, os casos nos seres humanos ocorrem em sua maioria em pessoas jovens, e essa infecção pode ser oriunda do consumo de leite ou produtos lácteos contaminados (DANKNER et al, 1993.; COSIVI et al., 1998).

A utilização da baciloscopia direta como único método de diagnóstico da tuberculose em humanos, explica em parte, a baixa taxa de notificação do *M. bovis* como agente causador da tuberculose, isso porque a técnica não é capaz de diferenciar as espécies do gênero *Mycobacterium* spp. (COSIVI et al., 1998).

Além do Complexo *M. tuberculosis*, outras espécies do gênero *Mycobacterium* spp. vem sendo citadas como patogênicas ao seres humanos. O complexo *Mycobacterium avium*, por exemplo, compreende algumas micobactérias capazes de causar infecções em diversas espécies de seres vivos, incluindo humanos. Tais infecções podem ser assintomáticas, clinicamente significantes e, em alguns casos, fatais (COSTA et al., 2010).

Várias outras micobactérias também estão frequentemente sendo envolvidas em infecções hospitalares (GARCÍA-CÍA & ESTEBAN, 2006; BARNES et al., 2004). O

M. abscessus já foi isolado de infecções após procedimentos cirúrgicos e também após traumas com lesões expostas (RIVERA-OLIVERO et al., 2006; GUSMÃO et al., 2005). O *M. lacticola* recentemente foi isolado e identificado por testes moleculares em amostras de sangue de uma criança imunossuprimida, que apresentava febre constante. Neste mesmo estudo também foi observado que o *M. lacticola* apresenta homologia de 99,5% (2-bp diferença) na região do gene *hsp65* com o *M. neoaurum* (KISKA et al., 2004). As infecções por *M. neoaurum* é rara, os casos existentes são de pacientes imunodeficientes que passaram por tratamento por via venosa (WASHER et al., 2007).

Nos Estados Unidos da América foi identificada uma nova cepa patogênica de micobactéria, classificada como *M. iranicum*. Esse micro-organismo foi isolado de uma mulher previamente diagnosticada com encefalite viral e com infecções respiratórias, incluindo, faringite e bronquite. A confirmação veio pelo sequenciamento da região 16S rDNA (BALAKRISHNAN et al., 2012).

2.7. Formas de Diagnóstico da Tuberculose

O diagnóstico da tuberculose *in vivo* pode basear-se nos achados clínicos, teste de tuberculina, ensaio para detecção do interferon-gama e na demonstração dos micro-organismos em exsudatos ou secreções, por meio do isolamento ou pela reação da polimerase em cadeia (PCR). Após a morte do animal, o diagnóstico presuntivo pode ser realizado pelo exame histopatológico de órgãos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose (JONES et al., 2000; ALMEIDA et al., 2004).

O método mais confiável e inequívoco, para o diagnóstico de doenças acarretadas por bactérias, é o isolamento e a identificação do agente etiológico. No entanto, essa prática torna-se pouco viável para o uso rotineiro do diagnóstico da tuberculose e outras doenças causadas por bactérias do gênero *Mycobacterium* spp. devido, principalmente a dificuldade na obtenção de amostras e na demora do crescimento destes micro-organismos (ALMEIDA et al., 2004).

Um dos desafios atuais para os países em desenvolvimento é a disponibilização de metodologia que assegure a distinção entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*, para o acompanhamento da disseminação de *M. bovis* em humanos e

para a elaboração de uma análise fiel da situação epidemiológica da tuberculose nas várias regiões (RUGGIERO et al., 2007).

2.7.1. Exames Clínicos

A maioria dos animais acometidos pelo *M. bovis* não apresenta sinais clínicos visíveis. Mas, em casos em que os animais apresentam extensas lesões tuberculosas, pode-se visualizar um emagrecimento progressivo, apetite caprichoso e temperatura oscilante. A pelagem pode-se mostrar áspera ou macia e os animais acometidos tendem a se tornar mais submissos e apáticos, porém os olhos permanecem brilhantes e alertas (RADOSTITS et al., 2002).

Podem observar-se linfonodos periféricos, principalmente os da cabeça e os pré-escapulares, consideravelmente aumentados de tamanho. Na maioria dos animais infectados a enfermidade é subclínica, mas pode ocasionar perdas entre 10% e 25% na produção de carne ou leite (RIET-CORREA, 2001).

O envolvimento pulmonar é caracterizado pela presença de tosse crônica devido à broncopneumonia. A tosse nunca é ruidosa nem ocorre em paroxismos. O animal tosse apenas uma ou duas vezes em um período, sendo tal tosse baixa, suprimida e úmida. Nos estágios avançados, quando a grande área pulmonar se mostra destruída, tornam-se evidentes a dispneia, a frequência aumentada e a respiração profunda (RADOSTITS et al., 2002).

2.7.2. Achados Macroscópicos

O achado característico da tuberculose é geralmente o granuloma nodular não vascularizado conhecido como “tubérculo”. Essas lesões tuberculosas ocorrem com maior frequência nos pulmões e nos gânglios linfáticos retrofaríngeos, brônquicos e mediastínicos. As lesões podem também ser encontradas nos nódulos linfáticos mesentéricos, fígado, baço, serosas, pleura e outros órgãos (BLOOD & RADOSTIS, 1989; NEILL et al., 1994).

Habitualmente, o aspecto macroscópico de um tubérculo (esteja ele situado profundamente no tecido mole como o fígado e pulmão, ou salientando-se de uma superfície mucosa ou serosa) é o de um nódulo firme ou duro, branco, cinzento ou amarelo. Nas secreções de corte, seu centro é necrosado e caseoso, de cor

amarelada, seco e sólido, contrastando com o pus que ocorre num abscesso. A calcificação é comum em muitos animais tuberculosos e ao seccionar um tubérculo nota-se uma sensação arenosa e rangente, que indica a presença de material calcário (JONES et al., 2000).

Melo et al. (2012), estudando a ocorrência da tuberculose em caprinos, observaram que os achados anatomopatológicos foram caracterizados principalmente por lesões pulmonares (71%), focais (29%) ou difusas (43%). Macroscopicamente foi observada consolidação do parênquima pulmonar, com a presença de lesões nodulares salientes e difusas, de tamanho variado e coloração amarelada. Ao corte, as lesões apresentavam consistência e aspecto friável, com endurecimento num plano mais profundo, coincidindo com áreas de calcificação e de consistência.

2.7.3. Coloração de Ziehl-Neelsen

Predominantemente, os bacilos da tuberculose têm forma de bastonete, com cerca de 0,5 µm de largura e comprimento variável. As micobactérias, embora sejam Gram-positivas do ponto de vista citoquímico resistem, com frequência, à coloração com Gram. Sua propriedade mais marcante de coloração é a estabilidade ácida, daí surge uma forma diferenciada de coloração destes micro-organismos, que é realizada a partir de uma solução de 3% de HCl em etanol (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003). Essa técnica é denominada coloração de Ziehl-Neelsen.

Como já relatado, o método de Ziehl-Neelsen (ZN) baseia-se na álcool-ácido resistência característica das micobactérias. Sua utilização é recomendada pelo Ministério da Saúde para todos os laboratórios que realizam o diagnóstico da tuberculose pulmonar, uma vez que possibilita a identificação dos BAAR (BRASIL, 2008).

A técnica de coloração de ZN também deve ser utilizada no auxílio do diagnóstico da tuberculose dos animais. Essa técnica é caracterizada pela rapidez do seu resultado, porém tem uma baixa especificidade, pois essa coloração não consegue distinguir os vários membros da família *Mycobacteriaceae* (VITALE et al., 1998).

2.7.4. Exame Histopatológico

Devido às várias limitações nos testes utilizados para identificar a tuberculose, o diagnóstico definitivo em um rebanho requer evidências claras do *Mycobacterium*. Essas evidências podem ser confirmadas a partir dos resultados da cultura bacteriológica, métodos moleculares e/ou no exame histopatológico (THOEN et al., 2009; MEDEIROS et al., 2010).

Para Pignata et al. (2009) no exame histopatológico, mais precisamente nos pulmões de caprinos tuberculosos, podem ser observados múltiplos granulomas com centro necrótico e áreas de mineralização circundada por macrófagos, células gigantes tipo Langhans, células epitelióides e plasmócitos, espessamento dos septos alveolares com infiltrado de células mononucleares além de infiltrado de neutrófilos, com material eosinofílico na luz dos brônquios. No fígado são observados granuloma com centro necrótico, presença de calcificações envoltas por macrófagos, células gigantes epitelióides e plasmócitos.

Além da presença de células epitelióides, plasmócitos e das células gigantes tipo Langhans, que são a fusão de vários macrófagos, na periferia da lesão são observados monócitos e linfócitos, além de proliferação de tecido fibroso, que tenta encapsular a lesão. E com a coloração de Ziehl-Neelsen como já descrita, é possível observar as bactérias ácido-álcool resistentes na lesão (RIET-CORREA & GARCIA, 2001).

A histopatologia das lesões, além de ser um instrumento de diagnóstico, também fornece informação sobre as respostas imunitárias do hospedeiro (POLLOCK et al. 2005).

2.7.5. Diagnóstico Alérgico Cutâneo

O teste imunológico indireto de tuberculinização é o método diagnóstico padrão para identificar os animais tuberculosos (OIE, 2000). Esse teste vem sendo utilizado para o diagnóstico da tuberculose bovina desde um século atrás.

O regulamento técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose descreve três técnicas no diagnóstico indireto da tuberculose, sendo elas: teste cervical simples, teste da prega caudal e o teste cervical comparativo. O teste cervical simples (TCS) é o teste recomendado de rotina. Nele o derivado proteico purificado (PPD) bovino é inoculado na região cervical ou escapular

do animal, onde na interpretação, os resultados podem ser negativo, inconclusivo ou positivo para tuberculose (BRASIL, 2009).

O teste cervical simples é o método padrão para o diagnóstico da tuberculose. No entanto, estudos atuais sugerem que um único teste não é suficiente para detectar todos os animais infectados pelas micobactérias, particularmente quando os animais de um rebanho apresentam diferentes estágios de infecção (MEDEIROS et al., 2012).

O teste da prega caudal é utilizado como teste de rotina, exclusivamente em estabelecimentos de criação de bovinos de corte. A tuberculina é inoculada por via intradérmica, de seis a dez centímetros da base da cauda, na junção das peles pilosa e glabra. Os animais reagentes poderão ser submetidos a teste confirmatório, num intervalo de 60 a 90 dias, ou destinados ao sacrifício ou destruição. Já o teste cervical comparativo é o teste confirmatório utilizado em animais reagentes aos testes de rotina (BRASIL, 2009).

Mesmo sendo o isolamento do agente o “padrão ouro” para o diagnóstico da tuberculose, para Bombonato et al., (2010), onde se almeja o controle e erradicação da tuberculose, o diagnóstico pelo teste cervical comparativo (TCC) deve ser considerado nas decisões de destino dos animais.

Os animais que são inconclusivos no teste de tuberculinização em países como Estados Unidos (USDA, 2004) e Brasil (BRASIL, 2009), de acordo com a legislação podem ser mantidos nos rebanhos por período de 60 a 90 dias até realização de novos testes. O sacrifício só é obrigatório após um ou dois novos testes positivos. Para Zarden et al. (2012), os bovinos com testes inconclusivos devem ser imediatamente sacrificados, pois representam risco de infecção para outros animais e para o homem.

Os programas de controle da tuberculose caprina de alguns países europeus, como a Espanha, tem como princípio, a aplicação do teste tuberculínico. Nestas regiões esse teste deve ser implementando, com objetivos de reduzir a tuberculose nos pequenos ruminantes e ao mesmo tempo diminuir o risco de transmissão do agente infeccioso para outros animais (GORTÁZAR et al., 2005;. MATOS et al., 2010).

Vários estudos vêm sendo realizados para avaliar a sensibilidade do teste de tuberculina no diagnóstico da tuberculose caprina. Esses resultados mostram uma ampla gama de valores dependendo do teste (53,2-71% para o teste intradérmico

simples e 29,2-83,7% para teste intradérmico comparativo) (WOOD et al., 1991; LIÉBANA et al., 1998; ÁLVAREZ et al., 2008).

Bezoz et al. (2010) avaliando a especificidade de teste alérgico cutâneo para o diagnóstico da tuberculose em caprinos, observaram uma especificidade adequada do teste quando realizado em caprinos de rebanhos livres da tuberculose. Os mesmos autores também destacam alguns fatores que podem acarretar impactos negativos no diagnóstico da tuberculose, como por exemplo, infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e vacinação da paratuberculosis.

2.7.6. Isolamento Bacteriano

O diagnóstico bacteriológico é considerado um teste "padrão ouro", porém o diagnóstico final só é concluído após algumas semanas. Além disso, requer a descontaminação das amostras antes do cultivo além de meios de culturas específicos e ricos visando proporcionar melhor crescimento das micobactérias (CORNER, 1994; PINTO et al., 2002).

Os principais fatores que influenciam no sucesso do isolamento de micobactérias, são: a escolha do meio de cultura, os procedimentos de descontaminação e as condições de incubação. O *M. bovis* é uma bactéria que requer meios enriquecidos para o crescimento primário, sendo o meio Stonebrink (a base de ovos) um dos mais indicados. Os meios a base de ágar enriquecidos com soro ou sangue tuberculose ou B83, também são indicados, porém são susceptíveis ao crescimento de contaminantes mesmo que a amostra a ser cultivada tenha sido previamente descontaminada (CORNER, 1994; ALMEIDA et al., 2004).

Os meios de cultura mais indicados no cultivo do *M. tuberculosis* são Lowenstein Jensen, Petragnani e Middlebrook 7H10 e 7H11. Já os mais utilizados para isolamento do *M. bovis* são Stonebrink e Lowenstein Jensen com 0,5% de piruvato (KONEMAN, 2001; ZARDEN et al., 2012).

Nos centros de saúde pública da maioria dos países em desenvolvimento, o meio de cultura utilizado para isolar *Mycobacterium* é o Lowenstein-Jensen, porém esse meio pode apresentar dificuldades para o crescimento do *M. bovis*, isso porque sua composição é isenta de piruvato de sódio. O Lowenstein-Jensen é comumente usado para o isolamento de *M. tuberculosis* (GRANGE, 1996).

Para Biberstein & Hirsh (2003) os bacilos da tuberculose crescem melhor em meios orgânicos complexos como Lowenstein-Jensen que contém, entre outros ingredientes, ovos inteiros e fécula de batata. Meios ácidos oléico-albumina, como o ágar Middlebrook 7H10, também é usado para o isolamento de *Mycobacterium*, com frequência, em combinação com o Lowenstein-Jensen. A presença de glicerol ou pirutavo de sódio, nos meios de cultura são utilizadas para diferenciação prévia de algumas espécies, onde o glicerol favorece o desenvolvimento de *M. tuberculosis* mas não o de *M. bovis*.

2.7.7. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

As técnicas de biologia molecular para amplificação de ácido desoxirribonucleico (DNA), como no caso de reação em cadeia da polimerase (PCR), baseiam-se na síntese enzimática orientada por oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers*. Esses oligonucleotídeos correspondem a uma porção conhecida da sequência do DNA que a enzima termoestável DNA-polimerase utiliza para sintetizar e amplificar o DNA molde (LEMOS, 2006).

O desenvolvimento da técnica de PCR foi um dos principais avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas e tem permitido o estudo da expressão gênica e o diagnóstico de doenças genéticas, neoplásicas e infecciosas (RUGGIERO et al., 2007).

Quanto ao emprego da PCR para o diagnóstico da tuberculose nos animais, vários estudos vêm mostrando metodologias variadas para identificar bactérias do gênero *Mycobacterium* spp., inclusive as do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (VITALE et al., 1998; BRUNELLO et al., 2001).

As limitações encontradas nas diversas técnicas de diagnóstico da tuberculose têm justificado a intensidade nas pesquisas pelos métodos moleculares (RORING et al., 2000; ZANINI et al., 2001). Estudos também mostram que os métodos moleculares em combinação com outras técnicas de diagnóstico, como por exemplo, a cultura, aumentam a sensibilidade e a especificidade para identificação do *M. bovis* no diagnóstico da tuberculose (DE LA RUA-DOMENECH 2006; FIGUEIREDO, 2012).

Para Ruggiero et al., (2007) a técnica de PCR, assim como outras metodologias moleculares, não substituem os métodos clássicos de diagnóstico, todavia, auxiliam nos exames laboratoriais da tuberculose permitindo uma expressiva

redução no tempo necessário para a confirmação do diagnóstico esclarecendo, assim, a natureza das lesões sugestivas de tuberculose.

Várias regiões do genoma das micobactérias vêm sendo estudadas com o objetivo de identificar regiões específicas para o gênero ou espécie-específica dentro do gênero. Os fragmentos mais comuns para identificação do gênero *Mycobacterium* spp. estão contidos no gene 16S rRNA (BODDINGHAUS et al., 1990) e no gene *hsp65* (DEVALLOIS et al., 1997; BRUNELLO et al., 2001).

Já os fragmentos genômicos com maior utilização na identificação espécie-específica do complexo de *M. tuberculosis* são as sequências de inserção *IS6110* (THIERRY et al., 1990) e *IS1081* (COLLINS et al., 1991) além do gene *MPB70* (COUSINS et al., 1991).

Diversas metodologias, através da PCR, vêm sendo empregadas para o diagnóstico da tuberculose. Uma delas é a PCR multiplex que emprega, em uma mesma reação, vários conjuntos de pares de *primers* específicos para determinadas regiões do genoma bacteriano, sendo bastante útil para diferenciar as micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (RUGGIERO et al., 2007).

Outra ferramenta molecular que vem sendo bastante pesquisada para identificação das micobactérias é *Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis* (PRA) (POURAHMAD et al., 2009). Em 1993 Telenti e colaboradores descreveram o método PRA *hsp65*, que se baseia na amplificação de um fragmento de 439 pares de base do gene *Heat Shock Protein* de 65 kDa (*hsp65*). O produto amplificado é digerido com duas enzimas de restrição, *BstE II* e *Hae III*, e os fragmentos obtidos são visualizados por eletroforese em gel de agarose.

2.8. Diagnóstico Diferencial

Como a tuberculose não apresenta um sintoma patognomônico, ela pode ser confundida com várias outras enfermidades. Entre essas enfermidades deve-se fazer o diferencial de actinobacilose (ROSENBERGER et al., 1989; SMITH, 1993; RADOSTITS et al., 2002), actinomycose (ROSENBERGER et al., 1989), doença do trato respiratório superior (SMITH, 1993; RADOSTITS et al., 2002), pneumonias micóticas (SMITH, 1993), leucose bovina e linfadenopatia (RADOSTITS et al., 2002).

Para Salazar (2005) lesões com características de infecção por *M. bovis*, descritas no diagnóstico clínico e achados de necropsia, suscitam diagnóstico

diferencial, pois podem estar presentes também nas infecções por *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces bovis*, *A. lignieri*, por fungos, na infestação por larvas de parasitas e/ou em alguns processos neoplásicos.

Segundo Andrade et al. (1991) os granulomas actinomicóides são semelhantes aos granulomas encontrados na tuberculose dos animais. Nos bovinos, a infecção pelo *A. pyogenes* é frequentemente citada como causadora de abscessos hepáticos, aparentemente, agindo em sinergismo com *Fusobacterium necrophorum* (NARAYANAN et al., 1998).

O diagnóstico da tuberculose no *post mortem*, avaliando a presença de abscessos nos órgãos internos quase sempre é difícil. Por exemplo, estudos mostram que entre os envolvidos nas causas de abscessos hepáticos, pode-se destacar as bactérias do gênero *Fusobacterium*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. (LECHTENBERG et al., 1998; NAGARAJA & LECHTENBERG, 2007).

Dentre os pequenos ruminantes uma enfermidade que pode ser muitas vezes confundida com a tuberculose é a linfadenite caseosa. Essa doença é causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, porém, outros agentes também podem infectar os linfonodos, tais como: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp. e *Micrococcus* spp (ZAVOSHTI et al., 2012). O *C. pseudotuberculosis* é um bacilo Gram-positivo, pleomórfico, aeróbio, que cresce em ágar sangue em 24-48 horas e causa hemólise. Nos ruminantes esses micro-organismos podem causar abscessos nos linfonodos, que apresentam pus de consistência caseosa ou caseopurulenta, de cor esverdeada ou branco-acizentada que aparece em lâminas concêntricas e está rodeado por uma cápsula fibrosa (RIET-CORREA 2001).

3. Artigo 1

Isolamento e identificação molecular de *Mycobacterium* spp. em leite bovino e caprino na microrregião de Petrolina-PE

Resumo

O semiárido brasileiro tem alcançado grandes avanços na produção de ruminantes com a incorporação de novas tecnologias, porém, esses rebanhos ainda são severamente afetados por inúmeras doenças. Dentre os agentes causadores de doenças nos ruminantes domésticos, destacam-se bactérias do gênero *Mycobacterium* spp. Com este trabalho, objetivou-se isolar e identificar *Mycobacterium* spp. em amostras de leite provenientes de caprinos e bovinos da microrregião de Petrolina-PE. Foram avaliadas 272 amostras de leite de caprinos e 105 de leite de bovinos. As amostras foram descontaminadas (método de Petrof), cultivadas no meio Lowenstein Jensen (LJ) contendo piruvato ou glicerol e avaliadas semanalmente por um período de 120 dias para a identificação microbiológica de *Mycobacterium* spp.. Para a identificação molecular de *Mycobacterium* spp. presente nas amostras de leite foi realizada a Reação em cadeia de Polimerase (PCR) de parte do gene *hsp65*. As amostras com resultados positivos na PCR foram sequenciadas. No cultivo do leite foram visualizados crescimentos no meio de cultura Lowenstein Jensen com piruvato em 1/272 (0,4%) das amostras caprina e 1/105 (1,0%) bovina. Na PCR, houve amplificação de DNA de *Mycobacterium* spp. em 1,8% (5/272) das amostras de leite de cabras, não sendo obtidas amostras de leite bovino positivas. No sequenciamento nenhuma espécie do complexo *Mycobacterium tuberculosis* foi identificada. No entanto, foram identificadas bactérias da espécie *M. iranicum*, um agente com grande potencial patogênico em humanos, sendo pela primeira vez identificada no Brasil e em produtos de origem animal.

Palavra-chave: Micobactérias; diagnóstico; ruminantes; semiárido.

1. Introdução

A criação de ruminantes no nordeste brasileiro tem alcançado avanços com a incorporação de novas tecnologias de convívio com o semiárido e assim contribuindo com uma melhor qualidade de vida do sertanejo. Porém, esses rebanhos são severamente afetados por inúmeras doenças de origens diversificadas (PINHEIRO et al., 2000). Dentre os agentes causadores de doença nos ruminantes domésticos, destacam-se bactérias do gênero *Mycobacterium* spp. (TSCHOPP et al., 2011). Este gênero inclui o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que compreende os principais causadores da tuberculose nos mamíferos (ARANAZ et al., 2003; CRAWSHAW et al., 2008; KASSA et al., 2012) e, as micobactérias atípicas que estão frequentemente envolvidas em outras infecções dos animais e humanos (GARCÍA-CÍA & ESTEBAN, 2006; GUSMÃO et al., 2005).

A tuberculose é uma das mais importantes enfermidades dos ruminantes, isto em decorrência dos prejuízos que pode causar na produção animal e também por se tratar de uma zoonose (ZARDEN et al., 2006). As perdas na produção animal estão relacionadas à redução na capacidade produtiva, na fertilidade animal, além de custos nos testes de diagnóstico e eliminação de animais de alto valor zootécnico (ROXO, 1996; BRASIL, 2006). Esta enfermidade é uma antropozoonose, que tem como principais vias de eliminação as gotículas de aerossóis e o leite dos animais infectados (WILKINS et al., 2008). O leite e seus derivados, quando contaminados e não tratados, oferecem forte risco de transmissão da tuberculose ao homem (GOOD & DUIGNAN, 2011). Figueiredo et al. (2007) estimam que 50% a 60% do leite produzido no Brasil é comercializado sem qualquer controle sanitário, atribuindo sérios riscos de transmissão de várias doenças ao homem, inclusive a tuberculose.

O perfil epidemiológico das doenças causadas por micobactérias nos rebanhos de produção leiteira da microrregião de Petrolina é desconhecido. Desta forma objetivou-se com este trabalho isolar e identificar *Mycobacterium* spp. a partir de amostras de leite provenientes de caprinos e bovinos da microrregião de Petrolina-PE.

2. Material e Métodos

2.1. Animais avaliados

Foram avaliadas 272 cabras e 105 vacas oriundas de 27 propriedades (17 de caprinos e 10 de bovinos), localizadas na microrregião de Petrolina-PE. Todos estes animais eram ordenhados diariamente e o leite disponibilizado para a comunidade local. O manejo entre as propriedades era bastante diversificado, sendo que 14 das 27 propriedades (sete de caprinos e sete de bovinos) estão em áreas sequeiras onde não existe água disponível para irrigação, e as demais encontram-se em áreas irrigadas. As raças dos animais avaliados foram Anglo Nubiano, Saanen, Parda Alpina, Toggenburg e SRD (sem raça definida) para os caprinos. Com relação aos bovinos estas foram Holandesa, Girolando, Gir, Pardo Suíça e mestiças.

2.2. Coleta do material

O leite foi coletado diretamente dos tetos dos animais, antes da ordenha, respeitando todos os métodos de anti-sepsia (NMC, 1999). Foram coletados, em média, 15 ml de leite por animal, utilizando frascos estéreis e previamente identificados, os quais foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF em caixa isotérmica com gelo.

2.3. Cultivo e identificação microbiológica

As amostras de leite foram descontaminadas segundo o método de Petrof (QUINN et al., 1994). Para isso, foram adicionados cinco mililitros do leite em tubo estéril e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500g por 20min. Para a descontaminação das amostras, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados cinco mililitros de NaOH (1M) deixando-se em repouso por 20min. Para neutralização do pH das amostras, foram adicionados mais cinco mililitros de HCl (1M) e as amostras foram novamente centrifugadas a 3500g por 20min. Logo após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e foram adicionados dois mililitros de água destilada estéril nas amostras, que foram homogeneizadas. Posteriormente, 0,1ml de cada amostra foi semeado em meio de cultura Lowenstein Jensen com glicerol e Lowenstein Jensen com piruvato. As mesmas foram incubadas a 37°C por até 120 dias, sendo a presença de crescimento observada semanalmente.

2.4. Ziehl–Neelsen

As amostras isoladas dos cultivos foram identificadas quanto a característica de bacilo álcool ácido resistente (BAAR), onde foi realizado o esfregaço direto das colônias numa lamina, seguido da realização da coloração, empregando-se a fucsina fenicada sob fogo brando por cinco minutos. Em seguida, a descoloração com álcool clorídrico (3%), aplicação do azul de metileno, lavagem com água e visualização através de microscópio ótico comum.

2.5. Extração DNA das amostras de leite

Para a extração de DNA de possíveis *Mycobacterium* spp. presentes no leite foi utilizado o protocolo de extração alcalina descrita por Millar et al. (2000), onde um mililitro da solução de PBST foi adicionada a 100 µl de leite. O material foi agitado em vórtex, centrifugado a 10.000 g por cinco minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em um mililitro de solução alcalina (0,5M de hidróxido de sódio e 0,05 M de citrato de sódio), agitado por 10 minutos e centrifugado a 13.000 g por cinco minutos.

O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 500 µl de Tris-HCl pH8 0,5M e centrifugado a 13.000 g por 5 minutos. Esse passo foi repetido mais uma vez. Em seguida, o pellet foi ressuspensionado em 100 µl de Tris-HCl (10 mM) e EDTA pH8 1 mM, incubado a 100 °C por uma hora e logo depois as amostras foram alocadas em freezer por mais uma hora. Centrifugou-se a 13.000 g por 15 minutos, sendo o sobrenadante removido para utilização como molde para a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

2.6. Extração de DNA do cultivo bacteriano

Como controle positivo das reações da PCR foi utilizado o DNA de um isolado de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Para a extração do DNA a partir do cultivo *M. avium* subsp. *paratuberculosis* que foi utilizado como controle positivo e das amostras isoladas do leite, seguiu-se adaptações dos protocolos descritos por Wade et al. (2005) e AUSUBEL et al. (1989). A amostra foi inativada por calor, deixando-a por 10 minutos a 80°C. Para isso, acrescentou-se uma alçada do cultivo em 300µl de TE (Tris-EDTA). Em seguida, acrescentou-se 70µl de SDS 10%, sendo a amostra

agitada em vortex brevemente para misturar e adicionou-se 100µl de NaCl 5M e 80µl CTAB/NaCl. Incubou-se a amostra a 65°C por 10 min. Após, adicionou-se 700µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizou-se por inversão e a centrifugou a 11.750 g por 5 min. A 1ª fase foi transferida para outro tubo, onde foram acrescentados 450µl de isopropanol e deixou-se descansando overnight. Depois as amostras foram centrifugadas a 11.750 g por 15 min, desprezou-se o sobrenadante, foram acrescentados 500µl de etanol 70% e centrifugou-se a 11.750 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e deixou-se secar por 15 minutos. Em seguida, o pellet foi ressuspensão em 80µl de TE (pH 8,0), colocado à 65°C por 1 h e armazenado a -20°C para utilização como molde de controle positivo para a PCR.

2.7. PCR para detecção de *Mycobacterium* spp.

Para detectar a presença de *Mycobacterium* spp. nas amostras de leite através da técnica de PCR foram utilizados os *primers* Tb11 (-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (CTTGTCGAACCGCATACCCT) descritos por Telenti et al. (1993). Esses *primers* amplificam um fragmento de 439 pb do gene *hsp65*. A PCR foi realizada com um volume final de 20 µl contendo tampão de enzima 1X; 1,25mM de MgCl₂; 0,25 mM de cada dNTP; 0,125 uM de cada primer; 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase e 5µl de DNA genômico. A reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 segundo, anelamento a 60 °C por 1 segundos, e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após os ciclos, o produto foi submetido à extensão final por 10 minutos a 72°C. Em seguida, os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5% e visualizados sobre iluminação ultravioleta (UV).

2.8. Sequenciamento de DNA

Foi realizado o sequenciamento das amostras com resultados positivos na PCR para o gene *hsp65*. Os produtos da PCR foram purificados com utilização de um quite de purificação (Quick Gel Extration & PCR Purification COMBO Kit) e enviadas a uma empresa particular de sequenciamento, onde foram sequenciadas utilizando o sequenciador automático *ABI-PRIM 3100 Genetic Analyzer* através do método de Sanger. Os cromatogramas foram analisados pelo Programa PHRED para verificar a

qualidade das sequências e, sequências com qualidade PHRED acima de 20 foram alinhadas utilizando o Basic Local Align Sequence Tool - BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para identificação segundo gênero ou espécie.

3. Resultados e Discussão

Dentre as 272 amostras de leite de cabra cultivadas, uma (0,4%) apresentou crescimento no meio de cultura Lowenstein Jensen com Piruvato (LJP) após a quarta semana de cultivo. Dentre as outras amostras estudadas, 83,3% (224/272) não apresentaram crescimento e 17,3% (47/272) não foram analisadas até a fase final devido à contaminações. Também no meio LJP foi observado crescimento de colônias com característica de micobactérias em 1,0% (1/105) das amostras de leite bovino (Tabela 1).

Os dois isolados provenientes do leite caprino e bovino foram confirmados como BAAR (bacilo álcool ácido resistente) pela a técnica de Ziehl Neelsen e confirmados como *Mycobacterium* spp. na PCR. Apesar da coloração de Ziehl Neelsen ser muito utilizada na identificação de micobactérias, a mesma apresenta especificidade baixa (VITALE et al., 1998). Por outro lado, a PCR mostra-se altamente específica na identificação dos micro-organismos (FIGUEIREDO et al., 2008), sendo passível de distinção mesmo bactérias com grandes semelhanças genéticas, a exemplo das espécies do complexo *M. tuberculosis* que apresentam 95% de homologia (SREEVATSAN et al., 1997).

Tabela 1: Frequências absoluta e relativa de *Mycobacterium* spp. no leite caprino e bovino, em meio específico adicionando glicerol ou piruvato.

Cultivo	Caprino				Bovino			
	L.J Glicerol		L.J Piruvato		L.J Glicerol		L.J Piruvato	
	F.A.	F.R	F.A.	F.R	F.A.	F.R	F.A.	F.R
Negativo	231	85,0%	224	83,3%	92	87,6%	87	82,8%
Positivo	0	0%	1	0,4%	0	0%	1	1,0%
Contaminação	41	15,0%	47	17,3%	13	12,4%	17	16,2%

L.J= Lowenstein Jensen; F.A= frequência absoluta; F.R= frequência relativa;

No meio de Lowenstein Jensen com glicerol (LJG) não foi visualizado crescimento nas amostras em estudo. As amostras negativas representaram 85% e 87,6% das amostras de caprinos e bovinos, respectivamente. Os contaminantes estiveram presentes em 15% das amostras caprinas e 12,4% nas bovinas (Tabela 1). A presença de glicerol nos meios de cultura favorece o crescimento de *M. tuberculosis* (GRANGE, 1996), enquanto o *M. bovis* tem dificuldade em se desenvolver em meios glicerinados. Assim recomenda-se substituir o glicerol pelo piruvato de sódio para isolar o *M. bovis* (MARCONDES et al., 2006). A utilização do piruvato ou glicerina no meio de cultura diferenciam espécies do complexo *M. tuberculosis*, porém, existe as micobactérias atípicas que podem desenvolver na presença das duas substâncias, o que reforça a importância da realização de outras técnicas que identifiquem espécies específicas.

No Brasil, são escassos trabalhos consistentes que descrevem o cultivo de leite objetivando identificar micobactérias. Apesar da técnica bacteriológica ser considerada o teste "padrão ouro", o diagnóstico da tuberculose nos bovinos e caprinos de leite é baseado nos testes imunológicos, a exemplo de Bombonato et al. (2010), que encontrou prevalência de 1,29% de caprinos positivos no teste da tuberculinização. No sertão paraibano, Pignata et al. (2009) identificaram 0,47% de caprinos positivos ao teste imunoalérgico. Estes dados reforçam a importância da tuberculose caprina em várias regiões do país.

Leite et al. (2003), estudando a prevalência de *M. bovis* e de outras micobactérias em bovinos no Brasil, isolaram 23 cepas de *Mycobacterium* spp. de amostras de leite. Estes foram identificados como *M. fortuitum* (6), *M. gordonae* (6), *M. marinum* (3), *M. kansasii* (1), *M. bovis* (1) e seis não foram identificados quanto à espécie.

Pela técnica de PCR, com extração de DNA direto do leite caprino e bovino, observou-se amplificação em 5/272 (1,8%) das amostras de leite caprino e nenhuma amplificação visualizada nas amostras bovinas (Figura 2). As duas amostras positivas no cultivo bacteriano e confirmadas como micobactérias pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e PCR, não foram diagnosticadas pela a PCR com a extração de DNA direto das amostras de leite. Resultados contraditórios também foram visualizados nas amostras positivas na PCR com extração DNA direto do leite, o que pode estar relacionado à alta sensibilidade da técnica PCR (ICHIYAMA et al., 1997). Da mesma forma também são comuns resultados falso-negativos no cultivo em consequência

das contaminações, quantidade de bactéria na amostra e deficiência no método de isolamento com morte na descontaminação (BALIAN et al., 1997; BOMBONATO et al., 2010).

A PCR baseada na amplificação do gene *hsp65* vem sendo frequentemente empregada na identificação do gênero *Mycobacterium* spp. (BRUNELLO et al., 2001; SAIFI et al. 2012). De acordo com Figueiredo et al. (2008) a análise do leite por técnicas moleculares pode servir de auxílio aos procedimentos microbiológicos e bioquímicos, selecionando animais acometidos por micobactérias e a partir deste grupo reduzido, aplicar técnicas específicas para identificar as micobactérias patogênicas, como por exemplo, a *Restriction Enzyme Analysis* (FIGUEIREDO et al., 2008; MIYATA, 2010).

As duas amostras positivas no cultivo, as cinco amostras identificadas pela a PCR com a extração de DNA direto do leite e o controle positivo, foram submetidas ao sequenciamento de DNA. Os resultados do sequenciamento e detalhamento das amostras encontram-se na tabela 2.

Dentre as sete amostras sequenciadas, uma não apresentou qualidade PHRED acima de 20 e por isso não foi utilizada na análise de alinhamento do BLAST. Em relação às outras seis amostras, três foram confirmadas como espécies do gênero *Mycobacterium* spp. e três de gêneros diferentes, esses micro-organismos foram *Corynebacterium afermentans* subsp. *lipophilum*, *Arthrobacter chlorophenolicus* e *Propionibacterium acnes* (tabela 2). O *C. afermentans* subsp. *lipophilum* e *P. acnes* são citados como causadores de inflamação da próstata e folículos pilosos, respectivamente (DYKHUIZEN et al., 1995; COHEN et al., 2005). *A. chlorophenolicus* é encontrado no solo, e estudos moleculares demonstram que essa espécie está intimamente relacionada a outros gêneros como, por exemplo, as bactérias do complexo *M. tuberculosis* (WESTERBERG et al., 2000). Para Rodriguez et al. (1999) embora várias técnicas de PCR tenham sido desenvolvidas para o diagnóstico das micobactérias, o uso rotineiro destas metodologias requer sequencias altamente específicas para diferenciar de outros micro-organismos com semelhança genica.

Tabela 2: Resultado do sequenciamento de DNA das amostras que apresentaram amplificação do fragmento de parte do gene *hsp65* pb pela técnica de PCR.

Amostras	Espécie	Fonte da Extração do DNA	Primer utilizado	Resultado do alinhamento	Max Score	E-value	Max Ident
Controle	-	Cultivo	Foward	<i>Mycobacterium avium</i>	536	3,00E-149	100%
				<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	536	3,00E-149	100%
				<i>M. avium</i>	339	6,00E-90	100%
			Reverse	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	339	6,00E-90	100%
09	Bovina	Cultivo	Reverse	<i>M. avium</i>	741	0.0	99%
			Foward	<i>M. avium</i>	726	0.0	99%
69	Caprina	Cultivo	Reverse	<i>M. neoaurum</i>	248	7,00E-63	98%
				<i>M. lacticola</i>	248	7,00E-63	98%
			Foward	<i>M. lacticola</i>	725	0.0	99%
				<i>M. neoaurum</i>	708	0.0	99%
124	Caprina	Leite	Reverse	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	516	6,00E-143	90%
				<i>Mycobacterium</i> sp.	438	1,00E-119	87%
				<i>M. gordonae</i>	438	1,00E-119	87%
				Uncultured <i>Mycobacterium</i> sp.	438	1,00E-119	90%
			Foward	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	433	5,00E-118	89%
				<i>Mycobacterium</i> sp.	355	1,00E-94	85%
129	Caprina	Leite	Reverse	<i>Propionibacterium acnes</i>	272	5,00E-70	100%
				<i>Corynebacterium afermentans</i> subsp. <i>lipophilum</i>	272	5,00E-70	100%
138	Caprina	Leite	Foward	<i>M. iranicum</i>	379	4,00E-102	99%
			Reverse	<i>M. iranicum</i>	388	7,00E-105	100%
143	Caprina	Leite	Forward	<i>P. acnes</i>	610	2,00E-171	100%

As análises das sequências de parte do gene *hsp65* da amostra do cultivo leite bovino e o controle positivo, revelaram 100% de homologia com *M. avium* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, respectivamente. A amostra oriunda do cultivo do leite caprino e a amostra obtida pela extração DNA direta do leite caprino (amostra 129), não apresentaram uma clara diferenciação entre as espécies identificadas. Na amostra oriunda do cultivo do leite caprino, o *M. lacticola* só foi diferenciado do *M. neoaurum* quando se considerou o maior escore de similaridade. Corroborando os resultados de Kiska et al. (2004), observaram homologia de 99,5% (2-bp diferença) na região do gene *hsp65* do *M. lacticola* com *M. neoaurum*. Para McNabb et al. (2004), a confiança na identificação de espécies utilizando sequências do gene *hsp65* de um isolado é maior quando a similaridade corresponde a 100%, mas podem ser considerados como referência valores superiores a 97%.

Dentre os micro-organismos identificados, o *M. iranicum*, oriundo de uma amostra de leite caprino é o que apresenta maior repugnância à saúde pública. No mundo, existem oito registros de linhagens de *M. Iranicum* que foram identificados de humanos com quadro clínico de meningite pseudotuberculosis, infecções respiratórias e lesões de pele, esses registros foram realizados no Irã, Itália, Grécia, Holanda, Suécia e Estados Unidos (SHOJAEI et al., 2012; BALAKRISHNAN et al., 2012).

Balakrishnan et al. (2012) sequenciaram parte da região 16S rDNA e do gene *hsp65* de uma cepa bacteriana antes desconhecida, isolada de uma mulher com infecção respiratória grave nos Estados Unidos, e encontraram 100% de similaridade gênica na região 16S rDNA e 99% do gene *hsp65* desta com *M. Iranicum*, corroborando com esta pesquisa. Este é o primeiro caso de identificação de *M. iranicum* no Brasil e também o primeiro relato desta bactéria em produtos de origem animal. Estes micro-organismos de uma forma geral são adquiridos ambientalmente, por habitarem no solo e em ambientes aquáticos, porém com a presença destas micobactérias em produtos de origem animal pode ocorrer um maior potencial de infecção deste aos seres humanos.

Os dados descritos na literatura e os resultados do presente trabalho demonstram que os produtos de origem animal não podem ser reservatórios de micobactérias e representar riscos à saúde pública. E mesmo não sendo identificado nenhuma espécie do complexo *M. tuberculosis* nas amostras de leite caprino e bovino da microrregião de Petrolina-PE, faz-se necessária a realização frequente de levantamentos e pesquisas sobre a possível ocorrência da tuberculose. Pois, além de

casos desta doença em outras regiões do estado de Pernambuco (MELO et al., 2012), dados sobre os hábitos dos consumidores de leite na região de Petrolina-PE apontam que 26,6% das pessoas consomem leite *in natura* (LIRO et al., 2011).

4. Conclusão

Embora não tenha sido identificada nenhuma espécie do complexo *Mycobacterium tuberculosis* no leite caprino e bovino da microrregião de Petrolina, a vigilância epidemiológica e as medidas de prevenção e controle devem ser permanentes. Isto devido à deficiência na utilização de manejo higiênico-sanitário adotado nas propriedades, além do hábito de consumo de produtos de origem animal sem tratamento térmico antes de serem consumidos. Como também foram identificadas bactérias da espécie *M. iranicum*, um agente com grande potencial patogênico em humanos, pela primeira vez identificada no Brasil e em produtos de origem animal.

Referências bibliográficas

ARANAZ A.; COUSINS D.; MATEOS A.; DOMINIGUEZ L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1785–1789, 2003.

AUSUBEL, F.M; BRENT, R; KINGSTON, R.E; MOORE, D.D; SEIDMAN, J.G; SMITH, J.A; STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology. **John Wiley & Sons**, New York, N.Y., USA, 1989.

BALAKRISHNAN, N; TORTOLI, E; ENGEL, S.L; BREITSCHWERDT, E.B. Isolation of a novel strain of *Mycobacterium iranicum* from a woman in the United States. **J. Clin. Microbiol.** doi:10.1128/JCM.02560-12, 2012.

BALIAN, S.C.; RIBEIRO, P.; VASCONCELLOS, S.A; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA NETO, J.S.; GUERRA, J.L.; XAVIER, J.G.; MORAIS, Z.M.; TELLES, M.A.S. Linfadenites tuberculóides em suínos abatidos no Estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n.4, p.391-397, 1997.

BOMBONATO, N.G.; OLIVEIRA, P.R.; LIMA-RIBEIRO, A.M.C. Aspectos epidemiológicos da tuberculose caprina na mesorregião do triângulo mineiro e alto paranaíba, MG. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.3, p.389-384, 2010.

BRAILE, D. M.; GODOY, M. F. Teste de diagnostico – versao 1999. Disponível em:<<http://www.braille.com/pesqciem.htm>>. Acesso em: 12 marco 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. **Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal – PNCEBT**. Brasília-DF, 184p, 2006.

BRUNELLO, F., LIGOZZI, M.; CRISTELLI, E.; BONORA, S.; TORTOLI, E.; FONTANA, R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. **J. Clin. Microbiol.** 39:2799– 2806, 2001.COHEN, R.J; SHANNON, B.A; MCNEAL, J.E; SHANNON, T; GARRETT, K.L; *Propionibacterium acnes* associated with inflammation in radical prostatectomy

specimens: a possible link to cancer evolution. **THE JOURNAL OF UROLOGY**. Vol. 173, 1969–197, June 2005.

CRAWSHAW, T., DANIEL, R., CLIFTON-HADLEY, R., CLARK, J., EVANS, H., ROLFE, S., RUA- DOMENECH, R. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Record**, 163, 127, 2008.

DYKHUIZEN, R.S; DOUGLAS, G; WEIR, J; GOULD I.M . *Corynebacterium afermentans* subsp. *Lipophylum*: multiple abscess formation in brain and liver. *Scand J. Infect. Dis.* 27(6):637-9, 1995.

FIGUEIREDO, E.E.S.; GOLINELLI, L.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. *Mycobacterium bovis* e o Risco da transmissão da tuberculose bovina ao homem através do leite: um problema de saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, p. 33-39, 2007.

FIGUEIREDO, E.E.S; M.G.S; L.S. FONSECA, J.T.S; PASCHOALIN, V.M.F. Detecção do complexo *mycobacterium tuberculosis* no leite pela reação em cadeia da polimerase seguida de análise de restrição do fragmento amplificado (pra). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1023-1033, out./dez. 2008.

GOOD, M; DUIGNAN, A. Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. **Veterinary Medicine International**. GRANGE, J M. The future and the challenge. *Mycobacteria and human disease*. 2nd ed. London, UK: Arnold, 2: 7–10, 1996.

GRANGE, J M. The future and the challenge. *Mycobacteria and human disease*. 2nd ed. London, UK: Arnold, 2: 7–10, 1996.

GUSMÃO, F.A; ALVARENGA, L; BARBOSA, L; LEÃO, S.C; HOFLING-LIMA, A.L; SAMPAIO, J. Deep stromal mycobacterial keratitis: viable bacteria after six months of treatment: case report and literature review. **Arq Bras Oftalmol**, 68(4): 551-3, 2005.

ICHIYAMA, S; ITO, Y; SUGIURA, F; IINUMA, Y; YAMORI, S ; SHIMOJIMA, M ; HASEGAWA, Y ; SHIMOKATA, K; NAKASHIMA, N. **J. Clin. Microbiol.**, 35(12):3082, 1997.

KASSA, G.M; ABEBE, F; WORKU, Y; LEGESSE, M; MEDHIN, G; BJUNE, G. AMENI, G. Tuberculosis in Goats and Sheep in Afar Pastoral Region of Ethiopia and Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from Goat. **Veterinary Medicine International**, doi:10.1155/2012/869146, 2012.

KISKA, D. L., TURENNE, C. Y., DUBANSKY, A. S. & DOMACHOWSKIE, J. B.. First case report of catheter-related bacteremia due to "*Mycobacterium laticola*". **J Clin Microbiol** 42, 2855–2857, 2004.

LEITE, C.Q.F; ANNO, I.S; LEITE, S.R.A; ROXO, E; MORLOCK G.P.; COOKSEY R.C; Isolation and identificativo os Mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98 (3):319-323, 2003.

LIRO, C.V; GRANJA, R.E.P; ZOCHE, F. Perfil do consumidor de leite no vale do rio São Francisco, Pernambuco. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v.12, n.4, p. 718 – 726, 2011.

MARCONDES, A.G; SHIKAMA, M.L.M; VASCONCELLOS, S.A; BENITES, N.R; MORAIS, Z.M; ROXO, E; DIAS, R.A; LEÃO, S.L.P.C; PINHEIRO, S.R; Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium Bovis* em amostras de campo. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006.

MCNABB A, EISLER D, ADIE K, AMOS M, RODRIGUES M, STEPHENS G, BLACK, W.A; ISAAC-RENTON, J. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. **J Clin Microbiol**. Jul;42(7):3000-11, 2004.

MELO, L.E.H; MOTA, R.A; MAIA, F.C.L; FERNANDES, A.C.C; SILVA, T.I.B; LEITE, J.E.B; BAPTISTA FILHO, L.C.F; RAMOS, C.A.N. Ocorrência e caracterização da tuberculose em caprinos leiteiros criados no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(9):831-83, 2012.

MILLAR, B.C; JIRU, X.; MOORE, J.E; EARLE, J.A. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. **J. Microbiol. Methods** 42, 139– 147, 2000

MIYATA, M. Construção de um painel com isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com genes de resistência a quimioterápicos, para o estudo de novas drogas anti-TB. 2010. 119p. **Tese** (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, 2010.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Madison, Revised Edition, 22p., 1999.

PIGNATA, W.A.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; DANTAS, A.F.M.; GOMES, A.A.B.; REMÍGIO, F.R.; LIMA, F.S. Prevalência para tuberculose caprina no semi-árido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(7):526-532, 2009.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.5, p.534-43, 2000

QUINN, J. P.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Mycobacterium* species In: **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, cap. 12, p. 156-69, 1994.

RODRIGUEZ, J.G; FISSANOTI, J.C; DEL PORTILLO, P; PATARROYO, M.E; ROMANO, M.I; CATALDI, A. Amplification of a 500-base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 37: 2330-2332, 1999.

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

SAIFI, M; JABBARZADEH, E; BAHRMAND, A.R; KARIMI, A; POURAZAR, S; FATEH, A; MASOUMI, M; VAHIDI, E. HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. **Clinical Microbiology and Infection**, 10.1111/j.1469-0691, 2012.

SHOJAEI, H; DALEY, C; GITTI, Z; HASHEMI, A; HEIDARIEH, P; MOORE, E.R; DAEI NASER, A; RUSSO, C; VAN INGEN, J; TORTOLI, E. *Mycobacterium iranicum* sp. nov., a rapidly-growing scotochromogenic species isolated from clinical specimens on three different continents. **Int J Syst Evol Microbiol** ijs.0.043562-0, 2012.

SREEVATSAN, S; PAN, X; STOCKBAUER, K. E.; CONNELL, N. D.; KRIESWIRTH, B. N; WHITTAM, T. S; MUSSER, J. M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:9869–9874, 1997.

TELENTI, A; MARCHESI, F; BALZ, M. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 175-178, 1993.

TSCHOPP, R; BOBOSHA, K; ASEFFA, A; SCHELLING, E; HABTAMU, M; IWNETU, R; HAILU, E; FIRDESSA, R; HUSSEIN, J; YOUNG, D; ZINSSTAG, J. Bovine tuberculosis at a cattle-small ruminanthuman interface in Meskan, Gurage region, Central Ethiopia. **Infectious Diseases**, 11:318, 2011.

VITALE, F.; CAPRA, G. ; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Cattle by PCR Using Milk, Lymph Node Aspirates, and Nasal Swabs. **Journal of clinical microbiology**, p. 1050–1055, 1998.

WESTERBERG, A.F; ELVÄNG, A.M.; STACKEBRANDT, E; JANSSON, J.K. *Arthrobacter chlorophenicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. **Int. J. Syst. Evol.**, v.50 n^o.6 2083-2092, 2000.

WILKINS, M.J; MEYERSON, J; BARTLETT, P.C; SPIELDENNER, S.L; BERRY, D.E; MOSHER, L.B; KANEENE, J.B; ROBINSON-DUNN, B; STOBIEFSKI, M.G; BOULTON, M.L; Human *Mycobacterium bovis* Infection and Bovine Tuberculosis Outbreak, Michigan, 1994-2007. **Emerging Infectious Diseases**, 14:657-660, 2008

ZARDEN, C. F. O.; MARASSI, C. D.; CARVALHO, A. C.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LILENBAUM, W. Bacteriological and molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle with inconclusive results to intradermal tuberculin tests. **Epidemiology and Infection**, Available on CJO doi:10.1017/S0950268812002105, 2006.

4. Artigo 2

Micro-organismos isolados de abscessos em carcaças de caprinos e ovinos abatidos no bipolo Petrolina-Juazeiro.

Resumo

Perda na cadeia produtiva dos pequenos ruminantes pela condenação de carcaças é bastante frequente nos matadouros/frigoríficos da região nordeste do Brasil. Objetivou-se com este estudo isolar e identificar agentes em abscessos em caprinos e ovinos inspecionados no *post mortem* no matadouro de Petrolina-PE. Para o cultivo de micobactérias as amostras foram descontaminadas (método de Petrof), cultivadas em meio Lowenstein Jensen (LJ) contendo piruvato ou glicerol. No diagnóstico diferencial, as amostras foram cultivadas em meio Agar Sangue 5%. A identificação molecular de *Mycobacterium* spp. foi realizada com a utilização da técnica de Reação em cadeia de Polimerase (PCR) onde foram utilizados *primers* que amplificam parte do gene *hsp65*. As amostras positivas para micobactérias foram submetidas ao sequenciamento de DNA. As frequências relativas encontrada de abscessos em caprinos e ovinos foram de 5,44% (37/679) e 3,26% (60/1.838), respectivamente. No exame microbiológico, utilizando o meio ágar sangue, observou-se crescimento bacteriano em 87,7% (93/106) das amostras cultivadas. Destes, o *Corynebacterium pseudotuberculosis* representou 67,7% (63/93) dos isolados. Do cultivo em meio LJ foram isolados micobactérias em 1,9% (2/106) das amostras de abscessos e, na PCR com DNA extraído direto das amostras de abscessos, observou-se amplificação em 0,9% (1/106) das amostras. A identificação dos micro-organismos pelo sequenciamento revelou ausência de espécies do complexo *M. tuberculosis* nas amostras com resultados positivos para *Mycobacterium* spp.

Palavras-Chave: Caprinovinocultura de corte, inspeção, micobactérias, isolamento, PCR.

1. Introdução

O rebanho caprino-ovino brasileiro é o maior da América do Sul e o oitavo maior do mundo, com cerca de 27 milhões de cabeças. Sendo a região nordeste a detentora do maior rebanho nacional, onde se encontra cerca de 90% dos caprinos e 51% dos ovinos (IBGE, 2011). Os caprinos e ovinos criados da região semiárida do Brasil, na sua maioria, pertencem a pequenos e médios produtores rurais. O manejo sanitário é deficiente, em virtude do baixo nível de adoção das tecnologias disponíveis ou seus usos inadequados, dificultando a prevenção e controle de doenças (ALENCAR et al., 2010).

Dentre os micro-organismos envolvidos na sanidade dos pequenos ruminantes, as bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* vêm ganhando destaque, principalmente pelas perdas que esses agentes trazem à produção animal e pelos riscos oferecidos à saúde pública (CVETNIC et al., 2007; GUMI et al., 2012). Nos caprinos e ovinos, a tuberculose é causada pelo *M. bovis*, e em menor proporção pelo *M. tuberculosis* e *M. caprae*, (PIGNATA et al., 2009; BEZOS et al., 2010).

Estudos indicam distribuição da tuberculose nos pequenos ruminantes em vários países do mundo (MALONE et al., 2003; PINHEIRO et al. 2007). No Brasil, vários casos de tuberculose foram relatados, sobretudo nos bovinos e caprinos (BAPTISTA et al., 2004; BENESI et al., 2008; PIGNATA et al., 2009). Os animais tuberculosos podem não apresentar sinais clínicos visíveis, mas, quando presente observa-se emagrecimento progressivo e linfonodos periféricos infartados (RIET-CORREA, 2001). Na necropsia, pode ser visualizadas lesões nodulares salientes e difusas, de tamanho variado, com endurecimento num plano mais profundo, coincidindo com áreas de calcificação e de consistência arenosa ou pétreas (MELO et al., 2012).

Porém, as lesões descritas nos achados de necropsia demandam diagnóstico diferencial, pois esses achados podem ser comuns a outras infecções, a exemplo da infecção pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que causa lesões caracterizadas por abscessos com conteúdo amarelo-esverdeado ou branco-amarelado de consistência variando de purulenta a caseosa (SOUZA et al., 2011).

Tendo em vista a escassez de trabalhos sobre a ocorrência da tuberculose caprina e ovina na região de Petrolina-PE e os riscos inerentes a saúde pública, objetivou-se isolar e identificar *Mycobacterium* spp., além de realizar o diagnóstico

diferencial dos agentes causadores de abscessos em caprinos e ovinos inspecionados no *post mortem* no matadouro de Petrolina-PE.

2. Material e Métodos

2.1. Local e coleta

As amostras foram coletadas no matadouro municipal de Petrolina-PE, no período de 10/08 a 04/10/2012. Os animais inspecionados eram oriundos de bipolo Petrolina-PE e Juazeiro-BA.

Foram coletados fragmentos de tecidos com abscessos em linfonodos, pulmão, fígado, útero, baço e outros. Cada amostra foi coletada duas vezes, sendo uma enviada para a histopatologia em formol tamponado a 10% e outra, sobre refrigeração, enviada para análises de microbiologia e molecular. As amostras foram depositadas em tubos coletores, estéreis, previamente identificados e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF.

2.3. Exame histopatológico

Para estudo das lesões microscópicas, os fragmentos dos órgãos com as áreas lesionadas foram desidratados em álcool etílico com concentrações progressivas, diafanizados em xilol, incluídos e emblocados em parafina, cortados em micrótomo a 4 μ m e as lâminas foram coradas com a hematoxilina-eosina (PROPHET et al., 1992) e coração de Ziehl–Neelsen.

2.4. Cultivo de bacteriológico

As amostras foram descontaminadas segundo o método de Petrof (QUINN et al., 1994). A princípio, as amostras foram suspensas em uma solução contendo 0,1 ml de HCl + 100ml de H₂O e deixadas sedimentar a temperatura ambiente por 12 horas. Depois foram adicionados cinco mililitros da amostra em tubo estéril e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500g por 20min. Para descontaminação das amostras, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados cinco mililitros de

NaOH (1M) deixando-se em repouso por 20min. Para neutralização do pH das amostras, foram adicionados mais cinco mililitros de HCl (1M) e as amostras foram novamente centrifugadas a 3500g por 20min. Logo após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e foram adicionados dois mililitros de água destilada estéril à amostra, onde estas foram homogeneizadas. Posteriormente, 0,1ml de cada amostra foi semeada em meios de cultura Lowenstein Jensen com glicerol e Lowenstein Jensen com piruvato. As mesmas foram incubadas a 37°C por até 120 dias, sendo a presença de crescimento observada semanalmente.

Para o diagnóstico diferencial, as amostras foram semeadas com alça de platina em duas placas contendo meio agar sangue com 5% de sangue desfibrinado de ovino, sendo incubadas a 37°C, uma em aerobiose e outra em anaerobiose. As leituras foram realizadas 48 horas após a incubação. As colônias bacterianas isoladas foram estudadas quanto aos aspectos macro e micromorfológicos, bioquímicos e tintoriais (QUINN et al. 1994).

2.5 Extração de DNA

O DNA foi extraído diretamente a partir dos tecidos com abscessos, utilizando o seguinte protocolo. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido e, em seguida 200 mg do tecido macerado foi transferido para um microtubo de 1,5 ml. Oitocentos microlitros de uma solução de extração contendo 50 mM Tris-HCl pH8, 25 mM EDTA, 400 mM NaCl, 100 µl de SDS 10% e 0,2 mg de proteinase K foi adicionados ao tecido macerado no microtubo. Esse material foi homogeneizado e incubado a 65°C por 5 horas.

Após a incubação, o material foi dividido em 2 microtubos de 1,5 ml e foram adicionados 442 µl de NaCl 2M em cada tubo. Os microtubos foram incubados a 4°C por 15 minutos e, em seguida 450 µl de cada tubo foram transferidos para um novo microtubo, onde foram adicionados 50 µl de acetato de sódio (3M). Em seguida, o DNA foi precipitado utilizando 1ml de etanol absoluto gelado. Os tubos foram levemente agitados e centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos. Descartou o etanol. Acrescentou-se 200 µl de etanol 70%. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o etanol 70%. Deixou-se os microtubos secar por 15 min; e, em seguida o material foi ressuscitado em 500 µl de TE e colocado em overnight.

Quinhentos microlitros de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram adicionados ao material e os tubos agitados por inversão. Depois foram centrifugados a 1700 g por 10 minutos e, a primeira fase do material foi coletada e colocada em outro microtubo novo. O DNA foi precipitado utilizando 1ml de etanol absoluto gelado. Os tubos foram levemente agitados e centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos. O etanol foi descartado. Acrescentou-se 200 µl de etanol 70%. Centrifugou-se a 14000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o etanol 70%. Deixou-se os microtubos secar por 15 min. Ao final o DNA foi ressuscitado em 50 µl de TE +2,5 µl Rnase e deixado 20 min em banho seco a 37C.

Amostras com resultado positivo no exame microbiológico (em meio Lowenstein Jensen), tiveram o DNA extraído direto do cultivo bacteriano utilizando a seguinte metodologia. A amostra foi inativada por calor, deixando-a por 10 minutos a 80°C. Para isso, acrescentou-se uma alçada do cultivo em 300µl de TE (Tris-EDTA). Em seguida, acrescentou-se 70µl de SDS 10%, sendo a amostra agitada em vortex brevemente para misturar e adicionou-se 100µl de NaCl₂ 5M e 80µl CTAB/NaCl. Incubou-se a amostra a 65°C por 10 min. Após, adicionou-se 700µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizou-se por inversão e a centrifugou a 11.750 g por 5 min. A 1ª fase foi transferida para outro tubo, onde foram acrescentados 450µl de isopropanol e deixou-se descansando overnight. Depois as amostras foram centrifugadas a 11.750 g por 15 min, desprezou-se o sobrenadante, foram acrescentados 500µl de etanol 70% e centrifugou-se a 11.750 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e deixou-se secar por 15 minutos. Em seguida, o pellet foi ressuscitado em 80µl de TE (pH 8,0), colocado à 65°C por 1 h e armazenado a -20°C.

Para verificar a qualidade do DNA extraído, o mesmo foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

2.6. PCR para detecção de *Mycobacterium spp.*

A presença de *Mycobacterium spp.* nas amostras de abscessos e nas amostras derivadas do cultivo microbiológico foi detectada através da técnica de PCR, foram utilizados os *primers* Tb11 ('-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (CTTGTCGAACCGCATAACCCT) descritos por Telenti et al. (1993). Esses *primers* amplificam um fragmento de 439 pb do gene hsp65. A PCR foi realizada com um

volume final de 20 µl contendo tampão de enzima 1X; 1,25mM de MgCl₂; 0,25 mM de cada dNTP; 0,125 uM de cada primer; 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase e 5µl de DNA genômico. A reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento, a 60 °C por 1 minuto, e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após os ciclos, o produto amplificado foi submetido à extensão final por 10 minutos a 72°C. Em seguida, os produtos de amplificação foram analisados em gel agarose 1,5% e visualizados sobre iluminação ultravioleta (UV).

2.7. Sequenciamento do DNA

Amostras com resultado positivo na PCR foram sequenciadas. Para isso, os produtos da PCR foram purificados com Kit de purificação (Quick Gel Extration & PCR Purification COMBO Kit) e enviadas a uma empresa particular, onde foram sequenciadas utilizando o sequenciador automático *ABI-PRIM 3100 Genetic Analyzer* através do método Sanger.

Os cromatogramas foram analisados pelo programa PHRED para verificar a qualidade das sequências e, sequências com qualidade PHRED acima de 20 foram alinhadas utilizando o Basic Local Align Sequence Tool - BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para identificação segundo gênero ou espécie.

3. Resultados e Discussão

No período de coleta foram inspecionados 2.517 animais, destes, 679 (27%) foram caprinos e 1.838 (73%) ovinos. Do total de animais examinados no *post mortem*, 97 (3,85%) apresentavam lesões visíveis caracterizadas por abscessos em órgãos internos (destes, nove apresentaram abscessos em mais de um órgão). A frequência relativa de abscessos encontradas nos caprinos foi superior quando comparado com os ovinos, com 5,44% (37/679) e 3,26% (60/1.838), respectivamente (tabela 1).

Resultado semelhante foi encontrado por Andrade et al. (2012) avaliando abscessos presentes nos linfonodos de caprinos e ovinos oriundos das microrregiões de Piancó e Itaporanga, no sertão paraibano. A alta frequência de lesões com abscessos nos pequenos ruminantes criados na região semiárida do Brasil pode ser

explicada pela precária utilização das técnicas de manejo sanitário, além de fatores locais como a presença de inúmeras plantas cactáceas que causam ferimentos na pele dos animais (PINHEIRO et al. 2000; LANGENEGGER et al. 1991).

Tabela 1: Distribuição de caprinos e ovinos inspecionados no *post mortem* e frequência (freq.) absoluta e relativa de animais com abscessos por espécies, Petrolina-PE.

Animais	Nº de animais inspecionados	Animais c/ Abscessos	
		Freq. absoluta	Freq. Relativa (%)
Caprinos	679	37	5,44
Ovinos	1.838	60	3,26
Total	2.517	97	3,85

A tabela 2 apresenta a distribuição dos abscessos por órgãos e os micro-organismos isolados segundo o cultivo em meio ágar sangue. Observou-se que o pulmão e o fígado apresentaram maior frequência de abscessos no exame *post mortem*.

Melo et al. (2012), estudando caprinos com doença respiratória no estado de Pernambuco observaram na necropsia 71% e 29% de alterações em pulmão e fígado, respectivamente. As lesões granulomatosas no trato respiratório dos pequenos ruminantes vêm sendo encontradas com alta frequência e podem apresentar-se como a principal fonte de contaminação no rebanho através da produção de aerossóis infectados (BAIRD & FONTAINE, 2007, FONTAINE & BAIRD, 2008). Essas lesões também podem ser encontradas em linfonodos mesentéricos, linfonodos submandibulares, baço, serosas, útero e outros órgãos (NEILL et al., 1994; BENESI et al., 2008).

No cultivo em meio ágar sangue, realizado para o diagnóstico diferencial das infecções por micobactérias, foram isoladas bactérias em 93/106 das amostras cultivadas e em 13/106 não houve crescimento bacteriano (tabela 2). Destes isolados, o *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi o agente mais frequente, sendo encontrado em 67,7% (63/93) das amostras com exame bacteriológico positivo, seguido por *Bacillus* em 12,9% (12/93), *Staphylococcus* spp. em 5,4% (5/93), *Pseudomonas* spp. em 6,5% (6/93), *Micrococcus* spp. em 3,2% (3/93), *Edwardsiella* spp. em 3,2% (3/93) e *Shigella* spp. foi encontrada em 1,1% (1/93) das amostras avaliadas.

Tabela 2: Distribuição de micro-organismos por órgãos, isolados de abscessos em meio ágar sangue, no matadouro municipal de Petrolina-PE, 2012.

Orgãos	<i>C. pseudotuberculosis</i>		<i>Bacillus</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		<i>Pseudomonas</i> spp.		<i>Micrococcus</i> spp.		<i>Edwardsiella</i> spp.		<i>Shigella</i> spp.		Não houve isolamento		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Pulmão	29	74,4	4	10,2	0	0,0	1	2,6	1	2,6	0	0,0	0	0,0	4	10,2	39	36,8
Fígado	16	43,2	4	10,8	3	8,1	2	5,4	2	5,4	3	8,1	1	2,7	6	16,2	37	34,9
Traquéia	4	66,7	2	33,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	6	5,7
Linf. Esofagiano	4	80,0	1	20,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	4,7
Linf.	1	20,0	1	20,0	2	20,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	20,0	5	4,7
Mesentérico																		
Baço	3	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	2,9
Linf.	1	50,0	0	0,0	0	0,0	1	50,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	1,9
Retrofaringeano																		
Diafragma	1	50,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	50,0	2	1,9
Linf. Mediastino	1	50,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	50,0	2	1,9
Linf. Costelas	2	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	1,9
Útero	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,94
Rim	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,94
Medula	1	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,94
Total	63	59,4%	12	11,3%	5	4,7%	6	5,7%	3	2,8%	3	2,8%	1	0,9%	13	12,3%	106	100%

Linf. = linfonodo

. O *C. pseudotuberculosis* é responsabilizado pela linfadenite caseosa nos pequenos ruminantes. Vários estudos evidenciam a ocorrência desta doença em caprinos e ovinos da região nordeste do Brasil (ANDRADE et al., 2012; ALENCAR et al., 2010; PINHEIRO et al. 2000), nosso estudo corrobora os demais. Resultado semelhante também foi encontrado por SOUZA et al. (2011), quando cultivaram amostras de linfonodos infartados e isolaram o *C. pseudotuberculosis* em 74,5% das amostras. Estes resultados demonstram a importância da linfadenite caseosa na criação de pequenos ruminantes criados na região semiárida do Brasil e a caracteriza como sendo a principal causa de condenação de carcaças e vísceras no matadouro municipal de Petrolina.

No diagnóstico bacteriológico, utilizando meio específico (Lowenstein Jensen com glicerol ou piruvato) para *Mycobacterium* spp., foram isoladas colônias bacterianas em 1,9% (2/106) das amostras, que foram caracterizadas como bacilo álcool ácido resistente (BAAR) e confirmadas como *Mycobacterium* spp. pela PCR, realizadas com DNA obtidos pela extração direta dos cultivos. Os dois isolados foram oriundos de abscessos retirados de linfonodos da região do fígado de um caprino e esôfago de um ovino. Esses isolados foram visualizados depois da quarta semana de cultivo no meio Lowenstein Jensen com piruvato de sódio.

Os resultados do diagnóstico pela PCR convencional realizada com o DNA extraído direto das amostras de abscessos mostraram amplificação de parte do gene *hsp65* em apenas uma amostra (1/106), sendo esta oriunda de abscesso na região da costela de um ovino. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Kassa et al.(2012) que reportaram baixa prevalência de *Mycobacterium* spp. no tecido de cabras e ovelhas abatidas na Etiópia. O teste bacteriológico e de PCR com DNA extraído direto dos abscessos apresentaram resultados contraditórios, sendo que as amostras positivas no bacteriológico foram negativas na PCR. Para Michel et al. (2010) a presença de inibidores da PCR em amostras clínicas, podem justificar resultados falso-negativos diagnosticados pela técnica.

O sequenciamento de parte do gene *hsp65* das amostras obtidas dos cultivos demonstrou que as sequências apresentam 97% de homologia com *M. novocastrense*. A amostra positiva pela PCR com DNA extraído direto dos abscessos não apresentou qualidade PHRED acima de 20 e não foi utilizada na análise de alinhamento do BLAST. O envolvimento *M. novocastrense*. na saúde dos pequenos ruminantes ainda é desconhecido. Em humanos, o *M. novocastrense* já foi isolado de

lesões granulomatosas e identificado pelo sequenciamento da região 16S rRNA (SHOJAE et al., 1997).

Na análise histopatológica das três amostras positivas para micobactérias no cultivo ou PCR foram visualizadas áreas de deposição de sais de cálcio rodeadas por uma área de necrose com grandes colônias (características da linfadenite caseosa) e ausência de bacilo álcool ácido resistente pela coloração de Ziehl Neelsen (Figura 1), sendo um indicativo de que o *C. pseudotuberculosis* possa ser o grande responsável pelas lesões visualizadas nestas amostras. Para Souza et al. (2011) as lesões histológicas dos tecidos com área de necrose central formada por lamelas concêntricas, com presença de grandes colônias bacterianas e focos de mineralização, rodeada por uma faixa de infiltrado inflamatório com macrófagos são comuns em lesões de *C. pseudotuberculosis*, mas não patognomônicas, pois podem ser confundidas com lesões causadas por outros organismos piógenos e com tuberculose.

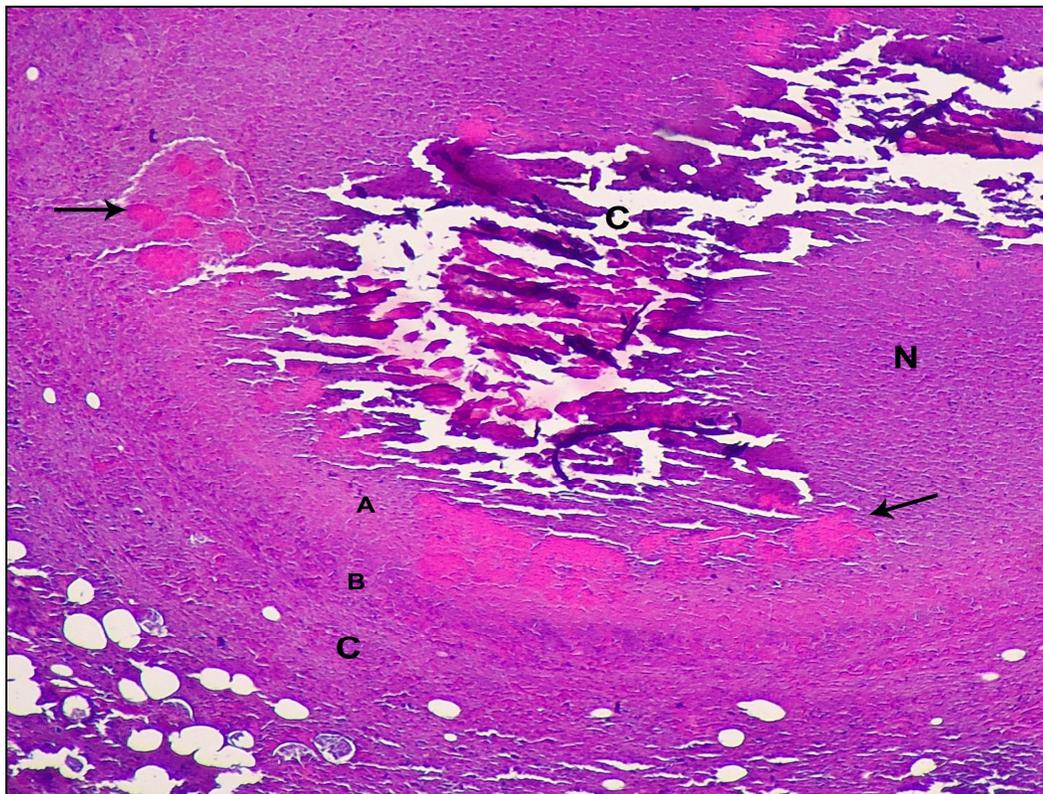


Figura 1: Lesão de linfadenite caseosa. No centro observa-se uma área de deposição de sais de cálcio (C) rodeada por uma extensa área de necrose (N). Dentro da área de necrose observam-se grandes colônias (setas), características da doença. A área de necrose é rodeada por células inflamatórias dispostas em camadas (A, B e C) e na periferia observa-se tecido linfóide.

No Brasil, estudos a cerca dos casos de tuberculose em caprinos não são raros (BENESI et al., 2008; MELO et al., 2012), por outro lado, não existe nenhum caso de tuberculose descrita nos ovinos. Neste estudo, nenhum agente do complexo *M. tuberculosis* foi encontrado, por outro lado, o *C. pseudotuberculosis* aparece com alta frequência nos casos de lesões macroscópicas em vísceras e carcaças dos pequenos ruminantes do bipolo Petrolina-Juazeiro.

4. Conclusão

Os resultados revelaram que os caprinos são bastante susceptíveis às infecções responsáveis pela formação de abscessos em vísceras e carcaças, principalmente no pulmão e fígado.

Nenhuma espécie do complexo *M. tuberculosis* foi encontrada nos caprinos e ovinos, porém, o *C. pseudotuberculosis*, causador da linfadenite caseosa nos pequenos ruminantes, foi o principal agente responsável pela formação de lesões caracterizadas por abscessos em caprinos e ovinos abatidos no matadouro municipal de Petrolina-PE.

Quanto as *M. novocastrense* isoladas das amostras, serão necessários novos estudos para conhecer o possível envolvimento destes micro-organismos nas lesões granulomatosas dos pequenos ruminantes.

Referências bibliográficas

- ALENCAR, S.P; MOTA, R.A; COELHO, M.C.O.C; NASCIMENTO, S.A; ABREU, S.R.O; CASTRO, R.S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 131-140, 2010.
- ANDRADE J.S.L; AZEVEDO S.S; TELES J.A.A; HIGINO S.S.S; AZEVEDO E.O. Ocorrência e fatores de risco associados a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(2):116-120, 2012
- BAIRD, G.J., FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J. Comp. Pathol.** v.137, p. 179–210, 2007.
- BAPTISTA, F; MOREIRA, E.C; SANTOS, W.L.M; NAVEDA, L.A.B. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. **Arq. bras. med. Vet. Zootec.**, 56(5):577-580, 2004.
- BENESI , F.J.; PINHEIRO, S.R.; MAIORKA, P.C.; SAKAMOTO, S.M; ROXO, E; BENITES, N.R; BIRGEL JUNIOR, E.H; GREGORY, L. Relato de caso: tuberculose em caprino (*capra hircus*). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.75, n.2, p.217-220, abr./jun., 2008.
- BEZOS, J; JUAN, L; ROMERO, B; ÁLVAREZ, J; MAZZUCHELLI, F; MATEOS, A; DOMIINGUEZ, L; ARANAZ, A. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 133 269–275, 2010.
- CVETNIC, Z., KATALINIC-JANKOVIC, V., SOSTARIC, B., SPICIC, S., OBROVAC, M., MARJANOVIC, S., BENIC, M., KIRIN, B.K., VICKOVIC, I. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, 11, 652–658, 2007.
- FONTAINE, M.C., BAIRD, G.J. Caseous lymphadenitis, **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 42-48, 2008.

GUMI, B.; SCHELLING, E.; BERG, S.; FIRDESSA, R.; ERENDO, G.; MEKONNEN, W.; HAILU, E.; MELESE, E.; HUSSEIN, J.; ASEFFA, A.; ZINSSTAG, J. Zoonotic Transmission of Tuberculosis Between Pastoralists and Their Livestock in South-East Ethiopia. **EcoHealth** 9, 139–149, 2012.

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Produção da Pecuária municipal**. Rio de Janeiro, v. 39, p.1-63, 2011.

KASSA, G.M; ABEBE, F; WORKU, Y; LEGESSE, M; MEDHIN, G; BJUNE, G. AMENI, G. Tuberculosis in Goats and Sheep in Afar Pastoral Region of Ethiopia and Isolation of Mycobacterium tuberculosis from Goat. **Veterinary Medicine International**, doi:10.1155/2012/869146, 2012.

LANGENEGGER, J., LANGENEGGER, C.H., SCHERER, P.O. Prevalência e diagnóstico comparativo da linfadenite caseosa em caprinos do Estado do Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 11:31-34, 1991.

MALONE, F. E.; WILSON, E. C.; POLLOCK, J. M.; SKUCE, R. A. Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle, **Journal Veterinary Medical**, v. 50, p. 500 - 504, 2003.

MELO, L.E.H; MOTA, R.A; MAIA, F.C.L; FERNANDES, A.C.C; SILVA, T.I.B; LEITE, J.E.B; BAPTISTA FILHO, L.C.F; RAMOS, C.A.N. Ocorrência e caracterização da tuberculose em caprinos leiteiros criados no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(9):831-83, 2012.

MICHEL, A.L; MÜLLER, B; VAN HELDEN, P.D. *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not?. **Veterinary Microbiology**, 140, 371–381, 2010.

NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. PATHOGENESIS OF Mycobacterium bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, n. 40, p.41-52, 1994.

PIGNATA, W.A.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; DANTAS, A.F.M.; GOMES, A.A.B.; REMÍGIO, F.R.; LIMA, F.S. Prevalência para tuberculose caprina no semi-árido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(7):526-532, 2009.

PINHEIRO, R.R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.52, n.5, p.534-543, 2000.

PINHEIRO, S.R.; ROXO, E.; ALMEIDA, C.A.S, VASCONCELLOS, S.A.; SILVANTOS, M.C.; MAIORKA, P.C.; MELVILLE, A.M.P.; BENITES, N.R.; PAES, A.C. Surto de tuberculose em caprinos (*Capra hircus*): relato de caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 13., 2007.,

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRIGTON, J.B. AFIP Laboratory Methods in Histotechnology. **Washington: American Registry of Pathology**, 278p, 1992.

QUINN, J. P.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Mycobacterium* species In: **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, cap. 12, p. 156-69, 1994.

RIET-CORREA, F; SCHILD, A.L; MENDEZ, M.C; LEMOS, R.A.A. Doenças de Ruminantes e Eqüinos. 2ª ed. Varela, São Paulo. Vol 1, 425p, 2001.

SHOJAE, H; GOODFELLOW, M; MAGEE, J.G; FREEMAN, R; GOULD, F.K; BRIGNALL, C.G. *Mycobacterium novocastrense* sp. nov., a Rapidly Growing Photochromogenic Mycobacterium. **International journal of systematic bacteriology**, p. 1205-1207, 1997.

SOUZA, M.F; CARVALHO, A.Q; GARINO, J.R.F; RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(3):224-230, 2011.

TELENTI, A; MARCHESI, F; BALZ, M. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 175-178, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.F.C; SOARES, C.O; ARAÚJO, F.R; Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico. Brasília: **Embrapa informação tecnológica**, p.45-80, 2004.

ÁLVAREZ, J., DE JUAN, L., BEZOS, J., ROMERO, B., SÁEZ, J.L., REVIRIEGO GORDEJO, F.J., BRIONES, V., MORENO, M.A., MATEOS, A., DOMÍNGUEZ, L., ARANAZ, A. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. **Veterinary Microbiology** 128, 72–80, 2008.

ANDERSON, W.; KING, J. M. Mycobacterium avium infection a pygmy goat. **The Veterinary Record**, v. 133, n. 20, p. 502, 1993.

ANDRADE, G.B., RIET-CORREA, F., MIELKE, P.V. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq Vet Bras**, v.11, n.3/4, p.81-86, 1991.

AYELE, W. Y.; NEILL, D.; ZINSSTAG, J.; WEISS, M.G.; PAVLIK, I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **INT J TUBERC LUNG DIS** 8(8):924–937, 2004.

BALAKRISHNAN, N., TORTOLI, E., ENGEL, S.L., BREITSCHWERDT, E.B. Isolation of a novel strain of *Mycobacterium iranicum* from a woman in the United States. **J. Clin. Microbiol.** doi:10.1128/JCM.02560-12, 2012.

BALAKRISHNAN, N; TORTOLI, E; ENGEL; S.L; BREITSCHWERDT, E.B. Isolation of a novel strain of *Mycobacterium iranicum* from a woman in the United States. **J. Clin. Microbiol.** doi:10.1128/JCM.02560-12, 2012.

BARNES, A.I; ROJO, S; MORETTO, H. Prevalencia de micobacteriosis y de tuberculosis en pacientes de un hospital de referencia de la provincia de Córdoba. *Rev Argent Microbiol* 36(4): 170-3, 2004.

BARTON , M.D.; ACLAND, H.M. Mycobacterium avium serotyp2 infection in a sheep. *Australian Veterinary Journal*, v.49, n.4, p.212-213, 1973.

BENESI , F.J.; PINHEIRO, S.R.; MAIORKA, P.C.; SAKAMOTO, S.M; ROXO, E; BENITES, N.R; BIRGEL JUNIOR, E.H; GREGORY, L. Relato de caso: tuberculose

em caprino (*capra hircus*). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.75, n.2, p.217-220, abr./jun., 2008.

BERNABÉ, A.; GÓMEZ, M.A.; NAVARRO, J.A. ; GÓMEZ, S.; SÁNCHEZ, J.; SIDRACH, J.; MENCHEN, V.; VERA, A.; SIERRA, M.A. Morphopathology of caprine tuberculosis. I. Pulmonary Tuberculosis. ***Annales de Veterinária de Murcia***, v.6/7, p.9-20,1991.

BEZOS, J; JUAN, L; ROMERO, B; ÁLVAREZ, J; MAZZUCHELLI, F; MATEOS, A; DOMIINGUEZ, L; ARANAZ, A. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. ***Veterinary Immunology and Immunopathology***, 133 269–275, 2010.

BIBERSTEIN, E.; HIRSH, D.C. Espécies de *Mycobacterium*: os agentes da tuberculose animal. In: HIRTSH, D.C. & ZEE, Y.C. Microbiologia veterinária. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.149-154, 2003.

BLOOD, D.C; RADOSTIS, O.M. Disease caused by mycobacteria— IV. In: ***Veterinary Medicine***. 7th ed. London, UK: Bailliere Tindall, 7: 710–740, 1989.

BODDINGHAUS, I., ROGALL, T., FLOHR, T., BLOCKER, H., BOTTGER, E.C. Detection and identification of *Mycobacteria* by amplification of rRNA. ***J. Clin. Microbiol.*** 28: 1751-1759, 1990.

BOMBONATO, N.G.; OLIVEIRA, P.R.; LIMA-RIBEIRO, A.M.C. Aspectos epidemiológicos da tuberculose caprina na mesorregião do triângulo mineiro e alto paranaíba, MG. ***Arq. Inst. Biol.***, São Paulo, v.77, n.3, p.389-384, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. **Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal – PNCEBT**. Brasília-DF, 184p, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de defesa agropecuária. **Manual de legislação: programa nacional de saúde animal do Brasil**. Brasília-DF, 440p, 2009.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica**. 6. ed. rev. e ampl. . Brasília-DF, 15p, 2002.

BRUNELLO, F., LIGOZZI, M.; CRISTELLI, E.; BONORA, S.; TORTOLI, E.; FONTANA, R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. **J. Clin. Microbiol.** 39:2799– 2806, 2001.

CARDONA-CASTRO, N., RESTREPO-JARAMILLO, S., GIL DE LA OSSA, M., BRENNAN, P. Infection by *Mycobacterium leprae* of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post-elimination leprosy region of Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 100: 703-707, 2005.

CHIODINI R.J. & ROSSITER C.A. Paratuberculosis: a potential zoonosis. **Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.** 12(2):457-467. 1996.

COLLINS, D.M.; & STEPHENS, D.M. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 83:11–16, 1991.

COLLINS, D.M; STEPHENS, D.M. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. **FEMS Microbiology Letters**, V. 67, p. 11-15, 1991.

CORDES, D.O.; BULLIANS, J.A.; LAKE, D.E.; CARTER, M.E. Observations on tuberculosis caused by *mycobacterium bovis* in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, v.29, n.4, p.60-62, 1981.

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

CORRÊA W.M. E CORRÊA C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos** – Tuberculose. 2ª ed. Editora médica e científica, Rio de Janeiro, p. 317 a 337, 1992.

COSIVI, O; GRANJE, J.M; DABORIN, C. J; RAVIGLIONE, M,C; FUGIKURA, T; COUSINS, D.;ROBINSON, R.A; HUCHZERMEYER, H.F.A.K; KANTOR, I; MESLIN, F.X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobactererium bovis* in developing coutries. **Emerging Infections Diseases**, v.4, n.1, p.59-70, 1998.

COSTA A.R.F, LOPES, M.L;BAHIA, J.R.C; CONCEIÇÃO, E.C. LIMA, K.V.B. *Identificação genotípica de membros do complexo Mycobacterium avium. Rev Pan-Amaz Saude, 1(3):35-42, 2010.*

COSTA, J.C.M; PIERI, F.A; SOUZA, C.F; ESPESCHIT, I.F; FELIPPE, A.G; SANTOS, G.M; TOBIA, F.L; SILVA JUNIOR, A; MOREIRA, M.A.S. Levantamento sorológico de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* em bovinos leiteiros no estado do Espírito Santo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.6, p.1491-1494, 2010.

COUSINS, D. V.; WILTON, S. D.; FRANCIS, B. R. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. **Vet. Microbiol.** 27:187–195, 1991.

COUSINS, D.V; HUCHZERMEYER, H.F.K.A; GRIFFIN, J.F.T; BRÜCKNER, G.K; VAN RENSBURG, I.B.J; KRIEK, N.P.J. Tuberculosis. p.1973-1993. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. Vol.3. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town, 2004.

CRAWSHAW, T., DANIEL, R., CLIFTON-HADLEY, R., CLARK, J., EVANS, H., ROLFE, S., RUA- DOMENECH, R. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Record**, 163, 127, 2008.

CVETNIC, Z., KATALINIC-JANKOVIC, V., SOSTARIC, B., SPICIC, S., OBROVAC, M., MARJANOVIC, S., BENIC, M., KIRIN, B.K., VICKOVIC, I. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, 11, 652–658, 2007.

DACORSO FILHO, P., CAMPOS, I.O.N., FARIA, J.F., LANGENEGGER, J. Doença de Johne (paratuberculose) em bovinos nacionais. *Arqs. Inst. Biol. Animal*. Rio de Janeiro, 3, p. 129 – 139, 1960.

DANKNER, W. M; WAECKER, N. J; ESSEY, M. A; MOSER, K; THOMPSON, M; DAVIS, C. E. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. **Medicine** 72:11–37, 1993.

DAVIDSON, R.M.; ALLEY, M.R.; BEATSON, N.S. Tuberculosis in a flock of sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, v.29, n.1/2, p.1-2, 1981.

DE LA RUA-DOMENECH R., GOODCHILD A. T., VORDERMEIER H. M., HEWINSON R. G., CHRISTIANSEN K. H., CLIFTON-HADLEY R. S. 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, 190–210, 2006.

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

DEVALLOIS, A.; GOH, K.; RASTOGI, N.; Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **J. Clin. Microbiol.** 35, 2969–2973, 1997.

DOMINGUES P. F. & LANGONI, H. **Manejo Sanitário Animal.** 1ª ed. Rio de Janeiro: EPUB, 210p, 2001.

DRIEMEIER. D. CRUZ, C.E.F., GOMES, M.J.P., CORBELLINI, L.G., LORETTI, A.P., COLODEL, E.M. Aspectos Clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 19, n. ° 3/4, p. 109 – 115, 1999.

DUARTE, L.F.C. Investigação de *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos no município de Feira de Santana, Bahia. 2010. 61p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, 2010.

DUSZA, M; PODLASIN, RB; BURATOWSKA, J; LATARSKA-SMUGA, D; BŁASIŃSKA-PRZERWA, K; PTAK, J. Disseminated tuberculosis in HIV-infected person. Diagnostic and therapeutic challenges – case report. **HIV & AIDS review**, vol.8, n.4 2009.

DUFFIELD, B. J.; YOUNG, D. A. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 193-197, 1985.

DVORSKA, L; MATLOVA, L; BARTOS, M; PARMOVA, I; BARTL, J; SVASTOVA, P; BULL, T.J; PAVLIK, I. Study of *Mycobacterium avium* compl strains isolated from cattle in the czech republic between 1996 and 2000. **Veterinary Microbiology**, v. 99,p.239-250, 2004.

FIGUEIREDO, E.E.S. Molecular techniques for identification of species of the mycobacterium tuberculosis complex: the use of multiplex PCR and an adapted HPLC method for identification of *Mycobacterium bovis* and diagnosis of bovine tuberculosis. In: Cardona P-J, ed. Understanding Tuberculosis – Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis. **Publisher InTech**, p. 411–432. doi:10.5772/1483, 2012.

FIGUEIREDO, E.E.S; M.G.S; L.S. FONSECA, J.T.S; PASCHOALIN, V.M.F. Detecção do complexo *mycobacterium tuberculosis* no leite pela reação em cadeia da polimerase seguida de análise de restrição do fragmento amplificado (pra). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1023-1033, out./dez. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO [2008]. **Live animals**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org> > Acesso em: 11/09/2012. [[Links](#)]

FREITAS, D., ALVARENGA, L., SAMPAIO, J., MANNIS, M., SATO, E., SOUSA, L., VIEIRA, L., YU, M.C., MARTINS, M.C., HOFLING-LIMA, A., BELFORT. R.JR. An outbreak of mycobacterium chelonae infection after LASIL. **Ophthalmology** 110:276-285, 2003.

GARCÍA-CÍA, J.I; ESTEBAN, J. Infecciones osteoarticulares por micobacterias en un hospital universitario. *Enferm Infec Microbiol Clín*, 24(10): 661, 2006.

GARRITY, G.M, BELL, J.A, LILBURN, T.G. **Taxonomic outline of the prokaryotes: Bergey's manual of sistemac bacteriology**. 2ª ed, Elsevier, Doi 10.1007/bergeysoutline200405, 2004.

GORTÁZAR, C., VICENTE, J., SAMPER, S., GARRIDO, J.M., FERNÁNDEZ-DE-MERA, I.G., GAVIN, P., JUSTE, R.A., MARTÍN, C., ACEVEDO, P., DE LA PUENTE, M., HOFLE, U. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. **Veterinary Research** 36, 43–52, 2005.

GRANGE, J M. The future and the challenge. *Mycobacteria and human disease*. 2nd ed. London, UK: Arnold, 2: 7–10, 1996.

GUMI, B.; SCHELLING, E.; BERG, S.; FIRDESSA, R.; ERENDO, G.; MEKONNEN, W.; HAILU, E.; MELESE, E.; HUSSEIN, J.; ASEFFA, A.; ZINSSTAG, J. Zoonotic

Transmission of Tuberculosis Between Pastoralists and Their Livestock in South-East Ethiopia. **EcoHealth** 9, 139–149, 2012.

GUSMÃO, F.A; ALVARENGA, L; BARBOSA, L; LEÃO, S.C; HOFLING-LIMA, A.L; SAMPAIO, J. Deep stromal mycobacterial keratitis: viable bacteria after six months of treatment: case report and literature review *Arq Bras Oftalmol*, 68(4): 551-3, 2005.

HARRIS, N.B., BARLETTA, R.G. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in veterinary medicine. **Clin. Microbiol.** 14(3):489-512, 2001.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATHM, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th edn. Baltimore, MD: Williams and Williams, (1994).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE [2010]. **Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias - Brasil - 2009-2010**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br> > acesso em: 11/09/2012.

Instituto brasileiro de geografia e estatística – IBGE . **Produção da Pecuária municipal**. Rio de Janeiro, v. 39, p.1-63, 2011.

JARDIM, G.C.; PIRES, P.P; MATHIAS, L.A; RIBEIRO, O.C; KUCHEMUCK, M.R.G. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesq. Vet. Bras.** 26(3):177-182, jul./set. 2006.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Veterinary pathology*. 6 ed. São Paulo: **Manole**, p. 502-503, 2000.

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

KATOCH, V.M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian J. Med. Res.** 120(4):290-304, 2004.

KISKA, D. L; TURENNE, C.Y; DUBANSKY, A.S; DOMACHOWSKIE, J. B. First Case Report of Catheter-Related Bacteremia Due to “*Mycobacterium lacticola*”. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, p. 2855–2857, 2004.

KONEMAN, E. W. Micobactérias. In: KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JONDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C. **Diagnóstico microbiológico** – texto e atlas colorido. Washington: C. Winn Jr., p.903–954, 2001.

KORMENDY, B; KOPÁL, T; BÁLINT, T; SZILÁGYI, M; BÉKI, L. Economic losses caused by paratuberculosis in a dairy herd: case report. **Acta Vet. Hung.** 37:45-53, 1989.

KRUZE, J.; SALGADO, M.; PAREDES, H; MELLA, A.; COLLINS, M.T. Goat paratuberculosis in Chile: first isolation and confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in a dairy goat. **J Vet Diagn Invest**, 18:476–479, 2006.

LECHTENBERG, K. F.; NAGARAJA, T. G.; CHENGAPPA, M. M. Antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium necrophorum* isolated from bovine hepatic abscess. **America Journal Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 44-47, 1998.

LE MOS, R.A.A. Brucelose bovina, tuberculose bovina. Qualificação rural 4. UFMS, 112p, 2006.

LIÉBANA, E., ARANAZ, A., URQUIA, J.J., MATEOS, A., DOMÍNGUEZ, L. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. **Australian Veterinary Journal** 76, 50–53, 1998.

LOBUE, P.A., ENARSON, D.A., THOEN, C.O., 2010. Tuberculosis in humans and animals: an overview. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, 14, 1075–1078, 2010.

LORES, E.F; WEIBLEN, R; VOGEL; F.S.F; ROEHE, P.M; ALFIERI, A. A; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesq. Vet. Bras.** 25(3):125-134, jul./set. 2005.

LOSINGER, W.C. Economic impacts of reduced milk production associated with epidemiological risk factors for Johne's disease on dairy operations in the USA. **J. Dairy Res.** 73:33-43, 2006.

MADDOCKS, S.; SCANDURRA, G.M.; NOURSE, C.; BYE, C.; WILLIAMS, R.B.; SLOBEDMAN, R.B; CUNNINGHAM, A.L; BRITTON, W. J. Gene expression in HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* co-infected macrophages is dominated by *M. tuberculosis*. **Elsevier health / Tuberculosis** 89 : 285–293, 2009.

MALONE, F. E.; WILSON, E. C.; POLLOCK, J. M.; SKUCE, R. A. Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle, **Journal Veterinary Medical**, v. 50, p. 500 - 504, 2003.

MATOS, F; CUNHA, M.V; CANTO, A; ALBUQUERQUE, T; AMADO, A; BOTELHO, A; Snapshot of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* infections in livestock in an area with a low incidence of bovine tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology** 48, 4337–4339, 2010.

MAZA, L.M. de la; PEZZLO, M.T; BARON, E.J. Atlas de diagnóstico em microbiologia. Porto Alegre: **Artmed**, 1999.

MEDEIROS, J.M.A., GARINO JR, F., MATOS, R.A.T., COSTA, V.M.M., RIET-CORREA, F. Frequência de anticorpos para paratuberculose em bovinos no semiárido paraibano. **Pesq. Vet. Bras.** vol.32 no.8 Rio de Janeiro ago. 2012.

MEDEIROS, L., MARASSI, C.D., FIGUEIREDO, E.E.S., LEITE, J., FERREIRA, A.M.R., LILENBAUM, W. Assessing the histopathology to depict the different stages of bovine tuberculosis infection in a naturally infected herd. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(2):135-139, 2012.

MEDEIROS, L.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E.E.S.; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine Tuberculosis in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** 41:1-4, 2010.

MELO, L.E.H.; MELO, M.T.; LEITE, J.E.B; MAIA, F.C.L.; MOTA, R.A.; SCHINDLER, H.C.; LIMA, J.F.C.; CASTRO, R.S.; SANTOS, N. V. M.; SÁ, L.M. Tuberculose caprina: aspectos nosológicos, radiológicos, Anatomo-histopatológicos e presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em caprinos leiteiros do estado de Pernambuco, Brasil. In: 35.º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA – CONBRAVET, 35, 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: Expogramado, 2008.

MELO, L.E.H; MOTA, R.A; MAIA, F.C.L; FERNANDES, A.C.C; SILVA, T.I.B; LEITE, J.E.B; BAPTISTA FILHO, L.C.F; RAMOS, C.A.N. Ocorrência e caracterização da tuberculose em caprinos leiteiros criados no estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(9):831-83, 2012.

- MORLOCK, G.P; CRAWFORD, J.T; BUTLER, W.R; BRIM, S.E; SIKES, D; MAZUREK, G.H. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, 44:2291-5, 2000.
- MOTA, R.A.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; GOMES, M.J.P. ; PEIXOTO, R.M.; MAIA, F.C.L.; BRITO, M.F.; CHIES, J.A.B. ; SNEL, G.G.M. ; BERCHT, B.S. ; JUFFO, G.D. Paratuberculose em um rebanho bovino leiteiro no Estado de Pernambuco, PE. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.º02, p.73-79, 2007.
- MOTA, R.A; PEIXOTO, P.V; YAMASAKI, E.M; MEDEIROS, E.S; COSTA, M.M; PEIXOTO, R.M; BRITO, M.F. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):237-242, 2010.
- NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Liver abscess in feedlot cattle. **Veterinary Clinics Food Animal**, v. 23, n. 2, p. 351-369, 2007.
- NAKAJIMA, M.; MAIA, F. C. I.; MOTA, P. M. P. C. Diagnóstico da paratuberculose em Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO EM MICOBACTÉRIAS, 4, 1991, Bauru. Anais. Bauru – SP, 1991.
- NARAYANAN, S., NAGARAJA, T. G., STAATS, J., *et al.* Biochemical and biological characterizations and ribotyping of *Actinomyces pyogenes* and *Actinomyces pyogenes*-like organisms from liver abscesses in cattle. **Vet Microbiol**, v.61, n.4, p.289-303, 1998.
- NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. PATHOGENESIS OF *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, n. 40, p.41-52, 1994.
- NEILL, S.D; O'BRIEN, J.J; HANNA, J. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. **Vet Microbiol**, 28: 103–109, 1991.
- NEVES, A.L.A; PEREIRA, L.G.R; SANTOS, R.D; ARAÚJO, G.G.L; CARNEIRO, A.V; MORAES, S.A; SPANIOL, C.M.O.; ARAGÃO, A.S.L. Caracterização dos sistemas referências na produção de leite da região do Sertão. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, Salvador.v.12, n.1, p.209-223, 2011.
- NÓBREGA, J.R; MACÊDO, J.E; ARAÚJO, J.T.S.A; DANTAS, J.A.S.; SOARES, A.F.M; RIET-CORREA, F. Ectima contagioso em ovinos e caprinos no semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 28:135-139, 2008.

OLIVEIRA , I.A.S; MELO, H.P.C; CÂMARA , A; DIAS, R.V.C; SOTO-BLANCO, B. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 395-400, 2007.

OLIVEIRA, D.M; RIET-CORREA, F; GALIZA, G.J.N; ASSIS, A.C.O; DANTAS, A.F.M; BANDARRA, P.M; GARINO JR, F. Paratuberculose em caprinos e ovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(1):67-72, 2010.

PEDRO, H.S.P; PEREIRA, M.I.F; GOLONI, M.R.A; UEKI, S.Y.M; CHIMARA, E. Isolamento de micobactérias não-tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. **J. Bras Pneumol** 34: 950-955, 2008.

PIGNATA, W.A; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; DANTAS, A.F.M.; GOMES, A.A.B.; REMÍGIO, F.R.3; LIMA, F.S. Prevalência de tuberculose em caprinos no semi-árido brasileiro. In: 35.º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA – CONBRAVET, 35, 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: Expogramado, 2008.

PIGNATA, W.A; ALVES, C.J; AZEVEDO, S.S; DANTAS, A,F,M; GOMES, A.A.B; REMÍGIO, F.R; LIMA, F.S; MOTA, P.M.P. Prevalência para tuberculose caprina no semi-árido paraibano. **Pesq. Vet. Bras.** 29(7):526-532, julho 2009.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F. and HADDAD, J.P.A.. **Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., vol.52, n.5, p.534-543, 2000.

PINHEIRO, S.R.; ROXO, E.; ALMEIDA, C.A.S, VASCONCELLOS, S.A.; SILVANTOS, M.C.; MAIORKA, P.C.; MELVILLE, A.M.P.; BENITES, N.R.; PAES, A.C. Surto de tuberculose em caprinos (*Capra hircus*): relato de caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 13., 2007., Campo Grande, MS. *Anais.* Campo Grande. p.34, 2007.

PINTO, P.S.A; FARIA, J.E; VILORIA, M.I.V; BEVILACQUA, P.D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. **Rev. Bras. Saúde Prod. Animal**, 3(1):10-15, 2002.

POLLOCK, J.M., NEILL, S.D. Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 163:115-127, 2002.

PORTUGAL, M.A.S.C., PIMENTEL, J.N., SALIBA, A.M., BALDASSI, L., SANDOVAL, E.F.D. Ocorrência de paratuberculose no Estado de Santa Catarina. *Biológico*, São Paulo, v. 45, n. ° 1/2, p. 19 – 24, 1979.

POURAHMAD, F; THOMPSON, K.D; ADAMS, A.; RICHARDS, R.H. Comparative evaluation of Polymerase Chain Reaction–Restriction Enzyme Analysis (PRA) and sequencing of heat shock protein 65 (hsp65) gene for identification of aquatic mycobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 76 128–135, 2009.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1º ed. São Paulo: Roca, 2005, 513p.

QUINN, P. J.; DONNELLY, W. J. C.; CARTER, M. E. ; MARKEY, B. K. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. **Porto Alegre**, 2005.

QUINTAS, H., REIS, J., PIRES, I., ALEGRIA, N. Tuberculosis in goats. **Veterinary Record**, 166, 437–438, 2010.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica veterinária: um tratado de doença dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 1737 p, 2002.

RAMOS, E.T., POSTER, F.P., CORREIA, B.L., DE OLIVEIRA, S.J., RODRIGUES, N.C., CANABARRO, C.E. Paratuberculose em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. *Hora Vet.* 6(34):28-32, 1986.

RESENDE, K.T.; SILVA, H.G.O.; LIMA, L.D. et al. Avaliação das exigências nutricionais de pequenos ruminantes pelos sistemas de alimentação recentemente publicados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.161-177, 2008.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. 1ª ed. São Paulo: Nobel, 318p, 1997.

RIBEIRO, S.D.A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. São Paulo: Nobel, c 1998.

RIET-CORREA, F; GARCIA, M; Tuberculose. In: RIET-CORREA, F., SCHILD, A.L., MÉNDEZ, M. DEL C., LEMOS, R.A.A. *Doenças de ruminantes e eqüinos*. 2 ed. São Paulo: **Varela**, p. 351-316, 2001.

RIET-CORREA, F; SCHILD, A.L; MENDEZ, M.C; LEMOS, R.A.A. *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. 2ª ed. Varela, São Paulo. Vol 1, 425p, 2001.

RIVERA-OLIVERO, I.A; GUEVARA, A; ESCALONA, A; OLIVER, M; PÉREZ-ALFONZO, R; PIQUERO, J, Soft-tissue infections due to nontuberculous mycobacteria following mesotherapy. What is the price of beauty . *Enferm Infecc Microbiol Clin* , 24(5): 302-6, 2006.

RORING, S.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. ***Veterinary Microbiology***, v.74, p.227-236, 2000.

ROSENBERGER, G. et al. Enfermidades de los Bovinos. Buenos Aires: **Editorial Hemisferio Sul S.A.**, v. 2, p.139-151, 1989.

ROSSETTI, M.L.R; VALIM, A.R.M ; SILVA, M.S.N.; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. ***Rev Saúde Pública***;36(4):525-32, 2002.

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

RUGGIERO, A.P; IKUNO, A.A; FERREIRA, V.C.A; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. ***Arq. Inst. Biol.***, São Paulo, v.74, n.1, p.55-65, jan./mar., 2007.

SALAZAR, F.H.P. Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no estado de Mato Grosso, Brasil. 2005. 68f. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, MS, 2005.

SANTOS, J. A. & SILVA, N. L. Sobre a 1ª observação da paratuberculose no Brasil. ***Bolm. Soc. Bras. Med. Vet.***, v. 24, p. 5 – 11, 1956.

SHARPE, A.E., BRADY, C.P., JOHNSON, A.J., BYRNE, W., KENNY, K., COSTELLO, E. Concurrent outbreak of tuberculosis and caseous lymphadenitis in a goat herd. ***Veterinary Record***, 166, 591–592, 2010.

SILVA, N. M. & PIZELLI, G. N. Estudo sobre paratuberculose. I – Diagnóstico de um caso de doença. *Arq. Ins. Biol. Animal*, v. 4, p. 169 – 173, 1961.

SILVA, N. M. Estudos sobre a paratuberculose. IV – **Infecção experimental de ovinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina.** *Pesq. Agrop. Bras.* , v. 3, p. 285 – 289, 1968.

SILVA, R.R. O agronegócio brasileiro da carne caprina e ovina. Salvador-BA, p.111.: iL, 2002.

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

TELENTI, A; MARCHESI, F; BALZ, M; BALLY, F; BÖTTGER, B.T. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 175-178, 1993.

THIERRY, D., M. D. CAVE, K. D. EISENACH, J. T. CRAWFORD, J. H. BATES, B. GICQUEL, AND J. L. GUESDON. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Nucleic Acids Res.** 18:188, 1990.

THOEN C.,O.; LOBUE, P.A.; ENARSON, D.A.; KANEENE, J.B.; KANTOR, I.N. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. **Vet. Ital.** 45:135-181, 2009.

TORTOLI, E. Clinical manifestations of non tuberculous mycobacteria infections. **Clin. Microbiol. Infect.** 15:906-910, 2009.

TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 718 p., 2005.

USDA. Bovine tuberculosis eradication: uniform methods and rules, effective 1 January 2005. United States Department of Agriculture (USDA). **Animal and Plant Health Inspection Service** (APHIS), 28 p, 2004.

VIEIRA, G.A – Apontamentos de aulas, FVC,UNIME, Salvador, Bahia,2008.

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R.; XIMENES, L.J.F. Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste. Ceará: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA** (Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos – CNPC), 1999.

VITALE, F.; CAPRA, G. ; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA S., Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Cattle by PCR Using Milk, Lymph Node Aspirates, and Nasal Swabs. **Journal of clinical microbiology**, Vol. 36, No. 4, p. 1050–1055, 1998.

WASHER, L.L.; RIDDELL IV, J; RIDER, J; CHENOWETH, C.E. *Mycobacterium neoaurum* Bloodstream Infection: Report of 4 Cases and Review of the Literature. **Clinical Infectious Diseases**, 45:e10–3, 2007.

WENGENACK, N.L; TODOROVIC, S.; YU, L.; RUSNAK, F. Evidence for differential binding of isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis katG* and the isoniazid resistant mutant *katG* (S315T). **Biochemistry**; 37:15825-34, 1998.

WOOD, P.R., CORNER, L.A., ROTHEL, J.S., BALDOCK, C., JONES, S.L., COUSINS, D.B., MCCORMICK, B.S., FRANCIS, B.R., CREEPER, J., TWEDDLE, N.E. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Australian Veterinary Journal** 68, 286–290, 1991.

YAMAGUCHI, L.C.T.; CARNEIRO, A.V.; MARTINS, P.C.; ARAÚJO, J.M.; In: CARVALHO, G.R.; CARNEIRO, A.V.; YAMAGUCHI, L.C.T.; MARTINS, P.C.; HOTT, M.C.; REIS FILHO, R.J.C.; OLIVEIRA, M.A. (Ed.). **Competitividade da cadeia produtiva do leite em Pernambuco**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, Cap.7, p.143-165, 2009.

ZANINI, M.S; MOREIRA, E.C; LOPES, M.T.P. *Mycobacterium bovis*: Polimerase chain reaction. Identification in bovine lymphnode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spolypotyping and restriction fragment length polymorphism. Mem. Inst. O. Cruz, v.96, n.6, p.809-813, 2001.

ZANON, U; MAGARÃO, M.F; MONDIN, E.L. A atividade tuberculicida de desinfetantes hospitalares. Rev. da Divisão Nacional de Tuberculose, v.18, p.5-15, 1974.

ZARDEN, C.F.O.; MARASSI, C.D.; CARVALHO, A.C.; FIGUEIREDO, E.E.S.; LILENBAUM, W. Bacteriological and molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle with inconclusive results to intradermal tuberculin tests. **Epidemiology and Infection**, Available on CJO doi:10.1017/S0950268812002105, 2012.

ZAVOSHTI, F.R; KHOOJINE, A.B.S; HELAN, J.A; HASSANZADEH, B; HEYDARI, A.A. Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. **Comp Clin Pathol**, 21:667–671, 2012.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D; COLE, S. The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of *M. tuberculosis*. **Nature**, 385:591-3, 1992.

ANEXOS

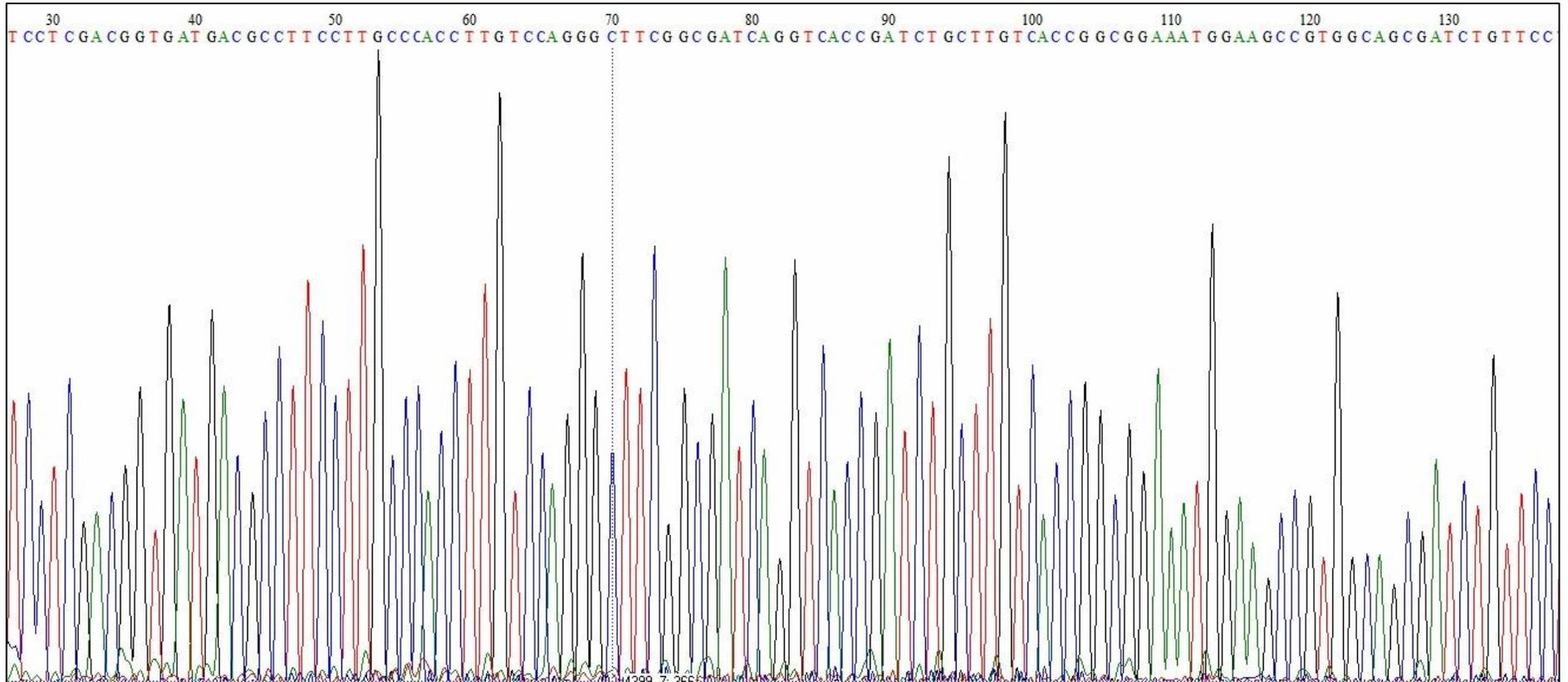


Figura1: Eletroferograma parcial de uma sequência de DNA de *Mycobacterium* spp. oriundo de uma amostra de leite capino, obtida no sequenciador automático *ABI-PRIM 3100 Genetic Analyzer*.

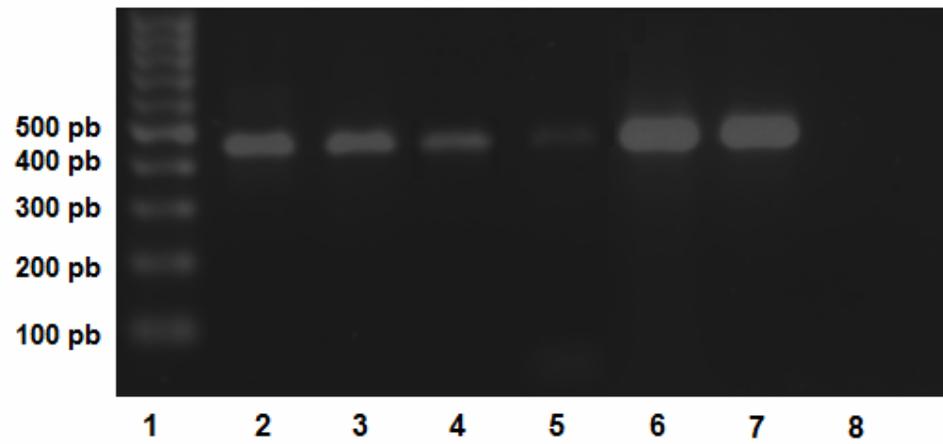


Figura 2: Amplificação de parte do gene *hsp65* para identificação de *Mycobacterium* spp. a partir de DNA extraído direto de leite caprino e bovino, com os iniciadores específicos descritos por Telenti et al. (1993). Colunas da esquerda para a direita: 1- Marcador de peso molecular de 100 pb; 2 - Controle positivo; 3 á 7 - Amostras extraídas de leite de cabras e vacas na microrregião de Petrolina; e 8 – Controle negativo.



Figura 3: Distribuição espacial das propriedades de caprinos leiteiros onde foram realizadas as coletas de leite, microrregião de Petrolina, PE, 2012.

Quadro 1: Relação e caracterização das amostras de leite bovino e caprino que apresentaram-se positivas por algumas das técnicas de diagnóstico para *Mycobacterium* spp.

Propriedade	Ident. da Amostra	Espécie	PCR	Cultivo		Sequenciamento
				L.J Glicerina	L.J Piruvato	
A	09	Bovina	-	-	+	<i>Mycobacterium avium</i>
B	69	Caprina	-	-	+	<i>M. lacticola</i>
C	124	Caprina	+	-	-	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>
C	129	Caprina	+	-	-	<i>Propionibacterium acnes</i>
C	131	Caprina	+	-	-	N.I
C	138	Caprina	+	-	-	<i>M. iranicum</i>
D	143	Caprina	+	-	-	<i>Propionibacterium acnes</i>

L.J = Lowenstein Jensen; N.I = Não identificado; + (positivo para *Mycobacterium* spp); - (negativo para *Mycobacterium* spp).

Quadro 2: Relação e caracterização das três amostras de abscessos que apresentaram-se positivas por algumas das técnicas de diagnóstico para *Mycobacterium* spp.

Amostra	Origem da amostra	Cultivo em ágar sangue	PCR (gene <i>hsp65</i>)	Cultivo		Sequenciamento	Histopatológico
				L.J (glicerol)	L.J (piruvato)		
65M	Abscesso na região das costelas de ovino	C. <i>pseudotuberculosis</i>	+	-	-	N.I.	Lesão característica da L.C.
77M	Abscesso no esôfago de Caprino	C. <i>pseudotuberculosis</i>	-	-	+	<i>M. novocastrense</i>	Lesões características da L.C.
89M	Abscesso no fígado de ovino	C. <i>pseudotuberculosis</i>	-	-	+	<i>M. novocastrense</i>	Lesões características da L.C.

L.J = Lowenstein Jensen; N.I = Não identificado; L.C = Linfadenite Caseosa; + (positivo); - (negativo).