

DÉBORA ROCHA MASCARENHAS

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR) PARA
DETECÇÃO DE *Mycobacterium bovis* E *Brucella abortus* EM
AMOSTRAS DE LEITE CRU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M395v
2017 Mascarenhas, Débora Rocha, 1988-
Validação da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para
detecção de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* em
amostras de leite cru / Débora Rocha Mascarenhas. – Viçosa,
MG, 2017.

x, 82f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.65-81.

1. *Mycobacterium bovis*. 2. *Brucella abortus*. 3. Validação
de método in vitro. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Leite -
Contaminação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Veterinária. Programa de Pós-graduação de Medicina
Veterinária. II. Título.

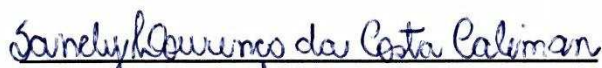
CDD 22 ed. 636.2089

DÉBORA ROCHA MASCARENHAS

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR) PARA
DETECÇÃO DE *Mycobacterium bovis* E *Brucella abortus* EM
AMOSTRAS DE LEITE CRU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de março de 2017.


Sanely Lourenço da Costa Caliman


David Germano Gonçalves Schwarz



Márcio Roberto Silva


Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, meu profundo agradecimento pelo acolhimento e confiança em mim depositados, pela orientação e pelo tempo dedicado a essa dissertação.

Ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de me tornar mestre.

Aos colegas do LDBAC pela companhia, conselhos e amizade.

À querida Rosi, por ser sempre tão atenciosa, sanar minhas dúvidas e não me deixar perder os prazos mesmo à distância.

Ao Antônio Augusto Fonseca Júnior pela “co-orientação honorária”, pelos ensinamentos sobre biologia molecular, pela paciência e pelo tempo dedicado à execução desse projeto.

A todos colaboradores do LANAGRO-MG, em especial aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais pelo carinho, pela receptividade e por tornar meus dias mais leves e divertidos.

Ao meu professor e orientador de iniciação científica na Universidade Federal Lavras, Peter Bitencourt Faria, por despertar em mim o interesse pela pesquisa.

Ao meu pai pela inspiração e apoio para enfrentar esse desafio e pelo exemplo de dedicação e ética profissional.

À minha mãe pelas palavras de consolo nas horas difíceis, pela compreensão nos meus momentos de estresse e por fazer de tudo para tornar meus dias mais fáceis.

Ao meu irmão, pelos valiosos conselhos e exemplo de persistência.

Ao meu noivo por compreender as razões do meu recolhimento e por sempre me incentivar a seguir meus objetivos.

Às minhas amigas, Ana Helena, Bruna Diniz, Bruna Latorre, Clarisse e Marcela, pelos necessários momentos de descontração, pelas palavras de incentivo e por estarem sempre dispostas a me ouvir.

À CAPES pela bolsa a mim concedida.

Ao LANAGRO-MG, pelo financiamento do projeto.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelos demais auxílios financeiros.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Importância e Características da Brucelose e Tuberculose Bovinas .	3
2.1.1 Brucelose	4
2.1.2 Tuberculose	7
2.2 Patogenia e Transmissão.....	10
2.2.1 Brucelose Bovina	10
2.2.2 Tuberculose Bovina	14
2.3 Diagnóstico e Controle.....	18
2.3.1 Brucelose Bovina	20
2.3.2 Tuberculose Bovina	25
2.4 Testes Moleculares - PCR em tempo real (qPCR).....	29
2.5 Validação de Ensaios	34
Especificidade e Seletividade	35
Sensibilidade.....	35
Repetibilidade	36
Reprodutibilidade	37
Robustez.....	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 Preparo das Amostras.....	40
4.2 Extração de DNA	41
4.3 Quantificação de DNA	44
4.4 Iniciadores	45
4.5 Padronização da PCR em Tempo Real.....	47
4.6 Critérios Utilizados para Validação	48
4.7 Análise dos Dados.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Extração de DNA.....	52
5.2 Validação do ensaio.....	53

<i>Especificidade Analítica</i>	53
<i>Limite de Detecção</i>	54
<i>Repetibilidade e Reprodutibilidade</i>	56
<i>Robustez</i>	58
CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial da tuberculose bovina.	10
Figura 2 - Fontes de variação dos <i>Cycle Thresholds</i> utilizando diferentes <i>Kits</i> de extração de DNA com o <i>primer</i> Mbo.is1081.71 para detecção de <i>Mycobacterium bovis</i> em leite cru.	59
Figura 3 - Fontes de variação dos <i>Cycle Thresholds</i> utilizando diferentes <i>Kits</i> de extração de DNA com o <i>primer</i> Bru.eriD.92 para detecção de <i>Brucella abortus</i> em leite cru.	60
Figura 4 - Fontes de variação dos <i>Cycle Thresholds</i> utilizando diferentes <i>Kits</i> de extração de DNA com o <i>primer</i> Bru.is6501.128 para detecção de <i>Brucella abortus</i> em leite cru.	60
Figura 5 - Fontes de variação dos <i>Cycle Thresholds</i> utilizando diferentes termocicladores com o <i>primer</i> Mbo.is1081.71 para detecção de <i>Mycobacterium bovis</i> em leite cru.	61
Figura 6 - Fontes de variação dos <i>Cycle Thresholds</i> utilizando diferentes termocicladores com o <i>primer</i> Bru.eriD.92 para detecção de <i>Brucella abortus</i> em leite cru.	62
Figura 7 - Fontes de variação dos <i>Cycle Thresholds</i> utilizando diferentes termocicladores com o <i>primer</i> Bru.is6501.128 para detecção de <i>Brucella abortus</i> em leite cru.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos iniciadores e sondas de hibridização usados na PCR em tempo real para detecção de <i>Mycobacterium bovis</i> e <i>Brucella abortus</i> em leite cru.	46
Tabela 2 - Protocolos de tempo e temperatura utilizados nos ensaios de qPCR para detecção de.....	47
Tabela 3 - Concentração e volume dos componentes utilizados no <i>master mix</i> para reação de PCR em Tempo Real para detecção de <i>Mycobacterium bovis</i> em leite cru.	47
Tabela 4 - Concentração e volume dos componentes utilizados no <i>master mix</i> para reação de PCR em Tempo Real para detecção de <i>Brucella abortus</i> em leite cru.....	48
Tabela 5 - <i>Cycle Thresholds (Cts)</i> encontrados até o limite de detecção para <i>M. bovis</i> presente em leite cru.	55
Tabela 6 - <i>Cycle Thresholds (Cts)</i> encontrados até o limite de detecção para <i>B. abortus</i> presente em leite cru.	56
Tabela 7 - Medidas de repetibilidade do <i>primer</i> Bru.is6501.128 para detecção de <i>B. abortus</i> em leite cru.....	57
Tabela 8 - Medidas de repetibilidade do <i>primer</i> Bru.eriD.92 para detecção de <i>B. abortus</i> em leite cru.	57
Tabela 9 - Medidas de repetibilidade do <i>primer</i> Mbo.is1081.71 para detecção de <i>M. bovis</i> em leite cru.	57
Tabela 10 - Medidas de reprodutibilidade do <i>primer</i> Bru.is6501.128 para detecção de <i>B. abortus</i> em leite cru.....	58
Tabela 11 - Medidas de reprodutibilidade do <i>primer</i> Bru.eriD.92 para detecção de <i>B. abortus</i> em leite cru.....	58
Tabela 12 - Medidas de reprodutibilidade do <i>primer</i> Mbo.is1081.71 para detecção de <i>M.bovis</i> em leite cru.....	58

RESUMO

MASCARENHAS, Débora Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Validação da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* em amostras de leite cru.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Mycobacterium bovis e *Brucella abortus* são os agentes etiológicos da tuberculose e da brucelose bovinas, doenças infectocontagiosas de ocorrência mundial que geram grandes prejuízos econômicos e podem ser transmitidas aos humanos principalmente através do contato direto com animais contaminados e da ingestão de leite cru e derivados. No Brasil existe o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que estabelece a realização do diagnóstico e normatiza as medidas de controle dessas zoonoses. Os métodos oficiais para diagnóstico de brucelose e tuberculose no animal vivo possuem sensibilidade e especificidade variáveis, são laboriosos e demandam tempo. Para aumentar a eficácia do controle destas doenças são necessários métodos rápidos e acurados, que atuem como ferramenta auxiliar no diagnóstico *in vivo* dessas enfermidades sem a necessidade de procedimentos invasivos. Para garantir a credibilidade e confiabilidade de novos métodos de diagnóstico é necessário que os mesmos sejam validados. No presente estudo foram realizados ensaios para a validação de uma reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para a detecção do DNA de *M. bovis* e *B. abortus* em amostras de leite cru artificialmente contaminados, usando como critério o desempenho analítico (sensibilidade e especificidade analítica), repetibilidade, reprodutibilidade interna e robustez. Inicialmente cinco metodologias de extração de DNA foram testadas e as que apresentaram melhores resultados foram os kits comerciais *DNeasy mericon Food Kit – Qiagen* e *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit – Promega*. Os limites de detecção obtidos na qPCR validada nesse estudo foram de 2,3 pg de DNA de *M. bovis* e 20,7 fg de DNA de *B. abortus*. As repetibilidades e

reprodutibilidades aliadas à robustez apresentadas nesse trabalho indicam que os métodos avaliados podem ser utilizados de forma auxiliar ao diagnóstico *in vivo* oficial de tuberculose e brucelose bovinas, após ser testada em animais naturalmente infectados.

ABSTRACT

MASCARENHAS, Débora Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Validation of the real-time PCR (qPCR) technique for detection of *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* in raw milk samples.** Advisor: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.

Mycobacterium bovis and *Brucella abortus* are the etiological agents of bovine tuberculosis and brucellosis, infectious diseases globally disseminated that cause substantial economic losses and can be transmitted to humans mainly through direct contact with contaminated animals and the intake of raw milk and milk products. In Brazil there is the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis, created by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, which establishes the diagnosis and regulates the control measures of these zoonosis. The official methods for diagnosis of brucellosis and tuberculosis in the living animal have variable sensitivity and specificity, are laborious and time consuming. In order to increase the efficacy of brucellosis and tuberculosis control, rapid and accurate methods are necessary to act as an auxiliary tool in the *in vivo* diagnosis of these diseases without the need of invasive procedures. To ensure the credibility and reliability of new diagnostic methods, they must be validated. In the present study, the validation of a real-time polymerase chain reaction (qPCR) for the detection of *M. bovis* and *B. abortus* in artificially contaminated raw milk samples was performed using analytical performance (analytical sensitivity and specificity), repeatability, internal reproducibility and robustness. Initially five DNA extraction methodologies were tested and the ones that presented the best results were the commercial kits “DNeasy Mericon Food Kit – Qiagen” and “Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit – Promega”. The limits of detection obtained in the qPCR validated in this study were 2.3 pg of *M. bovis* DNA and 20.7 fg of *B. abortus* DNA. The repeatability and reproducibility associated with the robustness presented in this study indicate that the evaluated methods can be used as an auxiliary

tool to the *in vivo* official diagnosis of bovine tuberculosis and brucellosis, after being tested in naturally infected animals.

1 INTRODUÇÃO

A brucelose e a tuberculose são doenças infectocontagiosas de preocupação mundial devido, principalmente, ao caráter zoonótico e aos prejuízos econômicos que acarretam. A tuberculose bovina se caracteriza pelo desenvolvimento de nódulos de tecido de granulação causados por *Mycobacterium bovis*. As perdas econômicas geradas pelo animal tuberculoso estão relacionadas principalmente à queda da capacidade produtiva, descarte de carcaças infectadas e embargos para exportação da carne bovina. A brucelose bovina no Brasil é causada por *Brucella abortus* e acomete principalmente o trato reprodutivo, gerando perdas diretas devido aos abortos, aos baixos índices reprodutivos e à queda na produção do rebanho. As propriedades onde a brucelose e a tuberculose estão presentes têm o valor comercial de seus animais depreciado e as regiões onde as doenças são endêmicas encontram-se em posição desvantajosa na disputa por novos mercados.

O método de diagnóstico preconizado para a tuberculose em bovinos vivos é o teste da tuberculina que apresenta sensibilidade e especificidade muito variáveis. O diagnóstico definitivo se baseia no isolamento e identificação bioquímica do agente através de lesões suspeitas encontradas em carcaças pelo serviço de inspeção. Além de possuir baixa sensibilidade, esse método necessita de grande número de bacilos viáveis e a obtenção dos resultados pode demorar de quatro a quinze semanas. A brucelose é diagnosticada por diferentes métodos que se complementam: diagnóstico clínico, epidemiológico e através de métodos laboratoriais diretos, ou pela detecção de anticorpos contra *B. abortus* por métodos indiretos. O método direto de diagnóstico da brucelose através do isolamento e identificação do agente requer muito tempo e oferece risco para os laboratoristas e os métodos sorológicos nem sempre apresentam resultados confiáveis.

As técnicas de biologia molecular têm grande aplicabilidade em laboratório de diagnóstico de doenças animais. A reação em cadeia da

polimerase em tempo real (qPCR) vem se tornando uma alternativa para auxiliar o diagnóstico de doenças e possui as vantagens de rapidez diagnóstica, maior precisão e reprodutibilidade, melhor controle de qualidade no processo, elevada sensibilidade analítica e diagnóstica e risco mínimo de contaminação por não exigir a manipulação de *amplicons*.

Levando em consideração a dificuldade de se obter um diagnóstico *in vivo* rápido e preciso para tuberculose e brucelose bovinas e a necessidade de validação para garantir a confiabilidade de técnicas que sejam mais rápidas, práticas e sensíveis, objetiva-se neste trabalho verificar o melhor método de extração de DNA de leite cru a fim de validar a técnica de PCR em tempo real para detecção de *Brucella abortus* e *Mycobacterium bovis* nesta matriz que é importante via de disseminação desses agentes patogênicos para os seres humanos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância e Características da Brucelose e Tuberculose Bovinas

A brucelose, causada por *Brucella abortus*, e a tuberculose, por *Mycobacterium bovis*, são doenças infectocontagiosas com potencial zoonótico, de distribuição mundial, localizadas principalmente em países subdesenvolvidos e geram expressivos prejuízos econômicos. A brucelose atinge tanto o gado de leite quanto o de corte, enquanto a tuberculose está mais prevalente em rebanhos leiteiros onde ocorre maior aglomeração de animais. A presença de brucelose e tuberculose em um rebanho leva à perda de prestígio e credibilidade da unidade de criação onde as doenças são constatadas e à restrições na movimentação e comercialização interna e internacional (BRASIL, 2006; LOPES FILHO, 2010; MICHEL *et al.*, 2010).

A brucelose acomete principalmente o trato reprodutivo de bovinos e bubalinos gerando perdas diretas devido aos abortos, aos baixos índices reprodutivos, ao aumento do intervalo entre partos, à diminuição da produção de leite, à morte de bezerros e à interrupção de linhagens genéticas (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Segundo Lucas (2006), os prejuízos estimados para Minas Gerais e Goiás são de 13% da receita total das propriedades; já para os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, os prejuízos foram estimados em cerca de 5%.

A importância econômica atribuída à tuberculose bovina está baseada nas perdas diretas resultantes da morte de animais, queda do ganho de peso, diminuição da produção de leite, descarte precoce e eliminação de animais de alto valor zootécnico, aumento nos custos da produção e condenação de carcaças durante o abate (BRASIL, 2006; LOPES FILHO, 2010; MICHEL *et al.*, 2010).

Brucelose e tuberculose são zoonoses que apresentam grande risco para a saúde pública em decorrência da ingestão de leite cru ou de produtos lácteos não submetidos a tratamento térmico (queijo fresco,

iogurte, creme, etc.), oriundos de animais infectados. A carne crua com restos de tecido linfático e o sangue de animais infectados podem conter microrganismos viáveis e, portanto, também representam risco para os consumidores. As infecções humanas geram prejuízos econômicos indiretos. Na maioria das vezes essas doenças atingem o curso crônico e geram custos com diagnóstico, tratamento e internações prolongadas (BRASIL, 2006).

2.1.1 Brucelose

A brucelose bovina, infecção mais prevalente por *Brucella* no Brasil, é predominantemente causada por *Brucella abortus* que é a espécie mais estudada, de maior relevância e alvo do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose. No Brasil não existem relatos da existência de *Brucella melitensis* (BRASIL, 2006). A brucelose causada por *B. abortus* já foi encontrada em outros bovídeos no Brasil, particularmente no búfalo-d'água-doméstico ou búfalo-asiático (*Bubalus bubalis*), como foi revelado por uma série de inquéritos sorológicos (SANTA ROSA *et al.*, 1961; COSTA *et al.*, 1973; SANDOVAL *et al.*, 1979; LÁU; SINGH, 1986; BASTIANETTO *et al.*, 2005).

As bactérias do gênero *Brucella* são Gram-negativas, intracelulares facultativas, aeróbias ou microaerófilas, imóveis, coram-se por Ziehl-Neelsen modificada, não possuem cápsula ou flagelo e não formam esporo. Apresentam morfologia de cocobacilos curtos e pequenos, que medem de 0,6 a 1,5 µm por 0,5 a 0,7 µm de dimensão (REDKAR *et al.*, 2001; WALKER, 2003; PROBERT *et al.*, 2004). Multiplicam-se em uma faixa de temperatura entre 20°C e 40°C, sendo 37°C e pH de 6,6 a 7,4, as condições ideais (RIEMANN, 2006; OIE, 2016).

Nove espécies de *Brucella* são reconhecidas atualmente, sete que afetam os animais terrestres: *B. abortus* (bovinos e bubalinos), *B. melitensis* (cabras, ovelhas e camelos), *B. suis* (suínos e javalis), *B. ovis* (ovelha), *B. canis* (cães), *B. neotomae* (ratos do deserto) e *B. microti* (ratazanas selvagens, raposas e solo) (VERGER *et al.*, 1987; HUBALÉK *et al.*, 2007;

SCHOLZ *et al.*, 2008;) e duas que afetam os mamíferos marinhos (focas, leões-marinhos, golfinhos e baleias): *B. ceti* e *B. pinnipedialis* (FOSTER *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ-MORA *et al.*, 2013). Recentemente novos isolados foram encontrados em humanos e em babuínos nascidos mortos, eles foram descritos e publicados como a décima e a décima primeira espécies de *Brucella*, *B. inopinata* e *B. papionis*, respectivamente. (SCHOLZ *et al.*, 2010; WHATMORE *et al.*, 2014).

Algumas espécies de *Brucella* podem ser subdivididas em biovares. *B. abortus* possui sete biotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9) (MORENO *et al.*, 2002; QUINN *et al.*, 2005; FOSTER *et al.*, 2007; SCHOLZ *et al.*, 2008). Os biovares de *B. abortus* possuem diferentes distribuições geográficas. Os biovares 1 e 2 têm distribuição mundial, o biovar 3 está presente principalmente na Índia, no Egito e na África e o biovar 5 é encontrado mais comumente na Alemanha e no Reino Unido (WALKER, 2003). Apesar dos poucos estudos realizados visando à identificação das biovariedades de *Brucella* spp. isoladas de bovídeos, no Brasil já foram identificadas *Brucella abortus* biovares 1, 2 e 3 (BRASIL, 2006).

As espécies de *Brucella* podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos: lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e rugosas (*B. ovis* e *B. canis*) (METCALF *et al.*, 1994). Essa distinção é realizada baseada principalmente na presença ou ausência da cadeia O, um dos componentes do lipopolissacarídeo (LPS) localizado na superfície externa dessas bactérias, que possui relação com a virulência em algumas espécies de *Brucella* (NIELSEN *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2006; ; LAGE *et al.*, 2008). As espécies que apresentam morfologia de colônia do tipo lisa, quando evoluem para formas rugosas ou mucoides deixam de ser patogênicas (BRASIL, 2006).

Brucella abortus possui alta capacidade de sobrevivência em ambientes que apresentam condições ideais de umidade e temperatura, abrigo de luz solar direta, pH neutro e matéria orgânica. Podem resistir em pastagens (até 185 dias), fetos abortados (até 180 dias), exsudato uterino (até 200 dias), anexos fetais (até 180 dias), fezes úmidas (até 240 dias), na água (até 150 dias) e em esgoto (até 700 dias) (CRAWFORD *et al.*, 1990; CARVALHO *et al.*, 1995; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006;

OIE, 2016). O álcool a uma concentração de 70% destrói imediatamente essas bactérias (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; LAGE *et al.*, 2008; OIE, 2016).

A sobrevivência de brucelas no leite e seus derivados depende da temperatura e pH do produto e da presença de outros microrganismos que possam inibir a sua multiplicação, podendo permanecer no alimento de 15 a 90 dias. A refrigeração inibe a multiplicação da bactéria, porém sua viabilidade é mantida inclusive a baixas temperaturas de congelamento. Já as técnicas de aquecimento como a fervura, processos de pasteurização e os métodos de esterilização, são eficazes na eliminação do microrganismo (CARVALHO *et al.*, 1995; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006). Em carnes essa bactéria pode manter-se viável durante meses, pois é pouco afetada pelo processo de acidificação muscular, refrigeração ou congelamento. Além do calor, a eliminação do agente só ocorre em situações de pH inferior a 4 (PESSEGUEIRO *et al.*, 2003).

Um estudo epidemiológico realizado no Brasil em 1975 evidenciou a disseminação de brucelose bovina. As prevalências encontradas em cada região do país foram: Norte, 4,1%; Nordeste, 2,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Sudeste, 7,5% e Sul, 4%. (BRASIL, 1977; BRASIL, 2006). Posteriormente, algumas pesquisas estaduais demonstraram alterações significativas. No Rio Grande do Sul, após a realização de um programa de vacinação bem sucedido, a prevalência de animais caiu de 2,0% em 1975 para 0,3% em 1986, no Paraná a prevalência caiu de 9,6% em 1975 para 4,6% em 1989, enquanto em Santa Catarina houve um aumento de 0,2% em 1975 para 0,6% em 1996 e no Mato Grosso do Sul, a prevalência manteve-se estável entre 1975 e 1998, com uma taxa de 6,3% (BRASIL, 2006). Em Minas Gerais, o estado com a maior produção de leite do Brasil, a prevalência caiu de 7,6% em 1975 para 6,7% em 1980 (CASTRO, 1982; BRASIL, 2006). A prevalência da brucelose bovina no Brasil variou entre 4% e 5% no período de 1989 - 1998 (BRASIL, 2006).

Embora a brucelose bovina continue se apresentando como um grave problema sanitário e econômico, principalmente em países da América do Sul, África, Oriente Médio e Ásia (CORBEL, 1997; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003), países da região central e norte da Europa, Canadá, Japão,

Austrália e Nova Zelândia, foram considerados livres de *B. abortus* e *B. melitensis* (OIE, 2016). No Brasil a brucelose é endêmica, porém a prevalência é muito variável devido à dimensão territorial e às características próprias de cada região (POESTER *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2008; LAGE *et al.*, 2008).

2.1.2 Tuberculose

A tuberculose bovina é uma zoonose de ocorrência mundial com alta prevalência nos países que se encontram em desenvolvimento e baixa prevalência em países desenvolvidos, principalmente devido à execução de programas de controle e erradicação realizados em conjunto com a inspeção de carnes e a pasteurização do leite (ABRAHÃO, 1998). Infecções por *Mycobacterium bovis* já foram identificadas na fauna silvestre, o que pode acarretar em graves consequências para os programas de controle e erradicação, uma vez que esses animais podem atuar como reservatório do bacilo bovino (BELCHIOR, 2001).

O gênero *Mycobacterium* é composto por bacilos curtos de 0,5 a 7,0 μM de comprimento por 0,3 μM de largura, aeróbios ou microaerófilos, imóveis, não capsulados, não flagelados, que apresentam aspecto granular quando corados e são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (BRASIL, 2006).

As micobactérias possuem cerca de 60% de lipídeos em sua parede celular, os ácidos micólicos são os principais responsáveis por conferir às micobactérias resistência à descoloração por álcool-ácido e à ação de diversos agentes químicos e antibióticos e capacidade de formar biofilmes (CASTRO; TRABULSI, 1998; ROSEMBERG; TARANTINO, 2002; GUMBER *et al.*, 2007; WILDNER *et al.*, 2011). O elevado conteúdo lipídico na parede celular das micobactérias também é responsável por importantes efeitos biológicos no hospedeiro, como por exemplo a formação de granulomas, indução de necrose e antigenicidade (BRASIL, 2005; COELHO; MARQUES, 2006).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) é composto por sete espécies, são elas: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* e *M. canetti*. As espécies que compõem o MTC apresentam estreita relação genética, mas exibem diferentes propriedades fenotípicas e preferências de hospedeiro, além de variar com relação à ocorrência geográfica, à patogenicidade e à resistência a antimicrobianos terapêuticos, o que traz diversas implicações nos âmbitos da saúde pública e defesa sanitária animal (AHMAD; BAYRAKTAR *et al.*, 2011). *M. bovis*, agente etiológico da tuberculose bovina, é a mais patogênica dentre as espécies do complexo e a que possui o maior número de hospedeiros, podendo ser encontrada em bovinos, caprinos, ovinos, suínos, equinos, cães, gatos, búfalos, raposas, ruminantes silvestres, primatas não humanos e humanos (RIVERA; GIMÉNEZ, 2010).

M. bovis é hospedeiro-dependente, no entanto, pode sobreviver por longos períodos no ambiente sob condições favoráveis (BARRERA, 2007; JORGE, 2011). O bacilo é moderadamente resistente ao calor, dissecação e diversos desinfetantes. Permanece viável em estábulos, pasto e esterco por até dois anos, até um ano na água e por até 10 meses em produtos de origem animal contaminados. São destruídos pela pasteurização do leite e por agentes desinfetantes como fenólicos, formólicos, álcool e hipoclorito de sódio (RUSSEL *et al.*, 1984; CASTRO *et al.*, 2009).

A prevalência média nacional da tuberculose avaliada entre 1989 e 1998 foi de 1,3% de animais reagentes à tuberculina. Mais recentemente, Roxo (2004) citada por Kantor e Ritacco (2006), estimou que na região Norte a prevalência foi de 3,62%, no Nordeste de 3,31%, já na região Centro-Oeste a prevalência foi de 0,37%, a mais baixa de todas as regiões do país, no Sudeste foi de 0,92% e Sul de 0,58%. Em propriedades com intensificação e tecnificação da produção e mecanização da ordenha ocorre um aumento da prevalência (BELCHIOR, 2001). A prevalência da tuberculose diagnosticada em exame *post mortem* de rotina em matadouros é subestimada, porque nem todas as lesões tuberculosas são identificadas no momento da inspeção (CORNER, 1994) e há casos de tuberculose que não apresentam lesões macroscópicas detectáveis no exame *post mortem* (BAPTISTA *et al.*, 2004).

De acordo com a lista do *World Animal Health Information System* da OIE atualizada em 2016 sobre a situação epidemiológica mundial da tuberculose, Bahamas, Emirados Árabes Unidos, Papua Nova Guiné, Austrália, Azerbaijão, Croácia, Cuba, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Israel, Japão, Quênia, Líbano, Lituânia, Sérvia, Suíça e Zimbábue são alguns dos países que não relatam casos da doença há no mínimo seis anos, com exceção da Alemanha que notificou em 2015 e da Suíça onde a doença ocorreu em 2014. Espanha, Sérvia e Montenegro, Polônia, Irlanda, Fiji e Bósnia e Herzegovina são países que apresentam infecção pelo agente sem manifestação clínica; Na Hungria, Argentina, Bulgária, Estados Unidos da América, França, Itália, México, Paquistão, Portugal, Sri Lanka e Ucrânia a doença foi notificada, mas está limitada a certas regiões desses países. No ano de 2016 foi relatado um surto não controlado da doença em animais domésticos na Nova Zelândia. Em setembro de 2016 a Bélgica notificou o reaparecimento da doença. Atualmente, cerca de 50 países notificaram a ocorrência de tuberculose com manifestação clínica (WAHIS, 2016). Alguns países como a Espanha, Grécia, Inglaterra, Itália, Irlanda, Portugal, Nova Zelândia, Canadá e EUA não conseguem erradicar dos seus rebanhos a infecção por *M. bovis*, apesar de possuírem eficientes sistemas de detecção de focos e programas de erradicação. Isto se deve, principalmente, à presença do agente em animais de vida selvagem como gambás, texugo e veado da cauda branca (DE LA RUA-DOMENECH, 2006; MATHEWS *et al.*, 2006; WHITE *et al.*, 2008; WAHIS, 2016). A distribuição mundial da tuberculose bovina está representada na figura 1.

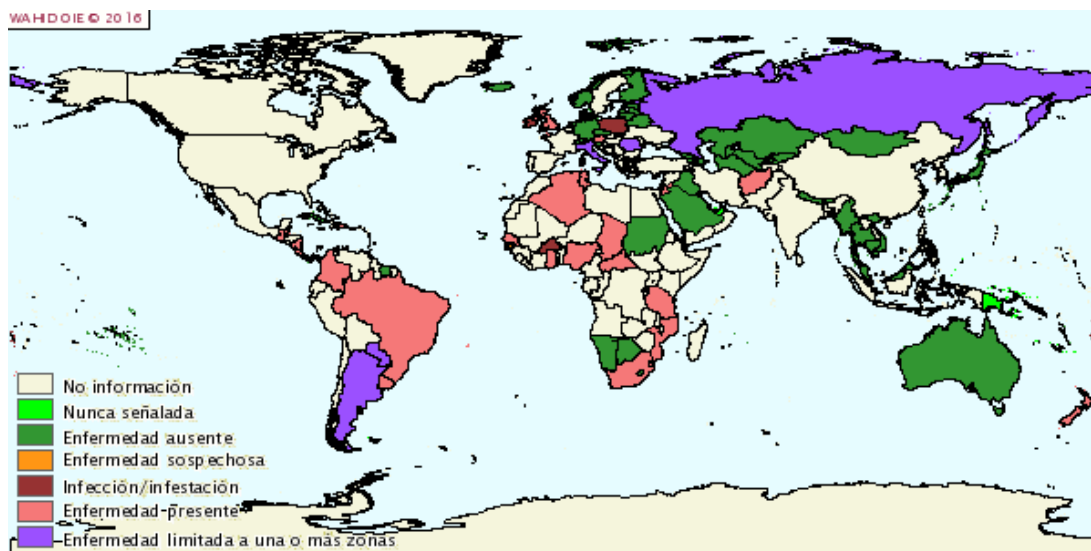


Figura 1 - Distribuição mundial da tuberculose bovina. Fonte: *Base de datos del Sistema Mundial de Información Zoosanitaria (WAHID)*, OIE.

2.2 Patogenia e Transmissão

2.2.1 Brucelose Bovina

A infecção natural por *Brucella abortus* se inicia principalmente pelas mucosas genital, do trato digestivo ou nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele, sendo a principal porta de entrada para os bovinos, a mucosa orofaríngea (BISHOP *et al.*, 1994; GORVEL; MORENO, 2002; CAMPANÃ *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2008). Após a penetração no organismo, as bactérias são fagocitadas principalmente pelos macrófagos e carregadas até os linfonodos regionais, onde se multiplicam e podem permanecer por semanas a meses, causando hiperplasia e linfadenite (BATHKE, 1988; BISHOP *et al.*, 1994; LAGE *et al.*, 2008; CARVALHO NETA *et al.*, 2009). A partir dessa multiplicação inicial nos linfonodos regionais, os microrganismos podem disseminar livremente ou no interior de macrófagos, pela via hemática e linfática alojando-se em outros linfonodos, principalmente nos supramamários, em órgãos como baço, fígado e em outros tecidos ricos em células mononucleares fagocitárias,

podendo sobreviver nesses locais por longos períodos escapando da resposta imune (HARMON *et al.*, 1988; GORVEL; MORENO, 2002; CAMPAÑA *et al.*, 2003; LAGE *et al.*, 2008; LIRA, 2008; MATRONE *et al.*, 2009; XAVIER, 2009). O mecanismo de permanência de *B. abortus* no interior de células de defesa está relacionado à síntese de enzimas antioxidantes e à produção de guanosina 5' monofosfato-GMP e adenina que atuam inibindo a fusão do lisossomo com o fagossomo impedindo assim a degranulação dos macrófagos durante a fagocitose e, conseqüentemente, a destruição do agente (ARÉSTEGUI *et al.*, 2001; BALDWIN; PARENT, 2002; CARVALHO NETA *et al.*, 2009).

Durante a fase de multiplicação celular pode ocorrer resposta inflamatória com modulação de macrófagos em células epitelióides e infiltração por plasmócitos e linfócitos, levando a alterações inflamatórias e anatomopatológicas caracterizadas por granulomas difusos, que pode culminar em hiperplasia linfóide, esplenomegalia e até hepatomegalia, dependendo da resistência natural e adquirida do hospedeiro e, principalmente, da carga bacteriana e da virulência da cepa (CORRÊA; CORRÊA, 1992; BISHOP *et al.*, 1994; LAGE *et al.*, 2008; CAMPOS *et al.*, 2009; MATRONE *et al.*, 2009). Os órgãos de predileção de *Brucella abortus* são aqueles que oferecem maior disponibilidade de elementos necessários para o seu metabolismo, como o eritritol (álcool polihídrico de quatro carbonos), que se encontra no útero gravídico, tecidos mamários e ósteoarticulares e em órgãos do sistema reprodutor masculino. Humanos, equinos, coelhos e roedores possuem ausência ou baixa produção de eritritol, fato que justifica o reduzido impacto da brucelose no aparelho reprodutivo dessas espécies (CARTER; CHENGAPPA, 1991; RIBEIRO *et al.*, 2008; XAVIER, 2009).

A infecção do útero gestante ocorre por via hematógena e as alterações variam de acordo com a intensidade da infecção e com o tempo de gestação. A afinidade de brucelas pelos trofoblastos parece estar relacionada à presença de elevadas concentrações de eritritol e progesterona na placenta (SILVA *et al.*, 2005). Nas fêmeas, a concentração de eritritol altera-se de forma gradativa conforme o período gestacional, atingindo níveis máximos próximo ao parto, o que estimula a multiplicação

da bactéria de forma crescente (CARTER; CHENGAPPA, 1991; BISHOP *et al.*, 1994; LAGE *et al.*, 2008). Neste período, ocorre a liberação de endotoxina (CARTER; CHENGAPPA, 1991), o que acredita-se ser a causa de lesões necrótico-inflamatórias na placenta, que causam a lise das vilosidades, resultando no descolamento dos cotilédones e no prejuízo na circulação materno-fetal, dificultando e até mesmo impossibilitando, a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, provocando assim danos que variam de nascimento de bezerros subdesenvolvidos ao aborto (BISHOP *et al.*, 1994; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; LAGE *et al.*, 2008; XAVIER, 2009). Devido ao desenvolvimento da imunidade celular do animal, após o primeiro aborto há uma diminuição significativa do número e tamanho das lesões nos placentomas nas gestações subsequentes. Por esse motivo os abortos tornam-se infrequentes, levando ao aparecimento de outras manifestações da enfermidade como a retenção de placenta, natimortalidade ou nascimento de bezerros fracos, além de quadros de metrite ou endometrite crônica e consequentemente subfertilidade, infertilidade ou esterilidade (LAGE *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008; XAVIER, 2009), com ou sem presença de corrimento vaginal (BATHKE, 1988; ACHA; SZYFRES 2001).

No aparelho reprodutor masculino, a presença de *B. abortus* pode levar à reação inflamatória do tipo necrosante nas vesículas seminais, testículos e epidídimos, com aumento de seu volume uni ou bilateral, provocando subfertilidade, infertilidade ou esterilidade nos bovinos. Como sequela pode haver atrofia do órgão afetado (GORVEL; MORENO, 2002; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; LAGE *et al.*, 2008; NOZAKI, 2008). No aparelho locomotor, *B. abortus* localiza-se na bursa, tendões, músculos e articulações, causando artrites, principalmente nas articulações carpianas e tarsianas; espondilites e bursites, especialmente nas vértebras torácicas e lombares, podendo atingir a medula óssea e bainha dos tendões, sendo o achado clínico clássico abscesso fistulado ou não, na região da cernelha ou da espinha da escápula; lesão conhecida como “mal da cernelha” ou “mal das cruzes”, que acomete principalmente os equinos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; RADOSTITS *et al.*, 2007). Inchaços nas articulações dos

joelhos e jarretes, conhecidos como higromas, também apresentam evidência de brucelose (RADOSTITS *et al.*, 2007; LAGE *et al.*, 2008).

As principais fontes de contaminação para os bovinos são fetos abortados, envoltórios fetais e descargas vaginais que contêm grande concentração do agente; em menor grau, as fezes de bezerros que se alimentam com leite contaminado podem contribuir com a contaminação do pasto, uma vez que nem todas brucelas são destruídas no trato gastrointestinal. (ACHA; SZYFRES, 2001). A transmissão venérea não é uma importante via de infecção em condições naturais, mas a inseminação artificial com sêmen contaminado é uma potencial fonte de contágio (RANKIN, 1965).

A susceptibilidade à infecção depende da idade, sexo, raça e estado gestacional. Os animais jovens, por exemplo, tendem a ser mais resistentes à infecção e frequentemente conseguem debelá-la, embora continuem portadores latentes. As novilhas portadoras latentes da infecção podem apresentar diagnóstico sorológico negativo ou títulos sorológicos instáveis e soroconverter a partir da metade da primeira gestação, podendo inclusive eliminar o agente etiológico. (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). A maioria dos animais infectados na fase adulta permanecem infectados por toda a vida. (WALKER, 2003).

B. abortus também pode infectar outras espécies domésticas, tais como equídeos, suínos, ovinos, caprinos, bubalinos e cães. Geralmente, não é transmitida aos suínos e, quando isso ocorre, a infecção é transitória, podendo servir de fonte de infecção para bovinos. Os ovinos são mais resistentes que caprinos, mas em ambos pode ocorrer infecção ocasional, sendo a epididimite e o abortamento os principais sintomas nos ovinos e caprinos, respectivamente (BATHKE *et al.*, 1988; CARTER; CHENGAPPA, 1991). Equídeos são menos sensíveis a *B. abortus* e são considerados hospedeiros terminais na cadeia de transmissão. Em búfalos, a brucelose apresenta-se de maneira similar à dos bovinos (OMS, 1986).

2.2.2 Tuberculose Bovina

A tuberculose é introduzida em um rebanho principalmente através da aquisição de animais infectados, podendo se propagar entre animais de qualquer idade, sexo ou raça (ABRAHÃO, 1998; FRANCO *et al.*, 2000). Alguns fatores de risco citados por Skuce, Allen e McDowell (2012) são a comercialização de bovinos, falhas no manejo do rebanho, densidade animal do rebanho e ocorrência da tuberculose em propriedades vizinhas ou áreas circundantes.

A tuberculose bovina geralmente é caracterizada pela formação de lesões do tipo granulomatosa, de aspecto nodular, denominadas tubérculo. Embora seja comumente definida como uma doença crônica debilitante, a tuberculose bovina pode ocasionalmente assumir um curso mais rápido. Qualquer tecido corporal pode ser afetado, mas as lesões são mais frequentemente observadas nos linfonodos (particularmente da cabeça e tórax), pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio (OIE, 2009). Quando a infecção ocorre por via digestiva, as lesões irão se localizar principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. No entanto, podem atingir outros órgãos se ocorrer generalização do processo (ROXO, 1996). Aproximadamente 90% das infecções por *M. bovis* em bovinos e bubalinos ocorrem pela via respiratória por meio da inalação de aerossóis contaminados com o microrganismo (BRASIL, 2006). As rotas de infecção nos bovinos são influenciadas por fatores como o ambiente, idade e manejo. A transmissão da tuberculose através da via respiratória é facilitada pelo comportamento natural do gado, especialmente em propriedades com alta densidade animal e significativo trânsito de animais (MORRISON *et al.*, 2000).

O alvéolo pulmonar é a principal porta de entrada do bacilo da tuberculose em bovinos, favorecendo o aparecimento de lesões principalmente nos gânglios brônquicos e/ou mediastínicos. Uma vez instalado no alvéolo, o bacilo é capturado por macrófagos alveolares ativados por linfócitos do tipo T, e seu destino será determinado por fatores como a virulência do microrganismo, a carga infectante e a resistência do

hospedeiro (SOUZA *et al.*, 1999; BRASIL, 2006). Caso não sejam eliminados pelo organismo, os bacilos se multiplicarão dentro de macrófagos até destruí-los. Uma vez liberados pelos macrófagos infectados, os bacilos serão fagocitados por outros macrófagos alveolares ou por monócitos recém-chegados através da corrente circulatória, atraídos pelos próprios bacilos liberados, ou por fatores quimiotáticos produzidos pelo hospedeiro. Cerca de duas a três semanas após a inalação do agente infeccioso, o bacilo cessa sua multiplicação e ocorre resposta imune mediada por células e reação de hipersensibilidade retardada desencadeada pela ativação dos macrófagos por interferon gama (IFN γ), interleucina-2 (IL-2) e citocinas liberadas por linfócitos T auxiliares (Th1), aproximadamente dez dias após o início da infecção (BRASIL, 2006). Dentro de focos infectados, os macrófagos assumem frequentemente uma aparência de células epitelióides e células gigantes do tipo Langhans que são formadas devido à fusão de macrófagos. O centro do tubérculo é formado pela associação de células gigantes e de células epitelióides, circundadas por uma zona de linfócitos, células plasmáticas e de monócitos. Com a evolução da lesão, o tubérculo desenvolve fibroplasia periférica e necrose caseosa que é resultante da hipersensibilidade retardada tipo IV, podendo-se observar mineralizações por precipitação de sais de cálcio. Com a mediação de linfócitos T, ocorre a migração de novas células de defesa, culminando com a formação de granulomas. A aparência normalmente é de um nódulo firme branco ou amarelado e é comum a calcificação e áreas de necrose caseosa (NEILL *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 1999). Os bacilos da lesão tuberculosa do parênquima pulmonar propagam-se para o linfonodo satélite, no qual desencadeiam a formação de novo granuloma, constituindo assim, o complexo primário (BRASIL, 2006). Pode existir ainda um tecido conjuntivo fibroso encapsulando a lesão que tem a função de confinar os bacilos tuberculosos (QUINN *et al.*, 2004; CASSIDY, 2006)

Em bovinos, as lesões do complexo primário podem persistir, com ou sem progressão, ou podem ser completamente curadas. O desenvolvimento das lesões pode envolver o pulmão de forma uni ou bilateral, predominantemente nos lobos caudais e muitas vezes no terço distal destes lobos. A tuberculose pleural pode resultar diretamente de uma expansão das

lesões subpleurais ou se espalhar através da linfa ou do sangue e possui característica nodular, com lesões frequentemente agrupadas que podem se tornar fortemente calcificadas. A pleurite caseosa difusa ocorre com menor frequência e apresenta-se como grandes placas caseosas entre camadas pleurais mais espessas (NEILL *et al.*, 2001). Ainda podem ocorrer formas intestinais da doença com envolvimento dos linfonodos mesentéricos, sugerindo uma infecção por via oral ou reinfecção devido à deglutição de muco contaminado (CASSIDY, 2006; LIÉBANA *et al.*, 2008).

A disseminação do agente para outros órgãos pode ocorrer precocemente durante o desenvolvimento da doença ou numa fase tardia, provavelmente em função de uma queda na imunidade do animal. Essa generalização pode ocorrer de maneira abrupta e maciça, devido à entrada de grande carga bacilar na circulação, caracterizada pela forma miliar que consiste em discretas lesões espalhadas por vários órgãos; ou, de maneira mais comum, na forma protraída através das vias sanguínea e linfática podendo acometer o pulmão, linfonodos, fígado, baço, úbere, ossos, rins e até o sistema nervoso central, disseminando-se por praticamente todos os tecidos (NEILL *et al.*, 2005; BRASIL, 2006).

Embora possam estar presentes em qualquer tecido do animal, os granulomas são encontrados com maior frequência em linfonodos (mediastínicos, retrofaríngeos, bronquiais, parotídeos, cervicais, inguinais superficiais e mesentéricos), em pulmão e fígado. A secção de órgãos e tecido pode ser necessária para visualizar a lesão (BRASIL, 2006; OIE, 2009).

Por ser uma doença de curso crônico e evolução lenta, os sinais clínicos são pouco frequentes em bovinos e bubalinos, mesmo em casos avançados com o envolvimento de vários órgãos. Quando presentes, os sinais clínicos são variáveis. O envolvimento pulmonar pode manifestar-se por tosse, que pode ser induzida por alterações na temperatura ou por pressão manual sobre a traquéia. Dispneia e outros sinais de pneumonia de baixo grau também são evidência de envolvimento pulmonar. Em casos mais avançados, pode ocorrer hiperplasia de linfonodos superficiais e/ ou profundos que podem obstruir as passagens aéreas, o trato digestivo ou os vasos sanguíneos. O envolvimento do trato digestivo pode se manifestar

através de diarreia intermitente e constipação em alguns casos. Podem ocorrer ainda casos de mastite e infertilidade. Ruptura e drenagem dos linfonodos da cabeça e do pescoço, caquexia progressiva e extrema e sofrimento respiratório agudo podem ocorrer durante os estágios terminais da tuberculose. Podem ocorrer ainda, lesões envolvendo a genitália feminina. A genitália masculina raramente está envolvida (BRASIL, 2006; OIE, 2009).

A principal via de transmissão de *M. bovis* é a via aerógena, através da inalação de aerossóis expectorados por outros mamíferos com tuberculose ativa. Em função do tamanho reduzido, os aerossóis podem permanecer no ar com micobactérias viáveis por vários minutos ou até horas (AHMAD, 2011). Também pode ocorrer infecção por via oral através da ingestão de *M. bovis* em leite, pastos e água contaminados, tendo em vista a capacidade do microrganismo de sobreviver no meio ambiente. Porém, esta é considerada uma forma de propagação secundária à respiratória (PALMER; WALTERS, 2006). A via oral é a principal porta de entrada em bezerros alimentados com leite proveniente de vacas com mastite tuberculosa. Nesse caso, o complexo primário irá se localizar nos órgãos digestivos e linfonodos regionais. Um bovino infectado, sem sinais clínicos, pode excretar até 10^3 UFC de *M. bovis* por mililitro de leite (GARRO *et al.*, 2011). Mais raramente podem ocorrer casos de infecção congênita. Nesses casos a transmissão acontece via vasos sanguíneos umbilicais para o feto a partir de infecção presente no útero da fêmea, ou através da ingestão de líquido amniótico infectado, que leva ao desenvolvimento de lesões nos intestinos ou nos linfonodos mesentéricos, e por inalação do mesmo, que resulta em doença pulmonar. Em raras ocasiões, a transmissão da tuberculose por via genital pode ocorrer nos bovinos se houver lesões da infecção no pênis e vulva ou nas mucosas prepucial e vaginal (MURAKAMI *et al.*, 2009).

Mesmo antes de desenvolver lesões teciduais, o bovino infectado já é capaz de disseminar *M. bovis* através de secreção nasal, leite, fezes, urina, secreções vaginais e uterinas, sêmen e de material purulento drenado de abscessos cutâneos ou de fistulações de linfonodos periféricos (MCILROY *et al.*, 1986; ROXO, 1997; RADOSTITS *et al.*, 2007). As vias de infecção

referidas com menor frequência são intrauterina, cutânea, inseminação artificial com sêmen contaminado e coito. (NEILL *et al.*, 1994; ROXO, 1997). Os bovinos são muito resistentes à infecção por *M. tuberculosis* e por isso a sua ocorrência é pouco comum. Em raros casos ocorre o desenvolvimento de lesões, mas os bacilos podem sobreviver por algum tempo nos tecidos desses animais, principalmente nos linfonodos, podendo gerar reação cruzada no teste de tuberculinização para tuberculose bovina (ACHA; SZYFRES, 2001).

Outras espécies de animais assumem papel importante como reservatório de *M. bovis*, podendo introduzir ou reintroduzir a doença em rebanhos bovinos. Em países desenvolvidos, onde a tuberculose bovina encontra-se em fase final de erradicação ou já erradicada, os principais reservatórios desse agente são animais silvestres. No Brasil, certamente existem espécies silvestres suscetíveis a *M. bovis*, mas a importância desses animais como reservatório do agente para bovinos é desconhecida (BRASIL, 2006).

2.3 Diagnóstico e Controle

Com o objetivo de erradicar a brucelose e a tuberculose bovinas, em 2001 o governo brasileiro criou o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, que estabelece a realização do diagnóstico e normatiza as medidas de controle dessas zoonoses. As propostas técnicas do PNCEBT objetivam a certificação de propriedades livres ou monitoradas; o credenciamento e capacitação de médicos veterinários para efetuar o diagnóstico a campo; o controle do trânsito de animais; a criação de normas sanitárias para participação em exposições, feiras, leilões e outras ocasiões em que ocorrem aglomerações de animais; o diagnóstico e apoio laboratorial; a participação no serviço social e educação sanitária (BRASIL, 2006).

A estratégia do PNCEBT consiste em um conjunto de medidas sanitárias compulsórias, associadas às ações de adesão voluntária, que dizem respeito à certificação de propriedades livres e de propriedades monitoradas. Para certificação de uma propriedade como livre de brucelose e tuberculose, os testes em todo o rebanho devem ser repetidos até a obtenção de três testes sem um único animal reagente positivo, ao longo de um período mínimo de nove meses. A manutenção do *status* de livre das propriedades depende do cumprimento de todas as regras e normas sanitárias estabelecidas pelo PNCEBT. Propriedades especializadas na bovinocultura de corte podem obter um certificado de propriedade monitorada para brucelose e tuberculose, pois a criação extensiva e o grande número de animais dificulta a realização dos testes necessários para a obtenção do certificado de livre. Propriedades certificadas como livres ou como monitoradas para tuberculose e brucelose só podem adquirir novos animais provenientes de propriedades de condição sanitária igual ou superior, ou com dois testes negativos para estas enfermidades (BRASIL, 2006).

Existem alguns fatores que interferem no êxito do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose, são eles: o tamanho do rebanho nacional e a extensão territorial do país; as grandes diferenças regionais quanto à infraestrutura e condições socioeconômicas; a heterogeneidade do modo de produção e da situação sanitária das propriedades; a insuficiência de recursos financeiros destinados aos órgãos oficiais que se ocupam da saúde animal; a inexistência de fundos para indenização dos criadores que abatem animais reagentes (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997; SCHILLER *et al.*, 2010); o abate clandestino de animais e o comércio clandestino de leite (COSTA, 2008).

As estratégias de controle da brucelose e da tuberculose têm como princípios a redução constante do número de focos dessas doenças, o controle do trânsito de animais, a certificação de propriedades livres das enfermidades através do diagnóstico, o sacrifício de animais reagentes positivos e a adoção de medidas ambientais (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Devido às perdas econômicas e à importância que exercem para a saúde pública, essas doenças devem ser eliminadas dos rebanhos, para que

seus impactos na pecuária e na população humana sejam minimizados (BRASIL, 2006).

A inspeção sanitária dos produtos de origem animal destinados ao consumo humano e a pasteurização ou esterilização do leite e derivados, são importantes medidas preventivas para brucelose e tuberculose devido ao caráter zoonótico dessas enfermidades (BRASIL, 2006).

Os testes realizados no Brasil para o diagnóstico de brucelose e de tuberculose seguem as recomendações do Código Zoossanitário Internacional da OIE. Entretanto, o MAPA permite a atualização dos métodos de diagnóstico à medida que novos e melhores testes forem surgindo. As técnicas moleculares já são utilizadas nos programas de controle e erradicação de tuberculose, de forma complementar aos procedimentos bacteriológicos clássicos (BRASIL, 2006).

2.3.1 *Brucelose Bovina*

A brucelose é diagnosticada por diferentes métodos que se complementam: o diagnóstico clínico, que se baseia nos sinais e sintomas, o epidemiológico, baseado no histórico do rebanho, da propriedade e da região, e através de métodos laboratoriais diretos, ou por meio da detecção de anticorpos contra *B. abortus* por métodos indiretos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006). No Brasil somente laboratórios oficiais credenciados e laboratórios credenciados pelo Departamento de Defesa Animal (DDA) podem realizar o diagnóstico de brucelose através de testes determinados pelo mesmo. Os testes de diagnóstico para brucelose devem ser realizados exclusivamente em fêmeas de idade igual ou superior a 24 meses, que tenham sido vacinadas entre três e oito meses. Em machos e em fêmeas não vacinadas, o diagnóstico deve ser realizado a partir dos oito meses de idade (BRASIL, 2006).

Os testes sorológicos se baseiam na presença de anticorpos contra *Brucella abortus* em vários fluidos corporais, como soro sanguíneo, leite, muco vaginal e sêmen. Ainda não existe uma técnica sorológica que preencha todos os requisitos necessários para ser aplicada com

confiabilidade no diagnóstico da brucelose. Reações falso-positivas podem ocorrer devido à presença de anticorpos não específicos como consequência de infecções por outras bactérias (CORBEL, 1985; OMS, 1986; BRASIL, 2006), como resultado da vacinação com B19 após a idade recomendada (BRASIL, 2006), ou ainda devido à presença de anticorpos colostrais, no caso de animais com até quatro meses de idade (BISHOP *et al.*, 1994). As principais causas de resultados falso-negativos são a infecção recente, o fenômeno prozona (que pode ser solucionado com diluições da amostra) e a proximidade do teste com o parto ou aborto (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A quantidade de testes indiretos disponíveis para o diagnóstico de brucelose é bastante ampla e cada país, segundo suas disponibilidades e características, deve escolher aqueles que melhor se adaptem à sua estratégia (BRASIL, 2006; OIE, 2016). A escolha dos métodos sorológicos precisa levar em consideração o tamanho e as características da população sob vigilância, o custo, a situação epidemiológica da doença, a sensibilidade e a especificidade dos testes e o *status* vacinal dos animais (BRASIL, 2006).

No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os seguintes testes de triagem: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Teste do Anel em Leite (TAL), que podem ser realizados por médico veterinário habilitado, laboratório oficial credenciado e demais laboratórios credenciados. Os testes definidos para confirmação do diagnóstico são: 2- Mercaptoetanol (2-ME), que pode ser realizado por laboratório oficial credenciado e demais laboratórios credenciados, a Reação da Fixação de Complemento (RFC), que pode ser realizada apenas em laboratório oficial credenciado e o Teste da Polarização Fluorescente (TPF), que pode ser utilizado como teste confirmatório ou como teste único e deve ser realizado em laboratórios credenciados ou em laboratórios oficiais credenciados (BRASIL, 2006).

O AAT é o teste de triagem do rebanho e a maioria dos soros de animais bacteriologicamente positivos apresenta reação a essa prova. Como podem ocorrer casos de reações falso-positivas em decorrência da utilização da vacina B19, a confirmação dos resultados positivos é realizada por meio de testes de maior especificidade para evitar o sacrifício de animais não infectados (NIELSEN, 2002; BRASIL, 2006; OIE, 2016).

O TAL foi idealizado para ser aplicado em misturas de leite de vários animais e pode ser utilizado para monitoramento da condição sanitária de propriedades livres ou como ferramenta de diagnóstico em sistemas de vigilância epidemiológica (BRASIL, 2006), porém, podem ocorrer resultados falso-positivos em presença de leites ácidos ou provenientes de animais portadores de mastite e em leite de animais em início de lactação (colostro) ou que foram vacinados menos de quatro meses antes do teste (BRASIL, 2006; OIE, 2016). Portanto, a execução desse teste não é recomendável em fazendas com um rebanho pequeno onde esses problemas podem exercer um grande impacto no resultado (OIE, 2016).

O teste do 2-ME é uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro e deve ser executado sempre em paralelo com a soroaglutinação em tubos (FERRI et al., 1977; TIMONEY et al., 1988). A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), frente ao soro tratado com 2-ME (BRASIL, 2006).

O teste de SAT que também pode ser chamado de prova lenta, porque a leitura dos resultados é feita após 48 horas, é utilizado em associação com o teste do 2-Mercaptoetanol para confirmar resultados positivos em provas de triagem. A prova costuma apresentar resultados falso-negativos no caso de infecção crônica e, em algumas situações, podem aparecer títulos significativos em animais não infectados por *B. abortus* como decorrência de reações cruzadas com outras bactérias. Uma proporção importante de animais vacinados com B19 acima dos oito meses pode apresentar títulos de anticorpos para essa prova por um longo período de tempo ou permanentemente (BRASIL, 2006).

A RFC tem sido empregada em diversos países que conseguiram erradicar a brucelose ou que estão em fase de erradicação e é o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais (BRASIL, 2006). A técnica se baseia na habilidade do complexo antígeno-anticorpo em ativar o sistema complemento e com isso detectar precocemente IgG1 no soro. A RFC também é capaz de revelar casos em que os níveis de IgG1 são baixos, devido ao seu baixo limiar de detecção (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Esse é um teste trabalhoso e complexo, que exige pessoal treinado e laboratório bem equipado (BRASIL, 2006).

O TPF se baseia nas diferenças rotacionais entre a molécula de antígeno solúvel (LPS) e o complexo antígeno-anticorpo (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Por meio da utilização de controles e de soro pré-titulado, é possível calcular a quantidade de anticorpos presente no soro testado (NIELSEN *et al.*, 1996; BRASIL, 2006; OIE, 2016).

Os métodos diretos de diagnóstico da brucelose incluem o isolamento e a identificação do agente, a imunohistoquímica e os testes de detecção de ácidos nucleicos, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) (BRASIL, 2006). Esses métodos são usados após a manifestação de sintomas clínicos, que normalmente ocorrem quando a bactéria já está disseminada no rebanho, tornando importante a confirmação de focos da doença e a caracterização do agente (MATRONE, 2009; VEJARANO RUIBAL, 2009). Na estrutura de um programa de controle e erradicação, os animais positivos para os métodos indiretos devem ser submetidos ao abate sanitário, durante o qual são colhidas amostras para o diagnóstico direto (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Classicamente, o diagnóstico direto da brucelose é realizado a partir do cultivo, isolamento e identificação do gênero *Brucella* através de material de aborto ou de secreções como leite, sêmen e líquido sinovial de articulações comprometidas (CARTER; CHENGAPPA, 1991; NIELSEN, 2004; LAGE *et al.*, 2008; VEJARANO RUIBAL, 2009).

O isolamento de *Brucella* spp. é um processo trabalhoso e demorado, levando em consideração a sensibilidade e as exigências com relação aos meios de cultivo, além de se constituir um patógeno de alto risco biológico, sendo necessários laboratórios com funcionários qualificados e instalações e equipamentos de proteção de nível 3 (POESTER *et al.*, 2005; LAGE *et al.*, 2008). A identificação de *Brucella* deve ser realizada com uma combinação dos seguintes testes: morfologia após a coloração de Gram, observação direta da morfologia da colônia, características do crescimento, testes de urease e oxidase e teste de aglutinação em soro policlonal anti-*Brucella* (OIE, 2016). A identificação das diferentes espécies e biovars de *Brucella* pode ser realizada através da análise de características fenotípicas, incluindo tipificação sorológica para os antígenos A, M, e R, fagotipagem e

provas bioquímicas que identificam diferenças metabólicas entre espécies e biotipos (ALTON *et al.*, 1988; METCALF *et al.*, 1994; CLOECKAERT; VIZCAINO, 2004; OIE, 2016). Uma vantagem deste método direto é a sua especificidade. Entretanto, devido ao risco de contaminação humana durante o processamento da amostra, poucos são os laboratórios que realizam este exame (BRASIL, 2006).

O controle da brucelose bovina é baseado na vacinação em massa das fêmeas. As vacinas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) são a B19 e a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes, RB51. Ambas boas indutoras de imunidade celular (BRASIL, 2006).

A vacina B19 é produzida com amostra viva atenuada de *B. abortus* bv. 1 estirpe B19 e apresenta características importantes como: permitir a vacinação de fêmeas entre três e oito meses de idade conferindo imunidade prolongada; prevenir o aborto; ser estável e não se multiplicar na presença de eritrol; ser atenuada para bovinos, causando reações mínimas após a sua aplicação, além de conferir proteção em 70% a 80% dos animais vacinados (NICOLETTI, 1980; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006). A idade de vacinação das fêmeas deve ser seguida rigorosamente, pois após oito meses de idade existe a probabilidade de uma grande produção de anticorpos que podem perdurar e interferir no diagnóstico da doença, inclusive após os 24 meses. Não se recomenda a vacinação de machos nem de fêmeas em gestação, devido à virulência residual que a cepa conserva (BRASIL, 2006, LAGE *et al.*, 2008). A resistência conferida ao rebanho pela vacina B19 reduz a severidade dos sinais clínicos de forma significativa e, com isso, a quantidade de agentes patogênicos eliminados no ambiente pelos animais infectados também será reduzida (NICOLETTI, 1980; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; LAGE *et al.*, 2008).

Diante da necessidade de uma amostra vacinal que não provocasse a indução de anticorpos vacinais, a vacina RB51 não indutora de anticorpos aglutinantes foi desenvolvida. Essa amostra possui características de proteção semelhantes às da B19, porém, por ser rugosa, previne a formação de anticorpos reagentes aos testes sorológicos de rotina (POESTER, 2006; LAGE *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008). Em alguns países esta vacina é empregada oficialmente nos programas de controle de brucelose, mas no

Brasil sua utilização é restrita à vacinação estratégica de fêmeas adultas (BRASIL, 2006).

2.3.2 Tuberculose Bovina

O diagnóstico da tuberculose bovina deve ser realizado em todos os animais com idade igual ou superior a seis semanas através de métodos diretos e indiretos. Os diretos envolvem a detecção e identificação do agente etiológico no material biológico. Nessa categoria encontram-se a histopatologia, bacteriologia e os métodos moleculares. Os indiretos pesquisam uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral, através da produção de anticorpos circulantes, ou celular, mediada por linfócitos e macrófagos. A reação tuberculínica, a bacteriologia e a histopatologia, em interação com os achados epidemiológicos, são os métodos mais utilizados para o diagnóstico da tuberculose bovina e bubalina. A grande inespecificidade dos sinais clínicos, a dificuldade de isolamento de *M. bovis* do animal vivo e o baixo nível de anticorpos circulantes durante o período inicial da infecção, fazem com que os diagnósticos clínico, bacteriológico e sorológico tenham um valor relativo (MELO *et al.*, 1999; BRASIL, 2006), proporcionando apenas um diagnóstico presuntivo (SOUZA *et al.*, 1999).

Pode-se afirmar que existem metodologias adequadas ao desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, entretanto, não existe um método de diagnóstico que tenha eficácia absoluta para essa doença. A prova tuberculínica, a vigilância epidemiológica em matadouros, o controle sanitário dos rebanhos e o diagnóstico laboratorial, são elementos que devem ser empregados com critério e de modo adequado a cada situação epidemiológica. Sejam quais forem os métodos de diagnóstico utilizados, é fundamental que os animais sabidamente positivos sejam abatidos a fim de evitar a disseminação do agente (COSIVI *et al.*, 1998; BRASIL, 2006).

O diagnóstico alérgico-cutâneo é o instrumento básico para programas de controle e erradicação da tuberculose bovina preconizado em

todo o mundo e é considerado pela OIE como técnica de referência (BRASIL, 2006; COSTA, 2008). Para que realmente funcione como ferramenta diagnóstica em um programa de controle, é indispensável que o procedimento seja padronizado quanto à produção das tuberculinas, equipamentos para realização das provas, tipos de provas e critérios de leitura (BRASIL, 2006). A sensibilidade do teste de tuberculinização varia entre 68% e 95%, enquanto sua especificidade foi estimada entre 95%-99% (CORRÊA; CORRÊA, 1982). Reações falso-negativas podem ocorrer em algumas situações, são elas: três a seis semanas após a infecção, o que pode ser evitado adiando o teste em casos de suspeita de contato recente com animais infectados (OIE, 2009); deficiência temporária do sistema imune induzida por inoculações sucessivas de tuberculina ou aplicação de altas concentrações do antígeno, denominada dessensibilização, que possui curta duração e cessa quando a população de linfócitos T é restabelecida (BRASIL, 2006); período de periparto (três semanas pré e pós-parto); desnutrição; uso inadequado de drogas imunossupressoras (LILENBAUM, 2000); casos de tuberculose generalizada ou em estágios finais da doença, nos quais há um excesso de antígeno circulante que induz uma imunossupressão específica e, por consequência, ocorre inibição da produção de citocinas necessárias à ativação de macrófagos participantes da reação de hipersensibilidade retardada, fenômeno denominado anergia, neste caso o exame clínico auxilia o diagnóstico (BRASIL, 2006). Reações falso-positivas podem ocorrer em casos de sensibilização causada por outras micobactérias e por inflamação local (OIE, 2009). A comparação entre a resposta induzida pelo PPD bovino e pelo PPD aviário permite a ampliação da especificidade do teste (PALMER; WATERS, 2006).

A reação alérgica à tuberculina é uma reação de hipersensibilidade retardada tipo IV mediada por resposta celular e com baixa produção de anticorpos. Essa resposta é desencadeada pela ativação dos macrófagos por interferon gama ($IFN \gamma$), interleucina-2 (IL-2) e citocinas liberadas por linfócitos T auxiliares (Th1) aproximadamente dez dias após o início da infecção e se manifesta macroscopicamente na forma de edema e endurecimento progressivo no local da aplicação da tuberculina que atinge seu máximo após 72 ± 6 horas. A intensidade da reação cutânea pode ser

mensurada pelo tamanho do edema e do endurecimento da pele (BRASIL, 2006).

O teste preconizado pela legislação em vigor no Brasil para o diagnóstico da tuberculose em bovinos e bubalinos vivos é o intradérmico nas suas três modalidades: prega ano-caudal (apenas para gado de corte), cervical simples e cervical comparativo, e deve ser realizado exclusivamente por médicos veterinários habilitados pelo MAPA em animais com idade igual ou superior a seis semanas. Fêmeas que estiverem no período compreendido entre 15 dias antes e 15 dias depois do parto não devem ser submetidas ao teste (BRASIL, 2006).

Uma alternativa usada em regiões de menor prevalência da doença é o teste do interferon gama (IFN- γ) se baseia na dosagem dessa citocina em amostras de sangue de animais com suspeita de infecção por *M. bovis*, após um período de incubação de 16-24 horas com antígeno específico (PPD bovino e aviário) (WOOD; ROTHEL, 1994; RUGGIERO *et al.*, 2007). Bovinos infectados após um período de uma a quatro semanas, já apresentam células T no sangue periférico capazes de liberar *in vitro* quantidades mensuráveis de IFN- γ quando estimuladas por antígeno específico (RYAN *et al.*, 2000; COAD *et al.*, 2007; OIE, 2009). Esse teste foi aprovado para utilização em vários programas nacionais, incluindo a União Europeia (UE), os EUA, a Nova Zelândia e a Austrália (OIE, 2009).

O diagnóstico anatomopatológico é uma importante ferramenta no diagnóstico da tuberculose bovina e se baseia na inspeção de carcaça ou necropsia detalhada do animal (BRASIL, 2006). Lesões granulomatosas provocadas por *M. bovis* não são patognomônicas da tuberculose bovina e também podem ocorrer nas infecções por *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus lignieresii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus equi*, por parasitas, fungos e em alguns processos neoplásicos como carcinomas e sarcomas (JENSEN *et al.*, 1990; OHARA, 2006). No Brasil, a inspeção das carcaças é determinada pelo Artigo 196 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), com o objetivo de garantir que todos os órgãos sejam examinados na sala de matança, imediatamente após a sua remoção, com identificação correspondente à carcaça. Segundo critérios estabelecidos

pelo RIISPOA, carcaças com lesões suspeitas de tuberculose podem ser destinadas a condenação total, rejeição parcial ou aproveitamento condicional à esterilização pelo calor, o que vai depender da localização, extensão, quantidade e característica das lesões encontradas (BRASIL, 1997).

O diagnóstico histopatológico é complementar ao exame *post mortem* e consiste na análise de fragmentos de lesões presuntivas de tuberculose, coletadas em carcaças submetidas à inspeção (WATRELOT-VIRIEUX *et al.*, 2006) e pode ser aplicado principalmente em regiões de alta prevalência da doença, pois apresenta resultado para o diagnóstico presuntivo mais rápido, que deve ser confirmado posteriormente através do cultivo da amostra (CORNER, 1994). A morfologia das lesões histopatológicas granulomatosas características da tuberculose, apresenta-se como uma área central de necrose caseosa, que pode estar mineralizada, circundada por células gigantes tipo Langhans, células epitelióides, histiócitos e, na periferia, ocorre presença de mononucleares, linfócitos e raros plasmócitos, circundados por tecido conjuntivo fibroso, configurando o folículo tuberculoso (OLIVEIRA *et al.*, 1986; LAISSE *et al.*, 2011).

O isolamento e a identificação do agente são considerados padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose e devem ser realizados por laboratório de referência com nível de biossegurança 3 para a obtenção de um diagnóstico definitivo (BRASIL, 2006; SAKAMOTO *et al.*, 2008).

Para o isolamento de *M. bovis*, o meio de cultura mais recomendado é o Stonebrink-Leslie que não possui glicerina e sim piruvato de sódio como fonte de carbono (HAAGSMA, 1995) e as amostras devem ficar incubadas a uma temperatura de 36°C a 37°C, por até 90 dias, com o objetivo de observar a multiplicação bacteriana (BRASIL, 2006). A caracterização da multiplicação em diferentes meios e a morfologia bacilar podem promover a identificação presuntiva de *M. bovis*. A confirmação é realizada por exames microscópicos através da coloração de Ziehl-Neelsen, testes bioquímicos e técnicas moleculares (ROWE; DONAGHY, 2008). A identificação da espécie por meio de provas bioquímicas é trabalhosa, requer cultura nova, pura e abundante, condição só alcançada após sucessivos repiques a partir do

isolamento primário (CORNER, 1994; PINTO *et al.*, 2002; MICHEL *et al.*, 2010).

O diagnóstico através do isolamento e identificação do agente pode apresentar baixa sensibilidade devido a alguns fatores como: o método de descontaminação da amostra, que pode eliminar também alguns bacilos dificultando o isolamento; a necessidade de as lesões apresentarem uma concentração de bactérias igual ou superior a 10^4 UFC/mL; o tempo necessário para se observar a multiplicação das micobactérias que pode ser de mais de 12 semanas (CORNER, 1994; WARDS *et al.*, 1995; ZANINI *et al.*, 2001).

A aplicação de uma metodologia de diagnóstico molecular que permita a detecção rápida de *M. bovis* diretamente em amostras biológicas é uma interessante alternativa para a confirmação de existência da doença, a ser utilizada na vigilância epidemiológica de animais abatidos em matadouro e em programas de erradicação, principalmente pelas limitações quanto à sensibilidade e especificidade do teste de reação cutânea e o longo período para a confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos de rotina (RORING *et al.*, 2000; ZANINI *et al.*, 2001). Devido à lentidão das análises bacteriológicas, testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) são realizados, paralelamente ao isolamento, no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do LANAGRO/MG, pois são mais rápidos e permitirão confirmação dos resultados obtidos no exame bacteriológico (LOPES FILHO, 2010).

2.4 Testes Moleculares - PCR em tempo real (qPCR)

Ensaio de diagnóstico baseado na biologia molecular têm sido amplamente utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas em medicina humana e veterinária. As características de alta sensibilidade e especificidade, aliadas à rapidez da resposta diagnóstica, estimulam sua utilização como ferramenta diagnóstica tanto para a identificação de

patógenos em indivíduos isolados quanto para vigilância populacional (DRIGO *et al.*, 2014).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada uma técnica promissora para o diagnóstico rápido da brucelose e da tuberculose, que apresenta as vantagens de ser sensível e específica e de reduzir o tempo de diagnóstico quando comparada aos métodos tradicionais, sendo capaz de detectar poucos bacilos na amostra, inclusive os inviáveis. Com isso, amostras que não são preservadas de maneira adequada ao isolamento bacteriano, podem ser utilizadas no diagnóstico molecular (BEIGE *et al.*, 1995; ABRAHÃO, 1998; NARAYANAN, 2004). As principais dificuldades para aplicação do método de PCR na rotina laboratorial são a extração do DNA e a escolha correta dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), características que são essenciais para o êxito de uma PCR (ZANINI *et al.*, 2001; KHAN; YADAV, 2004; ZUMÁRRAGA *et al.*, 2005). Os *primers* são considerados fundamentais para garantir a especificidade da reação, uma vez que a amplificação do DNA só será possível se houver a hibridização do *primer* com a sequência alvo do DNA extraído da amostra. Os fragmentos amplificados podem ser visualizados em gel de eletroforese corado com brometo de etídio, por *primers* marcados com isótopos radioativos ou fluorescentes e ainda empregando-se métodos enzimáticos ou de quimiluminescência (ANDRADE, 1993; COLLINS *et al.*, 1994; ABRAHÃO, 1998). A PCR pode ser usada para qualquer tipo de amostra biológica, porém algumas matrizes podem conter inibidores da PCR que levam a um resultado falso negativo (MICHEL *et al.*, 2010) e por isso é necessário um protocolo de extração que concentre o DNA, reduza ao máximo os fatores inibidores presentes nos fluidos biológicos, que seja simples, reproduzível, seguro e capaz de prever contaminações cruzadas entre as amostras (RANTAKOKKO-JALAVA; JALAVA, 2002).

Uma variação da PCR é a multiplex, que utiliza vários conjuntos de pares de *primers* específicos para determinadas regiões do genoma bacteriano em uma mesma reação e tem sido aplicada na diferenciação entre as bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, do complexo *Mycobacterium avium* e outras micobactérias atípicas e entre espécies de bactérias de um mesmo gênero (YEBOAH-MANU *et al.*, 2001; PARRA *et al.*,

2008). Uma PCR multiplex denominada AMOS foi desenvolvida por Bricker e Halling (1994) para a diferenciação entre espécies de *Brucella*. Os autores utilizaram cinco *primers* capazes de identificar os biovars 1, 2 e 4 de *Brucella abortus*, todos os três biovars de *B. melitensis*, o biovar 1 de *B. suis* e todos os biovars de *B. ovis*. Este ensaio explora o polimorfismo decorrente da localização espécie-específica do elemento genético *is711* no cromossomo de *Brucella*.

Com o advento da PCR em tempo real (qPCR) que se baseia na utilização de compostos fluorescentes que geram um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR, é possível acompanhar a amplificação do fragmento alvo durante os ciclos da PCR. Essa amplificação possui quatro fases: *baseline*, exponencial, linear e *plateau*. Na *baseline* a amplificação está abaixo do nível de detecção do instrumento. Na fase exponencial a reação está ocorrendo com taxa máxima de eficiência. A duração dessa fase depende da qualidade e concentração dos reagentes e é a fase em que ocorre o consumo da maior parte dos reagentes presentes na reação. Na fase linear, a eficiência da amplificação começa a cair, pois os produtos da reação já não estão disponíveis ou já foram consumidos durante a fase exponencial. A fase *plateau* é alcançada rapidamente ao final da reação, onde ocorrem os últimos ciclos da PCR (DORAK, 2006). A PCR em tempo real difere do padrão de PCR porque os produtos gerados são captados durante os ciclos de amplificação usando sondas de hibridização que realçam a especificidade do teste (DORAK, 2006) e tem como vantagem em relação à PCR convencional, maiores precisão, reprodutibilidade, acurácia e velocidade das análises, melhor controle de qualidade no processo, menor risco de contaminação e objetividade na interpretação dos resultados, uma vez que a reação ocorre em um sistema tubular fechado, não havendo a necessidade de eletroforese para a visualização das amplificações (NOVAIS *et al.*, 2004; RODRIGUEZ - LÁZARO *et al.*, 2007) e oferece também maior sensibilidade analítica (KRENKE, 2005). Considerando a acurácia (dependendo dos marcadores específicos escolhidos) e a rapidez de execução que a qPCR apresenta quando comparada ao cultivo bacteriológico, essa técnica tem se mostrado eficiente no diagnóstico direto de microrganismos, em nível de espécie e subespécie,

podendo atuar como ferramenta epidemiológica e de diagnóstico auxiliar nos programas de controle e erradicação (BRICKER, 2002; OIE, 2016).

Para que a qPCR possa ser utilizada em programas de controle e como técnica auxiliar de diagnóstico é preciso que essa metodologia seja testada e validada para o microrganismo e na matriz que se pretende investigar (OIE, 2013). Na validação realizada nesse trabalho foram selecionados *primers* que amplificam o elemento de inserção *is6501/is711* presente em todas as bactérias do gênero *Brucella* e o gene *eriD* que está parcialmente deletado em cepas vacinais B19. Para a detecção de *M. bovis* foram utilizados *primers* para o *is1081*, presente no genoma de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e a deleção da região de diferença *RD4* presente apenas no genoma de *M. bovis*.

O elemento genético repetitivo *is6501* (OUAHRANI *et al.*, 1993) ou *is711* (HALLING *et al.*, 1993) ocorre apenas em espécies de *Brucella* e, para a maioria das espécies, pelo menos uma cópia do elemento ocorre em um único locus cromossômico específico da espécie ou biovar (BRICKER; HALLING, 1994). A *is6501* permite a diferenciação entre as espécies de *Brucella*, uma vez que o número de cópias repetitivas do mesmo é único para cada espécie ou biovar e sua localização no genoma é espécie – específica (OUAHRANI *et al.*, 1993; MORENO *et al.*, 2002; ORZIL *et al.*, 2016). A realização de uma PCR utilizando como alvo o elemento de inserção *is6501* é uma importante ferramenta para a detecção de *Brucella* no animal e em produtos lácteos, pois a natureza multi-cópia do elemento aumenta a sensibilidade da análise (OUAHRANI *et al.*, 1993).

O gene *eriD* está localizado em um operon (*eri*) que possui mais três genes *eriA*, *eriB* e *eriC*. O *eriD* codifica uma proteína de ligação com função reguladora da expressão do operon *eri* (SANGARI *et al.*, 2000) e está deletado parcialmente na estirpe vacinal B19 (DUCH, 2015), o que impede o metabolismo do eritrol levando à inibição da multiplicação dessa estirpe pelo acúmulo de um intermediário tóxico e esgotamento dos níveis de ATP (SPERRY; ROBERTSON, 1975 *apud* SANGARI *et al.*, 2000). Um iniciador que tem como alvo o gene *eriD* é capaz de distinguir entre *Brucella abortus* patogênica e a amostra vacinal B19 (SANGARI *et al.*, 2000) e por isso sua

utilização é importante no diagnóstico da brucelose em países que utilizam essa vacina no protocolo vacinal.

O elemento de inserção *is1081* está presente apenas no genoma de espécies do complexo *M. tuberculosis* (MTC) em cinco a sete cópias (COLIINS; STEPHENS, 1991; VAN SOOLINGEN *et al.*, 1994; TAYLOR *et al.*, 2007) e em seis cópias no genoma de *M. bovis* (DZIADEK *et al.*, 2001). *is1081* possui 1324 pb de comprimento e contém um grande ORF. Essa ORF, que ocupa a maior parte do *is1081*, é precedida por um sítio de ligação ribossomal e codifica uma proteína putativa de 415 aminoácidos. *is1081* também contém dez ORFs mais curtas (COLIINS; STEPHENS, 1991). Esse elemento não apresenta praticamente nenhum polimorfismo (COLLINS; STEPHENS, 1991; VAN SOOLINGEN *et al.*, 1992; 1994), o que indica que *is1081* transpõe muito raramente, ou talvez não transponha nas bactérias do MTC (VAN SOOLINGEN *et al.*, 1994). As linhagens de micobactérias não-tuberculosas (MOTT) não amplificam com o uso da *is1081* como iniciador (TAYLOR *et al.*, 2007). Esse elemento de inserção pode ser útil em manipulações genéticas e no desenvolvimento de testes de diagnóstico para tuberculose bovina com base na reação em cadeia da polimerase (PCR) (COLIINS; STEPHENS, 1991).

Regiões de diferença (RDs) representam regiões que distinguem as linhagens de *M. tuberculosis* de outros membros do complexo *M. tuberculosis* (MTC), independentemente da sua origem geográfica e das suas características de tipagem (BROSCH *et al.*, 2002). A *RD4* é deletada em *M. bovis* e em *M. bovis* BCG, mas está presente em todas as espécies ou ecotipos do MTC, o que a caracteriza como critério principal para distinguir *M. bovis* das demais espécies do complexo (SMITH *et al.*, 2006; TAYLOR *et al.*, 2007; SALES *et al.*, 2014), até mesmo das espécies mais geneticamente semelhantes como *M. caprae* (HUARD *et al.*, 2003; GARNIER *et al.*, 2003; WARREN *et al.*, 2006; DOMOGALLA *et al.*, 2013; SALES *et al.*, 2014). A deleção da região *RD4* remove os genes *Rv1506-Rv1516* em todas as sequências do genoma completo de *M. bovis* e BCG presentes no *GenBank*, enquanto está íntegra em todas as MTC disponíveis no banco de dados (SALES, 2012).

2.5 Validação de Ensaios

A validação consiste na realização de um estudo experimental e documentado que determina a adequação de um ensaio que foi desenvolvido, otimizado e padronizado, para uma finalidade pretendida. Todos os ensaios de diagnóstico (laboratoriais e de campo) devem ser validados para as espécies em que serão utilizados (OIE, 2013). É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam produzem resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2016). Um ensaio validado deve ser avaliado continuamente para assegurar seu desempenho, muitas vezes acompanhando os resultados dos controles internos na execução do ensaio ao longo do tempo (OIE, 2013). Para a realização da validação, a OIE recomenda o uso de pelo menos três amostras de referência bem definidas que representem animais infectados e não infectados. Porém, a obtenção de amostras de referência nem sempre é possível, nesses casos a alternativa apresentada é o enriquecimento da matriz com o agente (OIE, 2013).

No Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são as agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios (PEREZ, 2010), porém não existe um consenso entre as duas em relação às terminologias utilizadas.

De acordo com a ANVISA (2007) os principais objetivos de uma verificação de desempenho são: monitorar o desempenho do método sob as condições utilizadas e levar em conta os efeitos das variações inevitáveis causadas, por exemplo, pela composição das amostras, desempenho do equipamento, qualidade dos reagentes, variações ligadas ao analista e condições ambientais do laboratório. As características de desempenho investigadas no processo de validação, a fim de demonstrar o desempenho do método são: especificidade e seletividade; sensibilidade; repetibilidade; reprodutibilidade; robustez (NONAKA, 2012).

Especificidade e Seletividade

Segundo o INMETRO (2016), seletividade é a capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. O método que produz resposta para vários analitos, mas é capaz de distinguir a resposta entre eles é chamado de seletivo. De acordo com a norma brasileira (NBR) 14501 (Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT), especificidade é a habilidade que um exame ou procedimento analítico possuem de identificar ou quantificar corretamente um analito na presença de fenômenos interferentes e quantidades de influência. A especificidade analítica (exames quantitativos) é a habilidade de um método analítico de determinar somente o analito que ele se propõe examinar. Especificidade clínica é a proporção de indivíduos que não tem uma doença clínica especificada, para os quais resultados dos exames estão negativos ou dentro do limite definido de decisão (ABNT/CB-36, 2001). Para a ANVISA, é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz e, para análise qualitativa (teste de identificação), é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes (PEREZ, 2010).

Segundo a OIE (2013), a especificidade analítica deve distinguir o analito alvo de outros analitos e componentes da matriz de três formas: Seletividade – capacidade de identificar o analito alvo na presença de interferentes da matriz; Exclusão - capacidade de um teste para detectar uma sequência que é exclusiva de um organismo alvo, excluindo todos os outros organismos conhecidos que podem gerar reação cruzada; Inclusão - capacidade de um teste detectar várias cepas ou sorovares de uma espécie.

Sensibilidade

De acordo com a NBR 14501, em exame quantitativo a sensibilidade é a variação da resposta de um sistema analítico ou equipamento, dividida

pela resposta correspondente ao estímulo; em exame qualitativo, é a capacidade do método utilizado de obter resultados positivos de acordo com resultados positivos obtidos pelo método de referência. Sensibilidade clínica é a proporção de pacientes com uma condição clínica bem definida, cujos valores de exame são positivos e sensibilidade biológica é a qualidade ou grau em que se pode detectar em uma reação (ABNT/CB-36, 2001). A sensibilidade de um teste é definida pela capacidade do mesmo de detectar indivíduos verdadeiramente doentes, ou seja, a parte das amostras de animais realmente infectados que no ensaio deverão ser positivas (OIE, 2013).

O limite de detecção (LD) é a medida da sensibilidade analítica de um ensaio. É a menor concentração do analito em uma matriz específica que produzirá um resultado positivo que pode ser determinado com um nível aceitável de exatidão e precisão (ABNT/CB-36, 2001; OIE, 2013). Para ensaios de detecção direta, o limite de detecção pode ser expresso como o número de cópias do genoma, unidades formadoras de colônias, dose infecciosa, unidade formadora por placa, títulos, etc. Para ensaios de detecção indireta é a menor quantidade de anticorpos detectados (OIE, 2013).

Repetibilidade

De acordo com a NBR 14501, repetibilidade é a capacidade de um sistema ou instrumento de fornecer indicações rigorosamente semelhantes para aplicações repetidas do mesmo analito sob as mesmas condições de medição (ABNT/ CB-36, 2001). Segundo a DOQ-CGCRE-008, é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetibilidade, são elas: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. Sugerem-se sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração, chamado desvio padrão de repetibilidade (INMETRO, 2016).

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é definida pela NBR 14501 como a mais próxima concordância entre os resultados do mesmo analito, onde as medições são feitas sob condições diferentes, como por exemplo: observador, equipamento, condições de uso e de tempo (ABNT/ CB-36, 2001). Segundo a OIE, reprodutibilidade é a habilidade do método em obter resultados consistentes, estimados com precisão, quando alíquotas de uma mesma amostra são testadas em diferentes laboratórios. Os ensaios devem ser realizados com, no mínimo, 20 amostras (OIE, 2013). A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar, tais como: Diferentes analistas; Diferentes equipamentos; Diferentes tempos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar (INMETRO, 2016).

Robustez

Robustez refere-se à capacidade de um ensaio de manter-se inalterado quando submetido a pequenas variações nas situações de teste que podem ocorrer ao longo do ensaio em um único laboratório. A avaliação da robustez deve começar durante os estágios de desenvolvimento e otimização do ensaio. As variações deliberadas nos parâmetros do método podem ser abordadas em experimentos depois que as condições ótimas do ensaio forem estabelecidas. Se pequenas diferenças nas condições ou concentrações dos reagentes causarem uma variabilidade inaceitável nos resultados, o ensaio provavelmente não será robusto (OIE, 2013). De acordo com a DOQ-CGCRE-008, a robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que o mesmo apresenta perante a pequenas variações. Um

método é robusto quando se revela praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando está sendo executado e quanto maior for a robustez de um método, maiores serão sua confiança e precisão (INMETRO, 2016).

Tendo em vista a dificuldade de se obter um diagnóstico *in vivo* rápido e preciso para tuberculose e brucelose bovinas, que possa aumentar a garantia da segurança do alimento com relação a estes patógenos, e a necessidade de utilizar critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, a confiabilidade de técnicas que sejam mais rápidas, práticas, sensíveis e específicas, é que objetiva-se verificar o melhor método de extração de DNA em leite cru a fim de validar a técnica de qPCR para detecção de *Brucella abortus* e *Mycobacterium bovis* nessa matriz.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar o melhor método de extração de DNA de leite cru a fim de validar a técnica de PCR em tempo real para detecção de *Brucella abortus* e *Mycobacterium bovis* nesta matriz.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar o melhor método de extração de DNA de leite cru usando cinco diferentes metodologias;
- Validar a técnica de qPCR para detecção de *B. abortus* e *M. bovis* em leite cru usando diluições seriadas de cepas padrão.

4 METODOLOGIA

O trabalho foi executado no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O LANAGRO/MG possui laboratórios distintos para a extração de DNA e realização da qPCR. A contaminação do leite foi realizada em um laboratório que se encontra fora da área reservada para laboratórios de diagnóstico do LANAGRO/MG. Todos os equipamentos utilizados no estudo seguem as normas de verificação e calibração exigidas pela ABNT NBR ISO/IEC 17025.

4.1 Preparo das Amostras

Foram utilizadas amostras de leite de tanque homogeneizado, oriundas de animais com diagnóstico negativo para brucelose e tuberculose pertencentes à propriedade sem nenhum histórico e certificada como livre dessas doenças. As amostras de leite negativo foram contaminadas separadamente com as cepas de referência *Mycobacterium bovis* AN5 CRNC 01 (CANEVARI-CASTELÃO *et al.*, 2014) e *Brucella abortus* 2380 (ORZIL *et al.*, 2016) inativadas pelo calor, devido ao alto risco de contaminação dos laboratoristas, e pertencentes à bacterioteca do LANAGRO/MG, em diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-12} . Para contaminação da amostra 10^{-1} foram colocados em um tubo de centrífuga 1.350 μ L da matriz leite e 150 μ L da amostra de referência e, a partir desse tubo, foram realizadas as diluições seriadas até 10^{-12} .

4.2 Extração de DNA

As amostras de leite contaminado nas diluições 10^{-1} a 10^{-8} foram submetidas à extração de DNA utilizando cinco diferentes métodos: 1) *DNeasy mericon Food Kit – Qiagen*; 2) Extração de DNA com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (SALES, 2014, modificado); 3) *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit - Promega*; 4) *AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit - Bioneer*; 5) *Genomic DNA Isolation Kit - Real Biotech Corporation*. Todas as extrações foram realizadas utilizando a capela de fluxo laminar Trox® Technik e a centrífuga Sigma® 3-16KL. O DNA extraído foi utilizado na qPCR para estabelecer quais metodologias apresentariam melhor desempenho e seriam utilizadas ao longo do processo de validação.

Extração com o DNeasy Mericon Food Kit (Qiagen, Germany) - Foram colocados 200 µL de cada diluição da amostra de leite contaminado, 1mL de “Food Lysis buffer” e 2,5 µL de “Proteinase K solution” em tubo de centrífuga; a solução foi levada ao vortex e incubada a 60°C por 30 minutos. Após a incubação foi resfriada com placas de gelo até atingir a temperatura ambiente e centrifugada por cinco minutos a 2.500xg. Em novos tubos de centrífuga (2 mL) foram adicionados 500 µL de clorofórmio e, após a centrifugação, 700 µL da solução anterior (excluindo a camada superior de gordura que se forma) foram adicionados ao tubo que continha clorofórmio; a nova solução foi levada ao vortex durante 15 segundos e em seguida foi centrifugada por 15 minutos a 14.000xg. Em outro tubo (2 mL) foram adicionados 350 µL do “buffer PB” e 350 µL do sobrenadante da centrifugação anterior; a solução foi levada ao vortex, transferida para uma “QIAquick spin column” com o tubo coletor e centrifugada por um minuto a 17.900xg; o líquido que desceu para o tubo coletor foi descartado. 500 µL do “Buffer AW2” foram adicionados à “QIAquick spin column” que foi centrifugada por um minuto a 17.900xg; o conteúdo do tubo coletor foi descartado e outra centrifugação de um minuto a 17.900xg foi realizada para garantir que a membrana ficasse seca. A coluna foi transferida para um tubo

de centrífuga de 1,5 mL e 150 µL do “Buffer EB” foram adicionados diretamente na membrana da coluna. O tubo ficou incubado por um minuto (temperatura ambiente) e foi centrifugado por um minuto a 17.900xg. O DNA extraído foi congelado a -20°C para posterior uso na PCR.

Extração de DNA com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico - Às amostras de leite cru contaminadas foram adicionados 10 mL do tampão “Food Lysis” da Qiagen e 25 µL de proteinase K e a solução foi levada ao vortex. Em um tubo de 2 mL foram adicionados 480 µL de fenol, 480 µL de clorofórmio, 40 µL de álcool isoamílico e 850 µL da solução anteriormente obtida com as amostras de leite contaminadas; essa nova solução foi homogeneizada no vortex e, posteriormente, centrifugada durante cinco minutos a 8.000xg. Após a centrifugação foram retirados 200 µL do sobrenadante que foram transferidos para um novo tubo que continha 200 µL do tampão “AL” - Qiagen; a nova solução foi levada ao vortex e incubada por 10 minutos a 56°C. Posteriormente foram adicionados 200 µL de álcool etílico P.A aos tubos e a solução foi homogeneizada no vortex e pipetada para uma “DNeasy mini spin column” - Qiagen que foi depositada em um tubo coletor de 2 mL e centrifugada por um minuto a 6.000xg; o líquido presente no tubo coletor após a centrifugação foi descartado. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e a ela foram adicionados 500 µL da solução de lavagem “AW1” - Qiagen, todo conteúdo foi centrifugado por um minuto a 6.000xg e o tubo coletor foi descartado. Foi colocado outro tubo coletor na coluna e adicionados 500 µL do tampão de lavagem “AW2” - Qiagen, o conteúdo passou por uma centrifugação de três minutos a 20.000xg e o tubo coletor foi descartado. A coluna foi colocada em novo tubo de 2 mL e a ela foram adicionados 50 µL do tampão “AE” - Qiagen, foi incubada por um minuto em temperatura ambiente para posterior centrifugação a 6.000xg por um minuto; o líquido que passou da coluna para o tubo coletor foi adicionado novamente à coluna e centrifugado novamente por um minuto a 6.000xg; a coluna foi descartada e o material extraído foi congelado a -20°C para posterior utilização.

Extração com o Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega, USA) -

A extração com esse *kit* é realizada pelo extrator automático Maxwell16® MDX – Promega (modo “LEV”). O *kit* é composto por cartuchos que contém os reagentes, cubeta para eluente, eluente e macerador. Ao primeiro poço do cartucho foram adicionados 400 µl da amostra de leite contaminado e à cubeta, 200 µL do eluente do *kit*. O cartucho foi inserido no equipamento que procedeu a extração automática em aproximadamente 50 minutos. Após a extração automática do DNA as amostras foram transferidas da cubeta para um tubo de 1,5 mL e congeladas a -20°C.

AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, USA) -

Em um tubo de centrífuga de 1,5 mL foram adicionados 200 µL da amostra de leite contaminada, 200 µL do Tampão de Lise de Tecido (TL) presente no *kit* e 20 µL de proteinase K; a solução foi homogeneizada no vortex e incubada por uma hora a 60°C no banho seco. Após a incubação foram adicionados 200 µL do Tampão de Ligação (GC) e a solução foi novamente homogeneizada no vortex; foi realizada nova incubação por 10 minutos a 60°C e foram adicionados 100 µL de isopropanol homogeneizados com pipeta. A solução foi transferida para uma coluna com tubo coletor e os tubos foram centrifugados por um minuto a 8.000 rpm. Após a centrifugação a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem “W1”, os tubos foram novamente centrifugados por um minuto a 8.000 rpm e o líquido presente no tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem “W2” à coluna e os tubos foram centrifugados por um minuto a 8.000 rpm, o conteúdo do tubo coletor foi descartado e os tubos foram novamente centrifugados por um minuto a 12.000 rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e a ela foram adicionados 50 µl do eluente “EL”, o tubo ficou incubado por cinco minutos em temperatura ambiente, posteriormente foi centrifugado por um minuto a 8.000 rpm; o líquido presente no tubo após a centrifugação foi pipetado para a coluna novamente e foi realizada nova centrifugação por um minuto a 8.000 rpm. Após a centrifugação a coluna foi descartada e o tubo com o DNA extraído foi submetido ao congelamento a -20°C.

Genomic DNA Isolation Kit (Blood/ Bacteria/ Cultures cells/ Tissue) (Real Biotech Corporation, Taiwan) - Em tubo de centrífuga de 2 mL foram adicionados 300 µL de amostra de leite contaminado, 300 µl do tampão de lise celular fornecido pelo kit e 20 µL de Proteinase K; a solução foi homogeneizada no vortex e incubada por uma hora a 60°C. Após a incubação 100 µl do Tampão de Lise de Proteína fornecido pelo *kit* foram adicionados aos tubos que foram homogeneizados no vortex por 10 segundos, incubados em gelo por cinco minutos e centrifugados por três minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante oriundo da centrifugação foi transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 300 µL de isopropanol; a nova solução foi homogeneizada por inversão do tubo 20 vezes e centrifugada por cinco minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 µl de etanol 70% aos tubos para lavar os *pellets* formados na centrifugação. Os tubos foram centrifugados novamente por cinco minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto por dez minutos para o *pellet* secar. 50 µL de “TE” foram adicionados aos tubos com os *pellets* que, posteriormente, foram incubados por 30 minutos a 60°C para o *pellet* dissolver. O DNA extraído foi armazenado a -20°C.

4.3 Quantificação de DNA

A quantificação do DNA foi realizada utilizando o instrumento *NanoVue® (GE healthcare, UK)*, objetivando estimar a concentração e a qualidade do material genético extraído com as diferentes metodologias, uma vez que esse equipamento fornece a relação DNA/proteína e DNA/sais.

O *Qubit® 2.0 Fluorometer- Invitrogen by Life Technologies* foi utilizado para a quantificação de DNA das cepas padrão utilizadas na contaminação da matriz, visando o posterior cálculo do limite de detecção.

4.4 Iniciadores

As regiões seleccionadas para o diagnóstico específico de *M. bovis* e *B. abortus* foram escolhidas de acordo com as disponíveis no *GenBank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os *primers* utilizados fazem parte do uso de rotina do LBM e a especificidade analítica *in silico* dos mesmos foi previamente testada com o *PrimerBlast* (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=Blasthom e) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), como descrito por Sales *et al.* (2014). Os iniciadores e as sondas para a detecção de *M. bovis* e *B. abortus* no leite cru estão presentes na tabela 1

Tabela 1 - Relação dos iniciadores e sondas de hibridização usados na PCR em tempo real para detecção de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* em leite cru.

Agente	Iniciadores	Região alvo	Sequência de Nucleotídeos	Autores
<i>M. bovis</i>	Mbo.RD4.88.F	Deleção da	GGAGAGCGCCGTTGTAGG	SALES <i>et al.</i> , 2014
	Mbo.RD4.88.R	Região de	CGCCTTCCTAACCAGAATTB	SALES <i>et al.</i> , 2014
	Mbo.RD4.88.S	Diferença 4.	5'.FAM AGCCGTAGTCGTGCAGAAGCGCA- IowaBlack1.3'	MOURA <i>et al.</i> , 2014
	Mbo.IS1081.71.F	Elemento de	CGAAACGACCAGCAAAAGTC	LBM- LANAGRO/MG (Dados não publicados)
	Mbo.IS1081.71.R	Inserção IS1081.	TGCTCGGTGTGCGATAAGATG	
	Mbo.IS1081.71.S		FAM-TCGAAGGAAATGACGCAATGACCTC-BHQ pou IowaBlack	
<i>B. abortus</i>	Bru.IS6501.128.F	Elemento de	TGGTGCTGTCAATGAGGACA	LBM- LANAGRO/MG (Dados não publicados)
	Bru.IS6501.128.R	Inserção IS6501	GACCTTCGGCAAATGGACAG	
	Bru.IS6501.128.S		5'.FAM-CGGCGTATCAGCCAGGGCAT-BHQ1.3'	
	Bru.eriD.92.F	Gene eriD	GCGGTGGATAATGAAATCTGC	LBM- LANAGRO/MG (Dados não publicados)
	Bru.eriD.92.R		GCCACACTTTCTGCAATCTG	
	Bru.eriD.92.S		[FAM]AGCCGAACGACCGTGAAGTCATT[BHQ1]	

4.5 Padronização da PCR em Tempo Real

Os protocolos de temperatura e concentração padronizados neste trabalho foram realizados segundo tentativa e erro. As temperaturas utilizadas seguiram as recomendações do fabricante do *RealQ 2x Master Mix – Ampliqon* e podem ser observadas na tabela 2. As quantidades e concentrações adequadas dos componentes do *master mix* estão listadas nas tabelas 3 e 4. As amostras padrão *M. bovis* AN5 CRNC 01 (CANEVARI-CASTELÃO *et al.*, 2014) e *B. abortus* 2380 (ORZIL *et al.*, 2016) inativadas foram utilizadas durante todo o processo de padronização e validação da qPCR como controles positivos das reações. Em todas as rodadas da qPCR foram adicionados ainda controles negativos para verificar a contaminação dos reagentes utilizados na extração do DNA e dos componentes do *master mix* da PCR em tempo real.

Tabela 2 - Protocolos de tempo e temperatura utilizados nos ensaios de qPCR para detecção de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* em leite cru.

Microrganismo	Pré ciclo	Ciclo	
<i>M. bovis</i>	50°C – 2 minutos	95°C – 15 segundos	50x
	95°C – 15 minutos	60°C – 60 segundos	
		Fluoróforo FAM	
<i>B. abortus</i>	50°C – 2 minutos	95°C – 15 segundos	45x
	95°C – 15 minutos	60°C – 60 segundos	
		Fluoróforo FAM	

Tabela 3 - Concentração e volume dos componentes utilizados no *master mix* para reação de PCR em Tempo Real para detecção de *Mycobacterium bovis* em leite cru.

Primers	Componentes do <i>master mix</i>	Volume (µL)
Mbo. is1081.71	Mix Ampliqon	12,5
	Iniciador F(25*)	0,5
	Iniciador R(25*)	0,5
	Sonda (25*)	0,5
	MgCl ₂ (25**)	8,0
	DNA de <i>M. bovis</i>	3,0
	Total	25,0
Mbo.RD4.88	Mix Ampliqon	12,5
	Iniciador F e R(60*)	0,25
	Sonda (40*)	0,25
	MgCl ₂ (25**)	9,0
	DNA de <i>M. bovis</i>	3,0
	Total	25,0

*pmol/ µL; **mM.

Tabela 4 - Concentração e volume dos componentes utilizados no *master mix* para reação de PCR em Tempo Real para detecção de *Brucella abortus* em leite cru.

Primers	Componentes do Mix	Volume (µL)
Bru. is6501.128	Água tratada com DEPC	4,4
	Mix Ampliqon	12,5
	Iniciador F(5*)	2,0
	Iniciador R(5*)	2,0
	Sonda (5*)	1,0
	MgCl ₂ (25**)	0,6
	DNA de <i>B. abortus</i>	2,5
	Total	25,0
Bru.eriD.92	Água tratada com DEPC	2,9
	Mix Ampliqon	12,5
	Iniciador F(5*)	2,5
	Iniciador R(5*)	2,5
	Sonda (5*)	1,5
	MgCl ₂ (25**)	0,6
	DNA de <i>B. abortus</i>	2,5
	Total	25,0

*pmol/ µL; **mM.

4.6 Critérios Utilizados para Validação

Os parâmetros utilizados para a validação realizada nesse estudo foram baseados nos descritos no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013* (OIE, 2013) e o Guia de Verificação de Desempenho da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial/SDA (CGAL) do MAPA.

Especificidade Analítica

A especificidade analítica dos iniciadores Mbo.RD4.88 e Mbo.is1081.71 foi avaliada utilizando cepas de *M. bovis* CRNC13, *M. fortuitum* CRNC 10, *M. phei* CRNC 12, *M. avium* 2045 CRNC 14, *M. avium* 1500 CRNC 15, *M. gordonae* CRNC 16, *M. marinum* CRNC 19, *M. triviale* CRNC 22, *M. kansasii* CRNC 48, *M. scrofulaceum* CRNC 49, *M. intracellulare* CRNC 17, *M. fortuitum peregrinum* CRNC 11, *Corynebacterium pseudotuberculosis* CRNC 09/02, *Rhodococcus equi* CRNC 09/01 e *Nocardia asteroides* CRNC 10/01, com descrito por Sales (2012).

Para testar a especificidade dos iniciadores Bru.is6501.128 e Bru.eriD.92 foram utilizadas cepas de *B. abortus*, *B. abortus* S19, *B. abortus* biovar 1, *B. abortus* biovar 3, *B. melitensis*, *B. suis*, *Trueperella pyogenes*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, como descrito por Orzil *et al.* (2016). Todas as cepas utilizadas para os testes de especificidade analítica foram inativadas e são pertencentes à bacterioteca do LANAGRO/MG.

Sensibilidade Analítica

Foi determinada através do limite de detecção (LD) identificado por meio da diluição seriada em leite das cepas padrão *M. bovis* AN5 CRNC 01 e *B. abortus* 2380 testada em triplicata. O limite de detecção é a maior diluição na qual todas as replicatas apresentam amplificação no teste de qPCR.

As amostras de leite contaminadas nas diluições 10^{-1} a 10^{-12} foram submetidas à extração de DNA e qPCR e o limite de detecção encontrado foi testado através da realização de qPCR em triplicata de DNAs extraídos com os dois *Kits* comerciais que apresentaram o melhor desempenho nos testes anteriores.

A eficiência das amplificações foi calculada através da curva padrão construída com as diluições seriadas, utilizando o valor da inclinação da reta (*slope*) da linha de regressão com a seguinte fórmula: $e = 100 \times (10^{-1/\text{slope}} - 1)$. Um *slope* de -3,32 já indica uma curva padrão com 100% de eficiência (NONAKA, 2012).

Repetibilidade e Reprodutibilidade

A repetibilidade foi estimada a partir dos resultados de sete amostras de leite representativas do analito estando estas em diluições dentro do limite de detecção dos testes. Os DNAs das sete amostras de leite contaminado artificialmente foram extraídos durante três dias e utilizados nas qPCRs realizadas em triplicata, também em três momentos diferentes.

As extrações e qPCRs foram realizadas sob as mesmas condições nos três momentos. Para avaliar a repetibilidade do teste para *M. bovis* foi utilizado apenas o *primer* Mbo.is1081.71. Para avaliar a repetibilidade da técnica para *B. abortus* foram utilizados os dois *primers* já mencionados.

Os testes de reprodutibilidade interna foram realizados repetindo os mesmos procedimentos da repetibilidade, porém realizados na íntegra também por um segundo analista.

Robustez

A avaliação da robustez ocorreu de maneira semelhante à avaliação da repetibilidade, porém as qPCRs foram realizadas em triplicata em dois equipamentos diferentes, *Rotor-Gene Q* (Qiagen, Germany) e *CFX96™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, USA), e utilizando dois *kits* diferentes para a extração de DNA, *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification* (Promega, USA) e *DNeasy Mericon Food* (Qiagen, Germany).

4.7 Análise dos Dados

A metodologia de validação seguiu os conceitos abordados no *Guia de Verificação de Desempenho* da Coordenação Geral de Apoio Laboratorial/SDA (CGAL) do MAPA. Os valores de ciclo limiar (*Ct*) obtidos em triplicata, a partir de cada amostra foram avaliados considerando as variações de dias, analistas, equipamentos e metodologia de extração do DNA.

No formulário de desempenho foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com o objetivo de determinar as variâncias da repetibilidade e reprodutibilidade. Para a reprodutibilidade foram apresentados os valores do coeficiente de variação (CV). O CV de cada ensaio foi obtido pela divisão do desvio pela média dos valores do *Cts*, multiplicado por 100 ($CV = s/\mu \times 100$).

Por último, para avaliar a robustez, foram apresentados os valores percentuais de cada um dos componentes da variação do estudo. Os componentes da variação indicam, em porcentagem, o quanto da variação total corresponde a cada fonte de variação do mensurando. O valor é encontrado dividindo a variância da fonte pela variância total do experimento, sendo o resultado multiplicado por 100. Foram considerados como fonte de variação desse estudo apenas os valores referentes aos componentes dia, erro da análise, analista, equipamento ou metodologia de extração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNA

Sabe-se que a metodologia de extração de DNA pode influenciar muito o resultado da qPCR podendo inclusive gerar resultados falso-negativos quando a metodologia utilizada não é adequada para determinada matriz. Com o objetivo de selecionar o método mais adequado para a extração de DNA de leite contaminado artificialmente, foram testadas cinco diferentes metodologias disponíveis para uso no LBM. A extração com o *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification kit – Promega* foi a que demonstrou menor variação entre os *Cycle thresholds (Cts)* em uma mesma replicata quando se procedeu as primeiras qPCRs para *M. bovis*. Já para a detecção de *B. abortus*, o *DNeasy Mericon Food kit – Qiagen* apresentou melhor desempenho nos testes iniciais. Por apresentarem melhores resultados que as outras metodologias testadas, em menor tempo e com maior praticidade, esses dois kits comerciais de extração de DNA foram escolhidos para a realização das outras etapas do ensaio. Os demais métodos de extração de DNA testados não apresentaram bons resultados na amplificação, onde foram observados *Cts* incoerentes com as diluições ou até ausência de amplificação em amostra sabidamente positiva, o que pode ser explicado pela presença de resíduos proteicos e salinos no produto da extração, evidenciando que a metodologia utilizada não foi capaz de purificar o DNA extraído.

Em um estudo realizado utilizando tecido de lesões suspeitas de tuberculose, Moura *et al.* (2016) obtiveram melhores resultados utilizando o *kit DNeasy Blood & Tissue - Qiagen*. Os kits *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification – Promega* e *DNeasy Mericon Food – Qiagen* foram testados pelos autores, porém não apresentaram desempenho satisfatório para a matriz utilizada, o que os autores acreditam ter ocorrido devido à pequena quantidade de DNA bacteriano presente no tecido.

A extração de DNA é o primeiro passo para a realização da qPCR e tem grande importância nos resultados, pois as concentrações de DNA podem diferir de acordo com o método utilizado, influenciando assim a capacidade de detectar e quantificar bactérias de amostras biológicas (RADOMSKI *et al.*, 2013). A seleção de um protocolo de extração que concentre o DNA, reduza ao máximo os fatores inibidores presentes nos fluidos biológicos, seja simples, reproduzível, seguro e capaz de prever contaminações cruzadas entre as amostras (RANTAKOKKO-JALAVA; JALAVA, 2002), possui fundamental importância para que a sensibilidade e especificidade analíticas e a confiabilidade do teste não sejam afetadas (KIM *et al.*, 2012).

5.2 Validação do ensaio

Especificidade Analítica

Não ocorreu nenhum tipo de reação inespecífica no teste de especificidade para Mbo.is1081.71 e Mbo.RD4.88, a qPCR apresentou amplificação apenas para cepa padrão *M. bovis* CRNC13, como era esperado. O iniciador Bru.is6501.128 amplificou para *B. abortus*, *B. abortus* S19, *B. abortus* biovar 1, *B. abortus* biovar 3, *B. melitensis*, *B. suis*, como esperado. Enquanto o Bru.eriD.92 amplificou para todas bactérias citadas acima com exceção de *B. abortus* S19, porém reações inespecíficas para *B. abortus* S19 podem ocorrer quando forem utilizadas altas concentrações (>200µg/ µL) de DNA purificado da bactéria, o que não interfere na análise, pois concentrações tão altas dessa bactéria não serão observadas em um animal naturalmente infectado e nem vacinado (comunicação interna).

A especificidade de um *primer* é muito importante para que não ocorram amplificações devido à contaminação da amostra por outros

microrganismos, gerando assim um resultado falso positivo. A especificidade do *primer* que amplifica um fragmento do gene *eriD* é fundamental para possibilitar a diferenciação entre animais contaminados com cepas patogênicas e animais vacinados com a B19.

Limite de Detecção

O limite de detecção encontrado para *M. bovis* utilizando a região *is1081* ocorreu na diluição 10^{-5} , enquanto o encontrado com o uso da deleção de *RD4* foi na diluição 10^{-4} ; os *Cycle Thresholds (Cts)* encontrados até o limite de detecção estão representados na tabela 5. Após encontrar as diluições em que ocorreram os limites de detecção, foi realizada a quantificação do DNA extraído da cepa *M. bovis* AN5 CRNC 01 utilizada na contaminação do leite, que apresentou 213 ng. A partir desse resultado pôde-se inferir que os limites de detecção foram de 2.13 pg de DNA (*is1081*) e 21.3 pg (*RD4*), o *primer* do elemento *is1081* apresentou uma maior sensibilidade analítica, o que provavelmente se deve à natureza multi-cópia do alvo. Taylor *et al.* (2007) também encontraram uma grande diferença entre os limites de detecção do método utilizando a *is1081* e a deleção de *RD4* como alvo. Naquele estudo, o *primer* que amplifica um fragmento da *is1081* se demonstrou mais sensível detectando 2.35 fg DNA, enquanto o *primer* para *RD4* detectou 23.5 fg. A diferença entre os limites de detecção dos dois *primers* encontrada por aqueles autores foi a mesma encontrada no presente estudo. Sales *et al.* (2014) encontraram um limite de detecção de 4 pg de DNA utilizando o *primer* Mbo.RD4.88.

A diferença observada entre o limite de detecção encontrado nos estudos citados e no presente estudo provavelmente se deve ao fato de que o limite de detecção dos dois estudos citados foi avaliado utilizando DNA extraído de diluições de *M. bovis* em tampão TE, enquanto o presente estudo avaliou o limite de detecção com DNA extraído de diluições de *M. bovis* na matriz leite que possui maior probabilidade de conter substâncias que inibem a qPCR como gordura, proteína e sais, que podem afetar a

sensibilidade da reação; embora ainda assim os testes tenham demonstrado um ótimo limite de detecção.

A curva padrão gerada para o cálculo da eficiência da reação com o *primer* que tem como alvo o elemento de inserção *is1081* alcançou um *slope* de -3,39, garantindo uma eficiência de 97,3%. Como o *primer* *Mbo.is1081.71* apresentou bom desempenho e limite de detecção dez vezes menor do que o *Mbo.RD4.88*, sugerindo ser um ótimo ensaio para o rastreio de rotina em leite, ele foi utilizado nas demais etapas de validação da técnica.

Tabela 5 - *Cycle Thresholds (Cts)* encontrados até o limite de detecção para *M. bovis* presente em leite cru.

<i>Primer</i>	Diluições				
	10^{-1} (Ct)	10^{-2} (Ct)	10^{-3} (Ct)	10^{-4} (Ct)	10^{-5} (Ct)
Mbo.is1081.71	20,01	24,15	25,85	31,03	33,59
	20,68	24,13	26,14	30,76	33,90
	20,17	23,98	26,24	30,86	34,19
Mbo.RD4.88	21,74	24,14	27,17	31,60	-
	21,22	24,55	27,50	31,42	-
	20,93	24,86	27,58	31,38	-

- : *Cycle Thresholds* desconsiderados devido à grande variação em uma mesma diluição

O limite de detecção encontrado para *B. abortus* ocorreu na diluição 10^{-7} com os dois *primers* utilizados, *Bru.is6501.128* e *Bru.eriD.92*; os valores dos *Cts* se encontram na tabela 6. Ao quantificar o DNA da cepa *B. abortus* 2308 utilizada para contaminar as amostras, o resultado obtido foi de 207ng. Sabendo disso foi possível inferir que o limite de detecção foi de 20.7 fg na diluição 10^{-7} . Redkar *et al.* (2001) encontraram um limite de detecção de 0.25 pg de DNA na qPCR com a *is711/6501* utilizando DNA extraído de *B. abortus* diluído em TE, o que demonstra uma sensibilidade analítica muito inferior a encontrada no presente estudo.

A curva padrão gerada para o cálculo da eficiência da reação com o *primer* que tem como alvo o elemento de inserção *is6501* apresentou um *slope* de -3,09 indicando uma eficiência 110% para a reação, já para o *primer* que tem como alvo o gene *eriD*, o *slope* apresentado foi de -3,00, conferindo uma eficiência de 115% para a reação. Os valores acima de 100% para eficiência podem ser justificados devido ao fato de a curva ter sido realizada com DNA extraído da diluição das bactérias no leite, que pode conter inibidores da reação.

Tabela 6 - *Cycle Thresholds (Cts)* encontrados até o limite de detecção para *B. abortus* presente em leite cru.

<i>Primer</i>	<i>Diluições</i>						
	10^{-1} (Ct)	10^{-2} (Ct)	10^{-3} (Ct)	10^{-4} (Ct)	10^{-5} (Ct)	10^{-6} (Ct)	10^{-7} (Ct)
Bru.is6501.128	12,02	16,08	20,33	22,48	24,83	26,76	31,39
	12,14	16,47	20,36	21,97	24,78	27,35	30,34
	12,25	16,06	19,86	22,08	24,56	28,31	30,74
Bru.eriD.92	16,27	20,66	24,31	26,76	28,85	31,53	35,85
	15,77	20,91	24,22	26,21	28,96	31,74	35,00
	16,40	20,09	23,97	26,18	28,81	31,93	34,23

Repetibilidade e Reprodutibilidade

Os parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade de uma técnica precisam ser comprovados para garantir que a mesma possa ser utilizada para o diagnóstico e identificação de microrganismos, além de fazerem parte da exigência das normas de acreditação de laboratórios (FREITAS *et al.*, 2006). Para avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade das qPCRs foi utilizado o formulário do *Guia de verificação de Desempenho* da CGAL do MAPA. Essas medidas foram avaliadas utilizando como alvo a *is1081* para *M. bovis* e para *B. abortus* a *is6501* e a região genômica *eriD*, pois foram os que apresentaram menor limite de detecção.

A repetibilidade é calculada dividindo a variância do erro da análise pela variância total, que nesse teste é a soma das variâncias entre as diluições, entre as rodadas e do erro da análise. Multiplica-se esse resultado por 100 e se obtém a repetibilidade em porcentagem, esse valor não deve ultrapassar 5%. O erro da medida é calculado através da soma da repetibilidade com a reprodutibilidade da medida, que na planilha designada para a repetibilidade é o resultado da soma da variância total entre as rodadas com a variância total do erro da análise, e não deve ultrapassar 30%.

As tabelas 7, 8 e 9 mostram os valores das medidas de repetibilidade mencionadas acima para as qPCRs realizadas para detecção de *B. abortus* e *M. bovis* com DNA extraído do leite cru com os dois *kits* comerciais que apresentaram melhor desempenho.

Tabela 7 - Medidas de repetibilidade do *primer* Bru.is6501.128 para detecção de *B. abortus* em leite cru.

	Maxwell® 16 Tissue DNA Purification kit – Promega	DNeasy Mericon Food kit – Qiagen
Repetibilidade (%)	0,10	1,17
Erro de medida (%)	0,63	7,57

Tabela 8 - Medidas de repetibilidade do *primer* Bru.eriD.92 para detecção de *B. abortus* em leite cru.

	Maxwell® 16 Tissue DNA Purification kit – Promega	DNeasy Mericon Food kit – Qiagen
Repetibilidade (%)	0,35	0,56
Erro de medida (%)	0,65	3,34

Tabela 9 - Medidas de repetibilidade do *primer* Mbo.is1081.71 para detecção de *M. bovis* em leite cru.

	Maxwell® 16 Tissue DNA Purification kit – Promega	DNeasy Mericon Food kit – Qiagen
Repetibilidade (%)	0,70	0,64
Erro de medida (%)	8,76	7,56

Ao analisar as tabelas de repetibilidade podemos observar que todas as qPCRs apresentaram um sistema de medida adequado e aceitável com valores de repetibilidade menores que 5% e erro da medida menor que 30%.

Houve diferença nos Cts médios entre as rodadas para cada diluição, o que se explica devido à variabilidade que pode ocorrer entre os dias, mas sem prejudicar a aceitabilidade do experimento que é garantida pelas medidas alcançadas. Não houve diferença significativa entre os métodos de extração levando em consideração que os dois métodos mantiveram valores abaixo do máximo permitido para a repetibilidade e para o erro da medida.

Para avaliar a reprodutibilidade intralaboratorial os testes foram realizados por um segundo analista e os resultados obtidos pelos dois analistas foram comparados. Uma planilha diferente da utilizada para avaliar a repetibilidade foi utilizada para obter os valores da reprodutibilidade e robustez. Nas tabelas 10, 11 e 12 é possível observar que o erro da medida que para a reprodutibilidade que é calculado através da soma das variâncias totais entre as rodadas, entre os analistas e do erro da análise, se manteve abaixo do limite de 30%, o que indica que o sistema de medidas é adequado para a análise da reprodutibilidade. O coeficiente de variação (CV) demonstrado em todas as análises se manteve abaixo do valor considerado

normal para amostras biológicas, que segundo Sampaio (2010 *apud* NONAKA, 2012), é até 15%. Os valores aqui obtidos para o CV indicam que o experimento é preciso, com baixa dispersão dos dados, demonstrando que a metodologia testada é estável e homogênea. Não ocorreram grandes variações entre os métodos utilizados para a extração de DNA e os dois kits apresentaram resultados adequados para o sistema de medidas de reprodutibilidade.

Tabela 10 - Medidas de reprodutibilidade do *primer* Bru.is6501.128 para detecção de *B. abortus* em leite cru.

	Maxwell® 16 Tissue DNA Purification kit – Promega	DNeasy Mericon Food kit – Qiagen
Erro de medida (%)	3,15	5,27
Coefficiente de variação (CV%)	1,02	1,96

Tabela 11 - Medidas de reprodutibilidade do *primer* Bru.eriD.92 para detecção de *B. abortus* em leite cru.

	Maxwell® 16 Tissue DNA Purification kit – Promega	DNeasy Mericon Food kit – Qiagen
Erro de medida (%)	2,22	10,28
Coefficiente de variação (CV%)	1,26	2,26

Tabela 12 - Medidas de reprodutibilidade do *primer* Mbo.is1081.71 para detecção de *M.bovis* em leite cru.

	Maxwell® 16 Tissue DNA Purification kit – Promega	DNeasy Mericon Food kit – Qiagen
Erro de medida (%)	16,30	19,71
Coefficiente de variação (CV%)	1,21	5,15

Robustez

Para avaliar a robustez foram realizados testes de resistência às variações intencionais. As variações consideradas significativas para os métodos foram os termocicladores e os dois kits comerciais de extração de DNA. Foram utilizados os termocicladores *Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany)*

e CFX96™ *Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, EUA) e os Kits de extração Maxwell® 16 *Tissue DNA Purification* (Promega, USA) e DNeasy mericon Food (Qiagen, Germany).

Os coeficientes de variação observados na análise da robustez usando como fonte de variação os termocicladores foram: 1,19%, 1,65% e 1,41%, para os *primers* Mbo.is1081.71, Bru.eriD.92 e Bru.is6501.128, respectivamente. Ao usar os dois *kits* de extração de DNA como fonte de variação, os CV obtidos utilizando os *primers* Mbo.is1081.71, Bru.eriD.92 e Bru.is6501.128 foram: 5%, 1,5% e 2%, respectivamente.

Nas figuras 2, 3 e 4 estão os dados referentes à contribuição de cada fonte de variação na variação total dos valores de *Cts* entre os dois *kits* comerciais utilizados para a extração de DNA das amostras de leite cru contaminadas artificialmente.

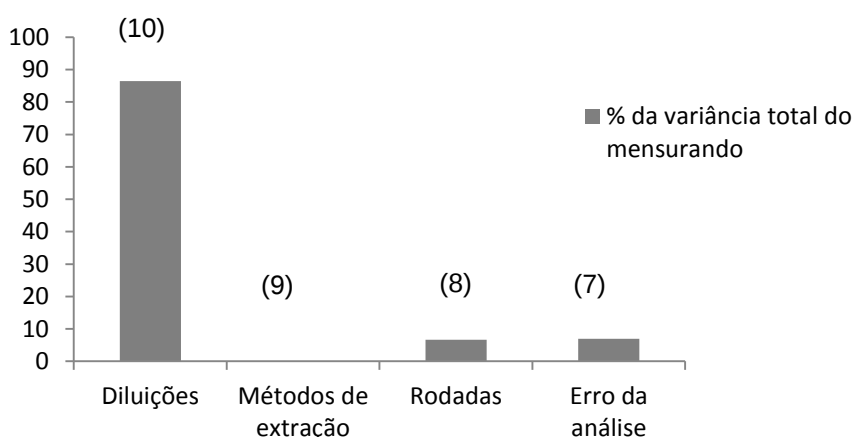


Figura 2 - Fontes de variação dos *Cycle Thresholds* utilizando diferentes *Kits* de extração de DNA com o *primer* Mbo.is1081.71 para detecção de *Mycobacterium bovis* em leite cru. A porcentagem da variância total do mensurando para cada fonte de variação foi: (10) - 86,42% entre as diluições, (9) - 0,00% entre os métodos de extração, (8) - 6,66% entre as rodadas e (7) 6,92% representado pelo erro da análise.

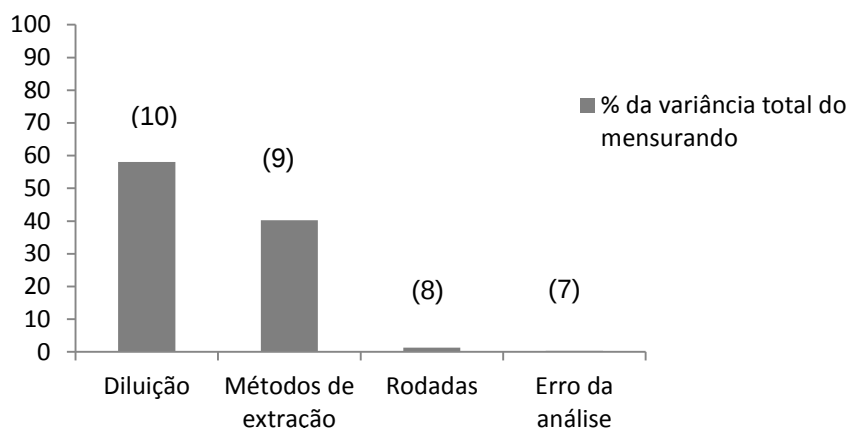


Figura 3 - Fontes de variação dos *Cycle Thresholds* utilizando diferentes *Kits* de extração de DNA com o *primer* Bru.eriD.92 para detecção de *Brucella abortus* em leite cru. A porcentagem da variância total do mensurando para cada fonte de variação foi: (10) – 58,01% entre as diluições, (9) – 40,29% entre os métodos de extração, (8) – 1,34% entre as rodadas e (7) - 0,36% representado pelo erro da análise.

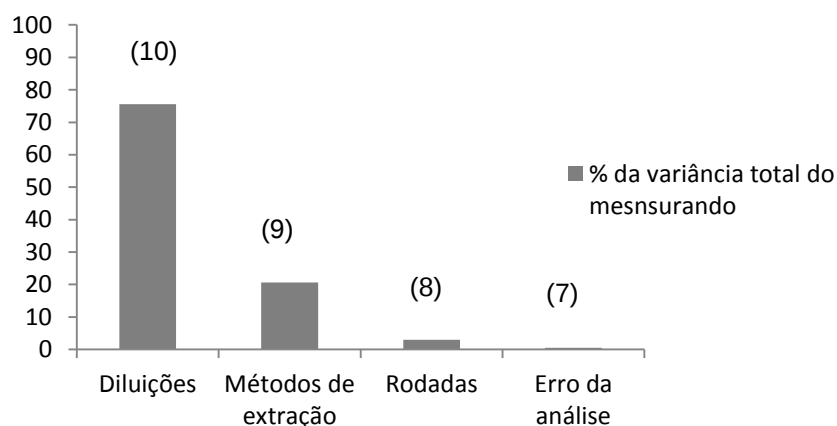


Figura 4 - Fontes de variação dos *Cycle Thresholds* utilizando diferentes *Kits* de extração de DNA com o *primer* Bru.is6501.128 para detecção de *Brucella abortus* em leite cru.. A porcentagem da variância total do mensurando para cada fonte de variação foi: (10) – 75,62% entre as diluições, (9) – 20,64% entre os métodos de extração, (8) – 3,00% entre as rodadas e (7) - 0,54% representado pelo erro da análise.

A figura 2 demonstra que apesar de o erro da análise ter sido maior do que o esperado (5%), a robustez da análise não foi afetada e não ocorreu nenhuma variância entre os métodos de extração de DNA. A figura 3 demonstra que a qPCR utilizando a região genômica *eriD* para detecção de *B. abortus* apesar de apresentar os resultados esperados para repetibilidade e reprodutibilidade, não apresentou consistência nos *Cts* encontrados utilizando os dois *kits* comerciais para a extração de DNA, apresentando uma variância total do mensurando de 40,29%, apenas um pouco abaixo da variância encontrada para as diluições, que normalmente é alta e não

interfere nos testes. Porém, essa variação entre os *Cts* não foi tão grande ao ponto de amostras sabidamente positivas apresentarem resultados negativos. Na figura 4 é possível observar uma variância de 20,64% entre os métodos de extração de DNA, porém assim como ocorreu na análise de robustez para a região genômica *eriD*, na análise da *is6501* a variância encontrada entre métodos de extração do DNA não interferiu no resultado do teste.

As figuras 5, 6 e 7 exibem a contribuição de cada fonte de variação na variação total dos valores de *Cts*, tendo como principal fonte de variação dos resultados os termocicladores.

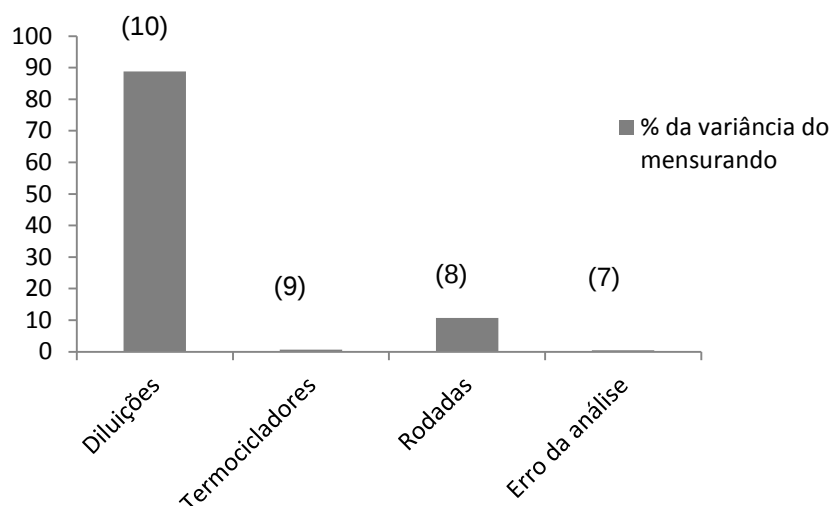


Figura 5 - Fontes de variação dos *Cycle Thresholds* utilizando diferentes termocicladores com o *primer* Mbo.is1081.71 para detecção de *Mycobacterium bovis* em leite cru. A porcentagem da variância total do mensurando para cada fonte de variação foi: (10) – 88,83% entre as diluições, (9) - 0,67% entre os termocicladores, (8) – 10,66% entre as rodadas e (7) 0,44% erro da análise.

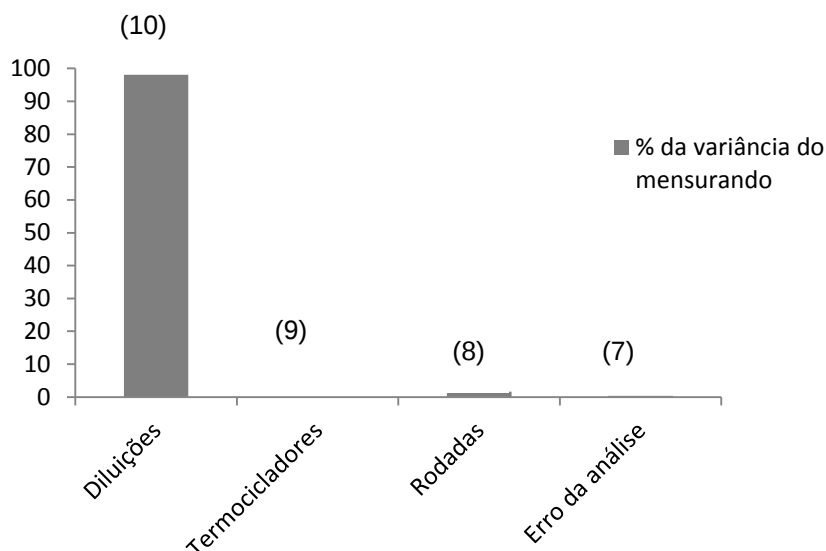


Figura 6 - Fontes de variação dos *Cycle Thresholds* utilizando diferentes termocicladores com o primer *Bru.eriD.92* para detecção de *Brucella abortus* em leite cru.

A porcentagem da variância total do mensurando para cada fonte de variação foi: (10) – 98,03% entre as diluições, (9) - 0,00% entre os termocicladores, (8) – 1,60% entre as rodadas e (7) 0,37% erro da análise.

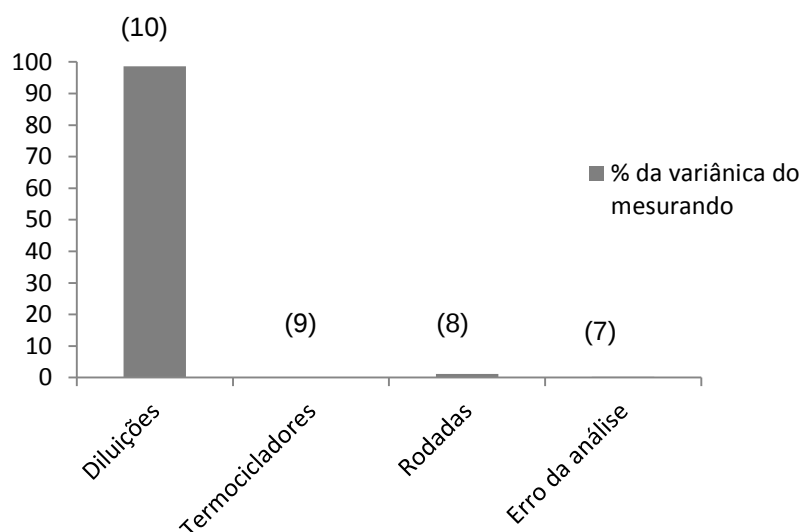


Figura 7 - Fontes de variação dos *Cycle Thresholds* utilizando diferentes termocicladores com o primer *Bru.is6501.128* para detecção de *Brucella abortus* em leite cru.

A porcentagem da variância total do mensurando para cada fonte de variação foi: (10) – 98,59% entre as diluições, (9) - 0,00% entre os termocicladores, (8) – 1,18% entre as rodadas e (7) 0,23% erro da análise.

Os valores da variância total do mensurando demonstrados nas figuras 5, 6 e 7 indicam que os testes foram resistentes à variação intencional do equipamento e por isso podem ser considerados como robustos em relação a essa fonte de variação, levando em consideração os valores próximos de zero encontrados.

O componente de maior variação em todos os testes foi a diluição, o que é de se esperar, pois são amostras independentes com diferentes concentrações dos agentes e o mesmo deve ser desconsiderado.

Estudos de robustez de método diagnóstico já foram realizados através do teste de diferentes modelos de termocicladores (ALLNUTT *et al.*, 2010 *apud* NONAKA 2012; NONAKA, 2012), enquanto Sales (2012) também demonstrou a robustez através da variação do *kit* de extração de DNA.

A validação da técnica de qPCR para detecção de *Brucella abortus* e *Mycobacterium bovis* no leite cru é uma necessidade real do LANAGRO-MG como maneira de auxiliar a identificação de animais doentes em rebanho leiteiro e para desenvolver futuras pesquisas sobre o tema objetivando o controle da brucelose e da tuberculose no Brasil. A matriz leite foi selecionada para a validação da técnica por ser um material biológico de fácil obtenção, sem a necessidade de procedimentos invasivos ou que alterem o manejo rotineiro do animal, contribuindo assim com seu bem estar e produtividade.

A técnica de qPCR tem sido amplamente utilizada para diagnóstico devido as suas altas especificidade e sensibilidade, fatores de suma importância principalmente para matriz utilizada, pois a carga de *B. abortus* e *M. bovis* liberada no leite é pequena e uma técnica pouco sensível pode gerar um resultado falso negativo. A qPCR validada nesse estudo foi capaz de identificar quantidades muito pequenas dos microrganismos alvo. A utilização do *primer* Bru.eriD.92 para a detecção de *B. abortus* permite ainda a distinção entre animais infectados e animais vacinados, o que auxilia muito o diagnóstico da brucelose levando em consideração que o diagnóstico sorológico não é capaz de fazer essa distinção.

Por fim, todos os parâmetros utilizados para a validação indicam que a técnica objeto desse trabalho pode contribuir muito com diagnóstico do animal vivo impedindo assim a disseminação desses microrganismos no rebanho e na região, favorecendo o controle da brucelose e tuberculose bovinas, objetivo do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT/MAPA. O próximo passo será o seu uso em animais naturalmente infectados para que referida técnica possa ser usada como uma ferramenta de diagnóstico oficial do MAPA.

CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo indicam que dentre as metodologias de extração de DNA avaliadas, existem dois *kits* de extração de ácido nucleico eficientes para a extração do DNA de *Brucella abortus* e *Mycobacterium bovis* em leite cru. Os métodos de qPCR desenvolvidos demonstraram alta sensibilidade analítica e ótimo desempenho confirmado por medidas de repetibilidade, reprodutibilidade e robustez avaliadas, indicando que a técnica pode ser utilizada para auxiliar o diagnóstico *in vivo* de tuberculose e brucelose bovinas, principalmente para monitoramento de propriedades produtoras de queijo artesanal certificadas com livres dessas doenças.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R.M.C.M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais**. 1998. 17f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <[file:///C:/Users/user/Downloads/Tese%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/Tese%20(3).pdf)>.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: O.P.S., p. 28-55, 2001. Disponível em: <<file:///C:/Users/user/Downloads/Acha-Zoonosis-Spa.pdf>>.
- AHMAD, S. **Pathogenesis, immunology, and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection**. Clinical and Developmental Immunology, Bethesda, v.2001, p. 819-943, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3017943/>>.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. (1988). **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.39, p.175-186, 1993
- ARÉSTEGUI, M. B.; GUALTIERI, S. C.; DOMÍNGUEZ, J.; SCHAROVSKY, O. G. **El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico**. Veterinaria México, Mexico, v. 32, n. 2, p. 131-139, abr-jun. 2001. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42332206>>.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14501**: Glossário de termos para uso no laboratório clínico e no diagnóstico in vitro. ABNT/CB-36 Comitê Brasileiro de Análises Clínicas e Diagnóstico *in vitro*. 34p. Mar/2001.
- BALDWIN, C.L., PARENT, M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-4, p. 367-382, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414157>.
- 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.** 56:577-580, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v56n5/a02v56n5.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2016.
- BARRERA L. The basis of clinical bacteriology. In: PALOMINO, J.C., LEÃO, S.C., RITACCO, V. **Tuberculosis** 2007, p. 93-112, 2007. Disponível em: <<http://www.pneumo-iasi.ro/student/tuberculosis2007.pdf>>.

BASTIANETTO, E.; AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; OLIVEIRA, D.A.A.; LEITE R.C. Brucelose em rebanhos de búfalos criados na região do Alto São Francisco, Minas Gerais. **Revta Bras. Reprod. Anim.** 29(1):55-56, 2005.

BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. (Ed.). **Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose**. Roca: São Paulo, v. 2, p. 144-160, 1988.

BAYRAKTAR, B.; BULUT, E.; BARIS, A. B.; TOKSOY, B. ; DALGIC, N. ; CELIKKAN, C.; SEVGI, D. Species distribution of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a prospective study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3837-3841, Nov, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209075/pdf/zjm3837.pdf>.

BEIGE, J.; LOKIES, J. SCHABERG, T.; FINCKH, M.; MAUCH, H.; LODE, H.; KÖHLER, B.; ROLFS, A. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. **Journal of clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 90-95, 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227886/pdf/330090.pdf>.

BELCHIOR, A.P.C. **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais**. 2001. 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Disponível em: file:///C:/Users/user/Downloads/disserta_o_de_mestrado_de_ana_paula_cunha_belchior.pdf.

BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Ed.). **Infectious diseases of livestock**, Austin: Texas A&M University Press, College Station, v. 2, p.1053-1066, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 27, de 17 de Maio de 2012**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6edeb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3ª ed. Rio de Janeiro, 2005. 239p. Disponível em: <http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/81/manual-de-bacteriologia-da-tuberculose-%5B81-080909-SES-MT%5D.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. 1ª ed. Brasília. 2008. 436p. Disponível em: file:///C:/Users/user/Downloads/Manual_Nacional_de_vigilancia_laboratorial_da_tuberculose_e_outras_micobacterias.pdf.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e a Tuberculose Animal**

(PNCEBT). Brasília; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. 184p. (Manual técnico).

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 435-446, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502002286.pdf>>.

BRICKER, B. J.; HALLING, S. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC264138/pdf/jcm00011-0042.pdf>>.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S.T. **A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex**. Proc Natl Acad Sci USA 99: 3684-3689, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC122584/pdf/pq0602003684.pdf>>.

CAMPANÃ, R. N.; GOTARDO, D. J.; ISHIZUCA, M. M. **Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina**. Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, São Paulo, 2003. 20p.

CAMPOS, D. I.; COELHO, H. E.; KAMIMURA, R.; ARANTES, V. M. A. Alterações microscópicas em linfonodos de bovinos sorologicamente positivos para brucelose. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v.12, n. 2, p. 123-127, jul./dez. 2009. Disponível em: <<http://revistas.unipar.br/?journal=veterinaria&page=article&op=view&path%5B%5D=2965>>.

CANEVARI-CASTELÃO, A. B.; NISHIBE, C.; MOURA, A.; DE ALENCAR, A. P.; DE AZEVEDO ISSA, M.; HODON, M. A.; MOTA, P. M.; SALES, E. B.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; ALMEIDA, N. F.; ARAÚJO, F. R. Draft genome sequence of *Mycobacterium bovis* strain AN5, used for production of Purified Protein Derivative. **Genome Announc** 2 (2), 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3974946/pdf/e00277-14.pdf>>.

CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, London, v. 5, n. 13, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1435926/>>

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4ª ed. Philadelphia: Lea and Febiger, p. 196-201, 1991.

CARVALHO NETA, A. V.; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; PAIXAO, T. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 184, n. 2; p.146-155, sep. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023309001518>>.

CARVALHO, M. S.; BARROSO, M. R.; PINHAL, F.; TAVARES, F. M. **Brucelose: Alguns aspectos epidemiológicos**. Medicina Interna, Lisboa, v. 2, n. 4, p. 259-261. 1995. Disponível em: < http://www.spmi.pt/revista/vol02/vol02_n4_1995_259-261.pdf>.

CASSIDY, J.P. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. **Veterinary Microbiology**, 112, 151-161, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113505003895>>.

CASTRO, A.F.P.; TRABULSI, L.R. Micobactérias e Nocardias. In: Trabulsi, .LR.; Alterthum, F.; Gompertz, O.F.; Candeia, S. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, p. 187-197, 1998.

CASTRO, D. **Prevalência da brucelose nas áreas trabalhadas pelo IESA em Minas Gerais-1980**. Boletim IESA 1, p. 1–12, 1982.

CASTRO, K. G.; LIEVORE, J. P. M.; CARVALHO, G. D. **Tuberculose bovina: diagnóstico, controle e profilaxia**. PUBVET, Londrina, v.3, n. 30, Ed. 91, Art. 648, 2009. Disponível em: <<http://bichosonline.vet.br/wp-content/uploads/2016/03/PUBVETTuberculosebovina.pdf>>.

CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N. DNA polymorphism and taxonomy of *Brucella* species. In: LÓPEZ-GOÑI, I.; MORYÓN, I. (Ed.). **Brucella: molecular and cellular biology**. 1. ed. England: Horizon Bioscience, p. 1-23, 2004.

COAD, M.; HEWINSON, R.G.; CLIFFORD, D.; VORDERMEIER, H.M.; WHELAN, A.O. Influence of skin testing and blood storage on interferon-gamma production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. **Vet. Rec.**, 160 (19), 660–662, 2007. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/160/19/660.full.pdf>>.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. A. Etiologia das micobactérias. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, UERJ. Julho / Dezembro de 2006. Disponível em: <http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=229>.

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

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

CORBEL, M. J. **Brucellosis: an Overview**. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 2, p. 213-221, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627605/pdf/9204307.pdf>>.

CORBEL, M. J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. **Veterinary Bulletin**, v.55, n.12, p.927-942, 1985.

CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Vet. Microbiol.**, v.40, n. 1-2, p.53-63, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8073629>>.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2. ed. São Paulo: Madsj, p. 213-215, 1992.

CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.N.M. A Tuberculose e micobacterioses bovina e suína: etiologia com vistas à inspeção de carnes. **Higiene Alimentar**, v. 1, n. 1, p. 21-23, 1982

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; MESLIN F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, V.4, n. 1, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627667/>>.

COSTA, A.C.F. **Tuberculose bovina: diagnóstico anatomo-histopatológico, bacteriológico e molecular em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia**. 2008, 46f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia. Salvador. Bahia. Disponível em: <<http://www.mevtropical.ufba.br/costaacf/>>.

COSTA, E.O.; CURY, R.; ROCHA, U.F. **Sobre a ocorrência da brucelose em búfalos *Bubalus bubalis* (Linnaeus 1785) no estado de Goiás**. Inquérito sorológico. *Biológico* (São Paulo), v. 39, p. 162–164, 1973.

CRAWFORD, R.P.; HUBER, J.D.; ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, p. 131-151, 1990.

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. Disponível em: <[http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792\(05\)00047-8/pdf](http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792(05)00047-8/pdf)>.

DOMOGALLA, J.; PRODINGER, W. M.; BLUM, H.; KREBS, S.; GELLERT, S.; MÜLLER, M.; ... BÜTTNER, M. Region of difference 4 in alpine mycobacterium caprae isolates indicates three variants. **Journal of clinical microbiology**, 51(5), 1381–1388, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3647898/>>.

DORAK, T. **Real-time PCR**. Newcastle University, UK, Taylor & Francis Group, p.362, 2006.

DRIGO, M.; FRANZO, G.; BELFANTI, I.; MARTINI, M.; MONDIN, A.; CEGLIE, L. Validation and comparison of different end point and real time RT-PCR assays for detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal of Virological Methods**, 201, 79–85, 2014.

DUCH, A. A. S. **Estimativa da prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de queijo minas artesanal na microrregião do serro - minas gerais**. -- 2015. 62 p. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF.

DZIADEK, J.; SAJDUDA, A.; BORUN, M. Specificity or insertion sequence-based PCR for *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Int J Tubere Lung Dis** 5:569-574, 2001.

ENGLAND, T. L; KELLY, R. D; JONES, A; MACMILLAN, WOOLDRIDGE, M. A simulation model of brucellosis spread in British cattle under several testing regimes. **Prev. Vet. Med.**, v.63, p.63–73, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587704000480>>

FERREIRA-NETO, J.S.; BERNARDI, F. Control of bovine tuberculosis, particularly in Brazil. **Hig. Alim.**, v. 1, n. 47, p. 9-13, 1997.

FERRI, R.G.; CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C., 1977. **Imunologia**, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 317 p.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2688-2693, 2007. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijis.0.65269-0#tab2>>.

FRANCO, R.M.; CAVALCANTI, R.M.S.; WOOD, P.C.B.; LORETTI, V.P.; GONÇALVES, P.M.R.; OLIVEIRA, L.A.T. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. Higiene Alimentar**. São Paulo, v.14, n. 68/69, p. 70-77, 2000.

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P. Pesquisa de infecção brucélica em bovídeos abatidos portadores de bursite. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, [online], v. 72, n. 4, p.427-433, out./dez., 2005. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/v72_4/freitas.PDF>.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.-C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; ... HEWINSON, R. G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 100, p. 7877-7882. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164681/pdf/1007877.pdf>>.

GARRO, C.; COBOS ROLDÁN, M.; ORIANI, S.; GARBACCIO S. Tuberculosis en terneros: resultados de un estudio prospectivo. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 12, n. 12, 2011. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121211/121108.pdf>>.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-4, p. 281-297, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502002146>>.

GUMBER, S.; TAYLOR, D. L.; WHITTINGTON, R. J. Protein extraction from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Comparison of methods for analysis by sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel eletrophoresis, native PAGE and surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. **J Microbiol Meth** 68: 115-127, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701206002144>>.

HAAGSMA, J. **Bovine Tuberculosis**. Office International des Epizooties (Manual Amendment, 2), 11p., 1995.

HALLING, S. M.; TATUM, F. M.; BRICKER, B. J. Sequence and characterization of an insertion sequence IS711 from *B. ovis*. **Gene**, v. 133, p. 123-127, 1993.

HARMON, B.G.; ADAMS, L.G.; FREY, M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 49, n. 7, p.1092– 1097, jul.1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3138931>>.

HERNÁNDEZ-MORA, G; PALACIOS-ALFARO, J.D; GONZÁLEZ-BARRIENTOS, R. 2013. Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments. **Rev. sci. tech Off. int. Epiz.** v.32, p.89-103. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D12412.PDF>>.

HUARD, R.C.; LAZZARINI, L.C.; BUTLER, W.R.; VAN SOOLINGEN, D.; HO, J.L. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **J. Clin. Microbiol.** 41:1637–1650. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC153936/pdf/1664.pdf>>.

HUBALÉK, Z.; SCHOLZ, H. C.; SEDLÁČEK, I.; MELZER, F.; SANOGO, Y.; NESVADBOVA, J. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 7, p. 679-688, 2007. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/vbz.2007.0143>>.

INMETRO. Coordenação geral de Acreditação. DOQ-CGRE-008. **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**. 31p., revisão nº 05, Ago/2016. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio>

JENSEN, H.E.; SCHONHEYDER, H.; JORGENSEN, J.B. Intestinal and pulmonary mycotic lymphadenitis in cattle. **J Comp Pathol.**, v. 102, n. 3, p. 345-55, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997508800230>>.

JORGE, K. S. G. **Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul. Dissertação** (Mestrado em Biologia Parasitária/ FIOCRUZ) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2001.

KANTOR, I.N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. **Vet. Microbiol.**, v.112, n.2-4, p.111-118, 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/7457959_de_Kantor_I_N_Ritacco_V_An_update_on_bovine_tuberculosis_programmes_in_Latin_American_and_Caribbean_countries_Vet_Microbiol_112_111-118>.

KHAN, I.U.; YADAV, J.S. Real-time PCR assays for genus-specific detection and quantification of culturable and non-culturable mycobacteria and pseudomonads in metalworking fluids. **Mol Cell Probes.**, v. 18, n. 1, p.67-73, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850803000859>>.

KIM, S. H.; JEONG, H. S.; KIM, Y. H.; SONG, S. A.; LEE, J. Y.; OH, S. H.; ... SHIN, J. H. Evaluation of DNA Extraction Methods and Their Clinical Application for Direct Detection of Causative Bacteria in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Culture Fluids from Patients with Peritonitis by Using Broad-Range PCR. **Annals of Laboratory Medicine**, 32(2), 119–125, 2012.

KRENKE, B.E. **Development of a novel, fluorescent, two primers approach to quantitative PCR**. Profiles in DNA, Promega Corporation, v.8, nº.1, pp.3-5, 2005. Disponível em: <<http://www.promega.com.br/-/media/files/resources/profiles-in-dna/801/development-of-a-novel-fluorescent-two-primer-approach-to-quantitative-pcr.pdf?la=pt-br>>.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, Belo Horizonte, v. 32, p. 202-212, 2008. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB206%20Lage%20vr2%20pag202-212.pdf>>.

LAISSE, C.J.M.; GAVIER-WIDÉN, D.; RAMIS, G.; BILA, C.G.; MACHADO, A.; QUEREDA, J.J.; ÅGREN, E.O.; HELDEN P.D. Characterization of tuberculous lesions in naturally infected African buffalo (*Syncerus caffer*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 5, p. 1022 - 1027, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/51639820_Characterization_of_tuberculous_lesions_in_naturally_infected_African_buffalo_Syncerus_caffer>.

LÁU, H.D.; SINGH, N.P. **Distribuição e prevalência da brucelose em búfalos no Estado do Pará**. Boletim de Pesquisa da Embrapa-CPATU, n.76, p.5-15, 1986.

LIÉBANA, E.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; DURR, P.; JAHANS, K.; CLIFTON-HADLEY, R.; SPENCER, Y.; HEWINSON, R.G.; DOWNS, S.H. Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. **The Veterinary Journal**, 176, 354-360, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307002298>>.

LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 22, n. 4, p. 145-151, 2000.

LIRA, N. S. C. **Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis* cepa REO 198 em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias intraprepuccial e conjuntival simultaneamente**. 2008. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP - Campus de Botucatu/SP, Botucatu, São Paulo. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/103073/lira_nsc_dr_botfmvz.pdf?sequence=1>.

LOPES FILHO, P.B. **Perfil epidemiológico da tuberculose bovina no Laboratório Nacional agropecuário de Minas Gerais, 2004 a 2008**. 2010, 41f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. Belo Horizonte: Minas Gerais. Disponível em: <[file:///C:/Users/user/Downloads/perfil_epidemiologico_da_tuberculose_bovina_no_laboratorio_nacional_a%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/perfil_epidemiologico_da_tuberculose_bovina_no_laboratorio_nacional_a%20(3).pdf)>.

LUCAS, A. **Simulação de impacto econômico da brucelose bovina em rebanhos produtores de leite nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil**. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MATHEWS, F.; LOVETT, L.; RUSHTON, S.; MACDONALD, D.W. Bovine tuberculosis in cattle: reduced risk on wildlife-friendly farms. **Biology Letters**, v.2, n.2, p.271-274, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1618898/pdf/rsbl20060461.pdf>>.

MATRONE, M.; KEID, L. B.; ROCHA, V. C. M.; VEJARANO, M. P.; IKUTA, C. Y.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in

aborted PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 480-489, 2009. Disponível em: <http://200.144.190.38:8180/xmlui/bitstream/handle/1/341/FMVZ_VPS_ART_FERRIRA_Evaluation%20of%20DNA_20_09.pdf?sequence=1>.

MCILROY, S.G.; NEILL, S.D.; MCCracken, R.M. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. **Vet Rec.**, 118 (26):718-721, 1986.

MELO, L.E.H.; D'ANGELINO, J.L.; CASTRO, R. S.; SCHALCH, U.M.; PACHECO, J.C.G. BENATTI, L.A.T.; ARAÚJO, W.P.; PINHEIRO, S.R. Prevalência de vacas reagentes à tuberculinização simultânea em rebanhos produtores de leite tipo C do Estado de São Paulo. **Ciência Veterinária Tropical**, Recife, v. 2, n. 2, p. 91-99, 1999.

METCALF, H. E.; LUCHSINGER, D. W.; RAY, W. C. Brucellosis. In: BERAN, G. W.; STEELE, J. H. (Ed.). **Handbook series in zoonoses**. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, p. 9-39, 1994.

MICHEL, A.L.; MULLER, B.; VAN HELDEN, P.D. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? **Vet Microbiol.**, 140:371-378, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509004015>>.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-4, p. 209-227, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502002109>>.

MORRISON, W. I.; BOURNE, F. J.; COX, D. R.; DANNELLY, C. A.; GETTINBY, G.; MCLNERNEY, J. P.; WOODROFFE, R. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. **The Veterinary Record**, n. 26, 2000.

MOURA, A.; HODON, M. A.; SOARES FILHO, P. M.; ISSA, M.; A.; OLIVEIRA, A. P. F.; FONSECA JÚNIOR, A. A. Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real time PCR. **Ciência Rural**, 46(7), 1223-1228, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000701223>.

MURAKAMI, P. S.; FUVERKI, R. B. N.; NAKATANI, S. M.; FILHO, I. R. B.; BIONDO, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 12, n. 1, p. 67-74, jan./jun. 2009. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/acvzunipar/article/viewFile/15400/16265>>.

NARAYANAN, S. Molecular epidemiology of tuberculosis. **Indian J Med Res.** v. 120, p. 233-247, 2004. Disponível em: <<http://icmr.nic.in/ijmr/2004/1003.pdf>>.

NEILL, S.D., BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1-2, p. 79-86, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979200902798>>.

NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B. et al. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Vet. Microbiol.**, v.40, n. 1, p.41-52, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113594900450>> .

NEILL, S.D.; SKUCE, R.A.; POLLOCK, J.M. Review Tuberculosis – new light from an old window. **J Appl Microbiol.**, 98:1261-1269, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02599.x/epdf>>.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v.24, p.69-98, 1980.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by sorology. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.447-59, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502002298>>.

NIELSEN, K.; GALL, D.; KELLY, W.; VIGLIOCCO, A.; HENNING, D.; GARCIA, M. **Immunoassay development: application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis**. Nepean, Ontario: Animal Disease Research Institute. O.I.E. Reference Laboratory of Brucellosis. Agriculture and AgriFood Canada, 1996.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 100, n. 1-2, p. 25-30, mai. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113504000513>>.

NONAKA, C.K.V. **Validação de uma PCR em Tempo Real Para o Diagnóstico da Doença de Aujeszky**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, Minas Gerais. 52p. 2012. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-95ZGHT>>.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento**. Ed. 33, jun-dez 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>>.

NOZAKI, C.N. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação dos métodos diagnósticos nas fases de evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis***. 2008. 102f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103775>>.

OHARA, P. M. **Microbiologia e histopatologia de linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Colheitas efetuadas de Maio/2002 à Janeiro/2004**. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-17042007-122417/pt-br.php>>.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Terrestrial manual - access online. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009, vol1, pt 2, chap. 2.4.7 Bovine tuberculosis. Disponível em: <http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.04.07_BOVINE_TB.pdf>.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Terrestrial manual – access online. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2016 vol1, pt 2, chap. 2.1.4 Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *Brucella abortus*, *b. melitensis* and *b. suis*). Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELL_OSIS.pdf>

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2013. chap.: 1.1.5. Disponível em: <http://wahis2-devt.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf>.

OLIVEIRA, P.R.; REIS, D.O.; RIBEIRO, S.C.A.; SILVA, P.L.; COELHO, H.E.; LÚCIO, W. F.; BARBOSA, F.C. Prevalência da tuberculose em carcaças e vísceras de bovinos abatidos em Uberlândia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 38, n. 6, p. 965-971, 1986.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Comité Mixto FAO/OMS de expertos em brucelosis**. Genebra, 1986. 149 p. (Série de informes técnicos, 740).

ORZIL, L. L.; PREIS, I. S.; ALMEIDA, I. G.; SOUZA, P. G.; SOARES FILHO, P.M.; JACINTO, F. B.; FONSECA JÚNIOR, A. A. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp.. **Ciência Rural**, 46(5), 847-852. 2016 Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v46n5/1678-4596-cr-0103_8478cr20150065.pdf>.

OUAHRANI, S.; MICHAUX, S.; SRI WIDADA, J.; BOURG, G.; TOURNEBIZE, R.; RAMUZ, M.; LIAUTARD, J. P. Identification and sequence analysis of IS6501 an insertion sequence in *Brucella* spp: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 3265-3273, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8126444>>.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 181-190, 2006. Disponível em: <<http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1065&context=michbovinetb>> .

PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; MENDOZA, J. H. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 127, p. 315-324, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113507004373>>.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. **O Combate à Brucelose Bovina: situação brasileira**. Jaboticabal: Funep, 2003. 154p. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/V69_2/paulin.pdf>.

PEREZ, M.A.F. **Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante?** CETEA. ISSN2175-5000. v.22, nº3, 2010. Disponível em: <http://www.cetea.ital.org.br/informativo/v22n3/v22n3_artigo2.pdf>.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. **Medicina Interna**, Lisboa, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003. Disponível em: <<http://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>>.

PINTO, P.S.A.; FARIA, J.E.; VILORIA, M.I.V.; BEVILACQUA, P.D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 3, 10-15, 2002. Disponível em: <<http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/615/359>>.

POESTER, F. **Eficácia da vacina RB51 em novilhas**. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 2006. 51.Tese (Doutorado em Ciência Animal).

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p.55-62, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S0378113502002456>>.

POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; LAGE, A. P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG: FEP/MVZ, n. 47, p.13-29, 2005.

PROBERT, W.; SCHRADER, K.; KHUONG, N.; BYSTROM, S.; GRAVES, M. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1290-1293, 2004. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/42/3/1290.full>>.

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Mycobacterium* species. In **Clinical veterinary microbiology** (pp. 156-169). Mosby, Elsevier Limited, 2004.

QUINN, P.J.; CARTER, M. ED; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe; 2005.

RADOMSKI, N.; KREITMANN, L.; MCINTOSH, F.; BEHR, M. A. The Critical Role of DNA Extraction for Detection of Mycobacteria in Tissues. **PLoS ONE**, 8(10), 2013.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10. ed. Philadelphia: Saunders Ltd, p.963-994, 2007.

RANKIN, J.E.F. 1965. *Brucella abortus* in bull: a study of twelve naturally-infected cases. **Veterinary Record** v.77, 132-135. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14330193>>.

RANTAKOKKO-JALAVA, K.; JALAVA, J. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. **J Clin Microbiol.**, 40:4211-7, 2002.

REDKAR, R.; ROSE, S.; BRICKER, B.; DELVECCHIO, V. Real-Time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p. 43-52, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S0890850800903384>>.

RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; ALMEIDA, C. A. S. **Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil**. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.32, n. 2, p.83-92, abr./jun. 2008. Disponível em:

<<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB155%20Ribeiro%20pag83-92.pdf>>.

RIEMANN, H. P.; CLIVER, D. **Foodborne infections and intoxications**. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press., 903 p., 2006.

RIVERA, P. S.; GIMÉNEZ, J. F. La tuberculosis bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 11, n. 9, p. 1695-7504, 2010. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/636/63615732006/>>.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEZUTKO, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNANDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. **Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms**. *Trends in Food Science & Technology*. Cambridge, v. 18, p. 306-319, 2007.

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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113500001899>>.

ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A.B. Tuberculose. In: TARANTINO, A.B. **Doenças pulmonares**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.294-380, 2002.

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

ROXO E. ***Mycobacterium bovis* como causa de zoonose**. Revista de Ciências Farmacêuticas. 18 (1), p. 101-108, 1997. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Eliana_Roxo/publication/234015511_M_bovis_como_causa_de_zoonose_Zoonosis_caused_by_M_bovis/links/02bfe50e47cde35748000000.pdf>.

ROXO, E. **Avaliação da resposta imunoalérgica cutânea à tuberculina em bubalinos (*Bubalus bubalis*)**. 1996. 63f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. **Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico**. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/v74_1/ruggiero.pdf>.

RUSSEL, A.D.; YARNICH, V.S.; KOULIKOVSKII, A.V. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases**. Genève: WHO, 61p, 1984. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66405/1/WHO_VPH_84.4.pdf>.

RYAN, T.J.; BUDDLE, B.M.; DE LISLE, G.W. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. **Res. Vet. Sci.**, 69, 57–61, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528800903862>>.

SAKAMOTO, S.M., ASSIS, R.A., ALENCAR, A.P. et al. Métodos auxiliares de diagnóstico da tuberculose bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v.59, p. 43-68, 2008.

SALES, M.L.; FONSECA JÚNIOR, A.A.; ORZIL, L.; ALENCAR, A.P.; HODON, M.A.; ISSA, M.A.; SOARES FILHO, P.M.; SILVA, M.R.; LAGE, A.P. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. **Genet Mol Res.** v.13, p.4607–4616, 2014. Disponível em: <<http://www.geneticsmr.com/articles/3274>>.

SANDOVAL, L.A.; ARRUDA, N.M.; TERUYA, J.M.; GIORGI, W.; AMARAL, L.B.S.; MAZANTI, M.T. **Pesquisa em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no estado de São Paulo**. Brasil. O Biológico (São Paulo), v. 45, p. 209–212, 1979.

SANGARI, F.J.; AGUERO, J.; GARCIA-LOBO, J. M. **The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus***. Microbiology. 146(Pt 2), p.487–95, 2000.

SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; TROISE, C. Títulos aglutinantes para *Brucella* em búfalos no estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol**, v. 28, p. 35–39, 1961.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H. M.; PALMER, M. V.; HARRIS, B. N.; ORLOSKI, K. A.; BUDDLE, B. M.; THACKER, T. C.; LYASHCHENKO, K. P.; WATERS, W. R. Bovine Tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 205-220, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1865-1682.2010.01148.x/epdf>>.

SCHOLZ H, C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M.S.; WHATMORE, A.M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J. DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 60, 801–808. 2010. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.011148-0#tab2>>.

SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART M, Z. Y.; GMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, p.375-82. 2008. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.65356-0#tab2>>.

SILVA, F. L.; PAIXÃO, T. A.; BORGES, A. M.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG: FEP/MVZ, n.47, p.1-12, 2005.

SKUCE, R.A.; ALLEN, A.R.; MCDOWELL, S.W.J. Herd level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. **Veterinary Medicine International**. New York v. 2012, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966479#>> .

SMITH, N.H.; KREMER, K.; INWALD, J.; DALE, J.; DRISCOLL, J.R.; GORDON, S.V.; VAN SOOLINGEN, D.; HEWINSON, R.G.; SMITH, J.M. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Theoretical Biology**, 239, 220-225, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519305003838>>.

SOUZA, A. V.; SOUZA, C. F. A.; SOUZA, R.M. *et al.* A importância da tuberculose como zoonose. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 59, p. 22-26, 1999.

TAYLOR, G. M.; WORTH, D. R.; PALMER, S.; JAHANS, K.; HEWINSON, R. G. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**, 3, 12. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1904440/>>.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. London: Comstock Publishing Associates. p.135-152, 1988.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; VAN EMBDEN, J. D. A.. NA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods Enzymol**, 235: 196-205, 1994.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; DE HAAS, P. E. W.; VAN EMBDEN, J. D. A. Insertion element IS1081: associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. **J Clin Microbiol**. v.30, p. 1772-7, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265379/pdf/jcm00031-0170.pdf>>.

VEJARANO RUIBAL, M. D. P. **Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de diferentes tecidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa 2308**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-13072009-111831/pt-br.php>>.

VERGER, J.M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.; GRAYON, M. 1987. **Taxonomy of the genus *Brucella***. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138, p. 235-238, 1987.

WALKER, R. L. ***Brucella***. In: **Microbiologia veterinária**. HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. (Ed.). Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2003. p.185-191

WARDS, B. J.; COLLINS, D. M.; LISLE, G. W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 227-240, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037811359400096F>>.

WARREN, R.M.; GEY VAN PITTIUS, N.C.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M.C.; CHEGE, G.K.; VICTOR, T.C.; HOAL, E. G.; VAN HELDEN, P. D. **Differentiation of *Mycobacterium***

tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 10:818 –822. 2006 Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2006/00000010/00000007/art00019>>.

WATRELOT-VIRIEUX, D.; DREVON-GAILLOT, E.; TOUSSAINT, Y.; BELLI, P. Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 53, p. 321-325. 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0450.2006.00957.x/pdf>>.

WHATMORE, A.M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A.; AL DAHOUK, S.; ZYGMUNT, M.S.; BREW, S. D.; PERETT, L. L.; KOYLASS, M. S.; VERGNAUD, G.; QUANCE, C.; SCHOLZ, H. C.; DICK, E. J. Jr.; HUBBARD, G.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E. *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 64, p.4120-4128, 2014.. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4811636/>>.

WHITE, P.C.; BOHM, M.; MARION, G.; HUTCHINGS, M.R. Control of bovine tuberculosis in British livestock: there is no 'silver bullet'. **Trends in Microbiology**., v.16, n.9, p.420-427, 2008. Disponível em: <[http://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X\(08\)00167-4.pdf](http://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X(08)00167-4.pdf)>.

WILDNER, L. M.; NOGUEIRA, C. L.; SOUZA, B. S.; SENNA, S. G.; SILVA, R.M.; BAZZO, M. L. Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 3, p. 207-229, 2011. Disponível em: <https://portais.ufg.br/up/63/o/2011_40_3_207_229.pdf>.

WOOD PR, ROTHEL JS. *In vitro* imunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. **Vet Microbiol.** V.40, p.125-135, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113594900515>>.

WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION SYSTEM (WAHIS) – version: 2. 2016. **List of countries by disease situation.** Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist>.

XAVIER, M. N. **Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* e avaliação comparativa de métodos sorológicos.** 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009. Disponível em: http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA7YSH6J/1/disserta_o_mnx_final.pdf>.

YEBOAH-MANU, D.; YATES, M. D.; WILSON, S. M. Application of a simple Multiplex PCR to aid in routine work of the *Mycobacterium* reference laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4166-4168, 2001. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/39/11/4166.full>>.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; FIORAVANTI, R.L.; ROXO, E.; ZUMÁRRAGA, M.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A.; SALAS, C.E. ***Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spolypotyping and restricion fragment length polymorphism.** Memórias Instituto Oswaldo, v. 96, p. 1-5, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762001000600012&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

ZUMÁRRAGA, M.J.; MEIKLE, V.; BERNARDELL, I. A.; ABDALA, A.; TARABLA, H.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. **J Vet Diagn Invest.** v.17, p.232-238. 2005. Disponível em: <http://www.academia.edu/21877913/Use_of_Touch-Down_Polymerase_Chain_Reaction_to_Enhance_the_Sensitivity_of_Mycobacterium_Bovis_Detection>.

ANEXO

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV).

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 42/2016, intitulado “Validação da técnica de PCR em tempo real para detecção de *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* em amostras de leite”, coordenado pela professora Maria A. Sacatamburlo Moreira do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 29/06/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 42/2016, named “Validation of PCR in real time to detect *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* milk samples”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on June 29, 2016 valid for 12 months.


 Prof. Atima Clemente Alves Zuanon
 Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV