



Diagnóstico de tuberculose bovina no estado da Bahia, Brasil, pela técnica de PCR multiplex

Bovine tuberculosis diagnosis in the state of Bahia, Brazil, using the multiplex PCR technique

Bruno Ribeiro dos Santos¹ , Alana Venâncio da Silva¹ , Hllytchaikra Ferraz Fehlberg¹ , Bianca Mendes Maciel¹ , Fernando Alzamora Filho*¹ 

¹ Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil.

*Autor correspondente: fafilho@uesc.br

Resumo: O diagnóstico rápido da tuberculose bovina (TB), permite a atuação de instituições oficiais de vigilância em áreas que possam constituir possíveis focos de propagação da doença. Essa pesquisa identificou o agente *Mycobacterium bovis* através do PCR multiplex das colônias isoladas. Através do serviço de inspeção oficial (Federal e Estadual), foram coletadas amostras sugestivas de TB durante a inspeção *post-mortem* de carcaças bovinas em matadouros-frigoríficos e estas foram encaminhadas ao laboratório para os diagnósticos complementares. As amostras foram comprovadas por meio de cultura bacteriológica e coloração Ziehl-Neelsen. Nos isolados caracterizados por Bacilos Ácido-Álcool Resistente (BAAR), aplicou-se a técnica de PCR multiplex visando a confirmação do agente *Mycobacterium bovis*. Foram analisadas 991.316 carcaças de bovinos. Entre estas, 32 apresentaram amostras sugestivas de TB que foram coletadas, provenientes de animais de 30 municípios. Entre as amostras coletadas, 28,1% (9/32) apresentaram crescimento em meios de cultura bacteriológicos com BAAR. Os BAAR isolados submetidos à PCR multiplex confirmaram a presença de *M. bovis*. A técnica de PCR multiplex associada ao exame bacteriológico e aplicada aos achados *post-mortem* permitiu o diagnóstico de *M. bovis* nos municípios amostrados do estado da Bahia.

Palavras-chave: inspeção; *Mycobacterium bovis*; multiplexação de PCR; vigilância epidemiológica; saúde pública.

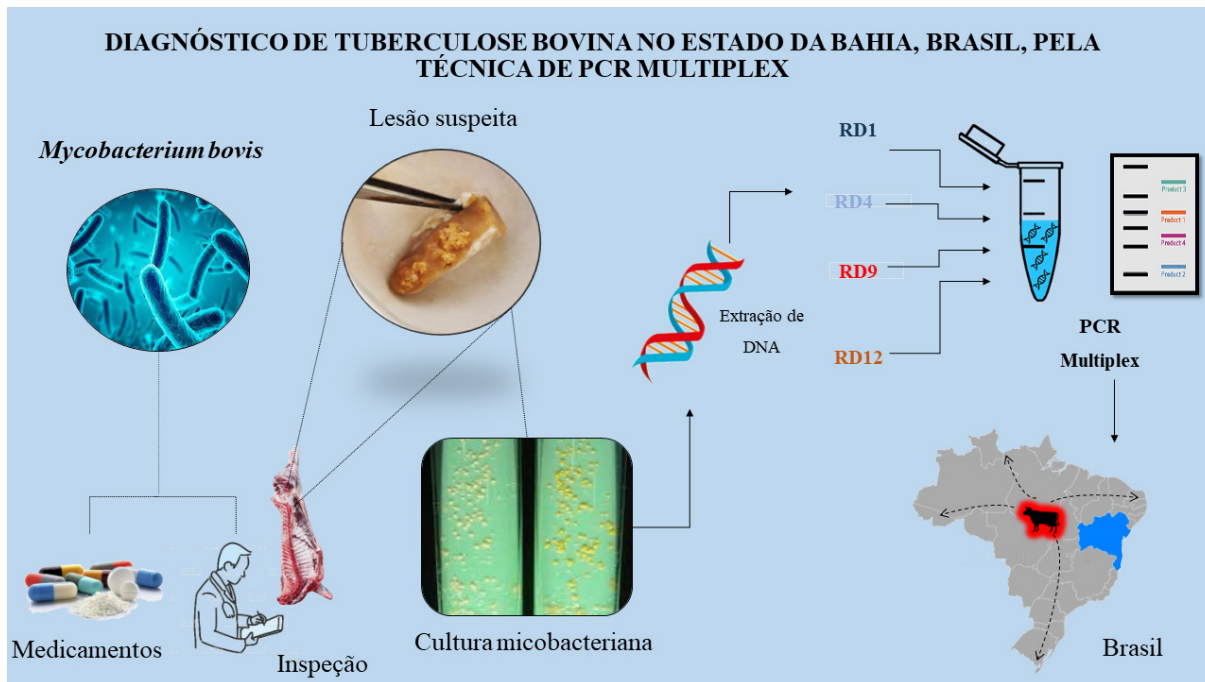
Abstract: The rapid diagnosis of bovine tuberculosis (BT) allows official surveillance institutions to act in areas that could be potential hotspots for the spread of the disease. The study aimed to identify the *Mycobacterium bovis* agent by multiplex PCR of isolated colonies. Through the official inspection service (Federal/State), samples suggestive of BT were collected during the post-mortem inspection of bovine carcasses in slaughterhouses and sent to the laboratory for complementary diagnostics. The samples were analyzed using bacteriological culture and Ziehl-Neelsen staining. In isolates characterized as Acid-Alcohol Resistant Bacilli (BAAR), the multiplex PCR technique was used to confirm the agent *Mycobacterium bovis*. 991,316 cattle carcasses were inspected, and 32 samples suggestive of BT were

Recebido: 30 de janeiro, 2024. Aceito: 20 de junho, 2024. Publicado: 16 de outubro, 2024.

collected from animals in 30 municipalities. Of these, 28.1% (9/32) showed growth on bacteriological culture media with BAAR. The BAAR isolates submitted to multiplex PCR confirmed the presence of *M. bovis*. The multiplex PCR technique associated with bacteriological examination and applied to post-mortem findings enabled the diagnosis of *M. bovis* in the municipalities sampled in the Bahia state.

Keywords: inspection; *Mycobacterium bovis*; multiplex PCR; epidemiological monitoring; public health.

Resumo gráfico:



1. Introdução

A Organização Mundial da Saúde classifica a tuberculose bovina (TB) como uma zoonose, representando um problema global de saúde pública. A doença afeta principalmente bovinos, com altas taxas de morbidade e mortalidade, outros animais domésticos e humanos, principalmente em países em desenvolvimento. Nestes países, os casos de infecção humana podem chegar a 20% ⁽¹⁾. A TB é considerada uma doença negligenciada, em que a falta de informação favorece o seu avanço e disseminação.

A TB é uma doença infecciosa bacteriana de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium bovis*, pertencente ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), responsável pela maioria dos casos de tuberculose humana e animal⁽²⁾. A doença se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões nodulares granulomatosas e pode acometer qualquer tecido ou órgão; entretanto, afeta principalmente o trato respiratório, linfonodos, principalmente retrofaríngeos, brônquicos e mediastinais e, ocasionalmente, peritônio, pleura, baço, fígado e intestinos⁽³⁾.

A TB não é apenas um problema de saúde, mas também uma preocupação econômica. Bovinos e búfalos são as espécies mais afetadas pela doença, causando perdas financeiras de até 20% decorrentes da redução da produção de leite e carne, condenações de

carcaças, alterações reprodutivas e restrições ao mercado internacional⁽⁴⁾. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) instituiu em 2001 o “Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose” – PNCEBT, para reduzir a prevalência e incidência da doença^(3, 5).

O isolamento micobacteriano é o teste “padrão ouro” para o diagnóstico de tuberculose⁽⁶⁾. Porém, a identificação da espécie do agente é impossível, necessitando de métodos moleculares complementares⁽⁷⁾, como a técnica de reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR). A técnica de PCR multiplex utiliza regiões genômicas específicas para identificar membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, complementando o cultivo bacteriológico pela identificação do agente e substituindo exames bioquímicos que de outra forma demandariam mais tempo e conhecimento técnico. Segundo Zanini et al.⁽⁸⁾, a técnica de PCR detecta efetivamente membros do complexo *M. tuberculosis*, proporcionando um diagnóstico rápido e valioso para *M. bovis* em amostras de tecido bovino sugestivas de TB.

A detecção mais precisa da doença por meio da técnica molecular de PCR multiplex possibilitará a ação da vigilância epidemiológica em seus pontos focais e auxiliará no controle da doença pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT no estado da Bahia. Além disso, reduzirá a propagação da doença no rebanho, as perdas econômicas causadas pela condenação de carcaças e o risco de a população contrair tuberculose zoonótica⁽⁹⁾. O presente trabalho investigou a presença de *M. bovis* utilizando isolamento bacteriológico seguido de PCR multiplex para diferenciar os membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* através das regiões genômicas de diferenciação.

2. Materiais e métodos

2.1 Coleta e envio de amostras

O estudo foi realizado no estado da Bahia, 5º estado mais extenso do Brasil, com uma superfície de 567.295 km², comparável à extensão territorial da França. Amostras sugestivas de TB de qualquer tecido ou órgão animal que apresentasse lesões nodulares suspeitas foram coletadas durante o exame *post mortem* dos bovinos na inspeção oficial entre março de 2020 e dezembro de 2021. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Micobacteriologia da UESC em tubos tipo Falcon (50mL) contendo solução saturada de tetraborato de sódio (Na₂[B₄O₅(OH)₄]·8H₂O, 140g/L) como conservante e, juntamente com as amostras, foram encaminhadas fichas de identificação dos animais contendo: município de origem, proprietário, data da coleta da amostra, raça, idade, sexo, descrição do tecido/órgão enviado e fiscal oficial responsável. O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (Brasil) aprovou o estudo sob registro nº 017/22, e a Agência de Defesa da Pecuária da Bahia (ADAB) deu consentimento para publicação dos resultados.

2.2 Processamento de lesões e isolamento bacteriológico

As amostras sugestivas foram maceradas manualmente em 1g (um grama) de tecido e depois descontaminadas com cloreto de 1-hexadecilpiridínio (HPC) a 1,5% por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugados para remoção do HPC, ressuspensas em solução salina 0,84% para inoculação em meios de cultura Stonebrink-Lesslie e Lowenstein-Jensen e incubados a 37°C por até 90 dias⁽¹⁰⁾. As colônias observadas no meio de cultura foram fixadas por esfregaços e coradas pelo método de Ziehl-Neelsen. Uma suspensão bacteriana dos isolados de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) foi preparada em 200µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0). A lólisis térmica foi aplicada para obter o DNA incubando a 100 °C por 30 minutos. O DNA das amostras foi quantificado em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®, EUA).

2.3 Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex (PCR)

A técnica de PCR multiplex foi realizada utilizando pares de primers baseados nas diferentes regiões genômicas do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*: RD1, RD4, RD9 e RD12⁽¹¹⁾, sendo RD1 (presente) para identificação de *M. bovis*; RD4 (presente) para *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* e *M. microti*; RD9 (presente) para *M. tuberculosis* e RD12 (ausente) para *M. canettii*, *M. caprae* e *M. bovis*. De cada amostra foram utilizados 4 µL, contendo 50ng de DNA, 0,2 unidades da enzima Platinum Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 5,0 µL de tampão de PCR, 2,0 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer. Uma amostra de DNA de *M. bovis* e *M. tuberculosis* já pertencentes ao Laboratório de Micobacteriologia da UESC representou o controle positivo e a água ultrapura (LABTRADE®) foi o controle negativo. As reações foram realizadas em termociclador (Bio-Rad iCycler® iQ5) nas seguintes condições: incubação inicial a 95°C/5 min, seguida de 45 ciclos de 94°C/min, 62°C/min e 72°C/min. min e extensão final a 72°C por 10 minutos. A eletroforese (60V/cm) separou os produtos de amplificação em gel de agarose 3% em tampão TBE 1X e visualizados por coloração com SYBR Safe (INVITROGEN®).

2.4 Análise estatística

O teste exato de Fisher avaliou a relação entre sexo e índice de positividade, considerando nível de significância de 5%. As hipóteses são:

H₀: Sexo = índice de animais positivos

H₁: Sexo ≠ índice de animais positivos

3. Resultados

De março de 2020 a dezembro de 2021, o sistema oficial de inspeção inspecionou 991.316 carcaças em 16 frigoríficos localizados em 30 municípios do estado da Bahia. Lesões sugestivas de tuberculose foram coletadas de 32 animais (4×10^{-4}), sendo 18 fêmeas e 14 machos com idade superior a 36 meses. O teste de Fisher não evidenciou relação significativa entre sexo e índice de positividade ($p = 0,1317$) (Tabela 1).

Tabela 1. Tabela de contingência que apresenta a relação entre sexo e taxa de positividade

Sexo	Índice de positividade observada			Índice de positividade esperada		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Macho	6	8	14	3,94	10,6	24
Fêmea	3	15	18	5,06	12,94	18
Total	9	23	32	9	23	32

As lesões suspeitas de TB apresentavam aspecto granulomatoso, nodular, caseoso ou calcificado. Os linfonodos corresponderam à maior parte das lesões, atingindo 68,75% (22/32) das amostras enviadas, seguidos de pulmão com 12,5% (4/32), musculatura com 9,37% (3/32), fígado com 3,12% (1/32), língua 3,12% (1/42) e abomaso com 3,12% (1/42). O exame bacteriológico revelou que 34,37% (11/32) das amostras formaram colônias nos meios de cultura específicos. As colônias apresentaram coloração creme a amarelada, bordas arredondadas, superfície rugosa e crescimento disgônico no meio de cultura: 90,9% (10/11) das amostras cresceram apenas no meio Stonebrink-Lesslie (ST) e 9,1% (1/11) cresceu tanto no meio Stonebrink-Lesslie quanto no Lowenstein-Jensen (LJ) (Figura 1).

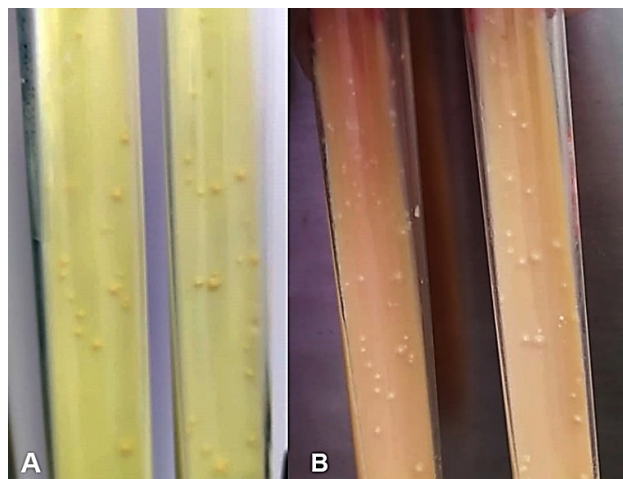


Figura 1. Teste bacteriológico positivo demonstrando formação de colônias em Stonebrink-Lesslie (A) e Lowenstein-Jensen (B)

O tempo de formação das colônias variou entre 14 e 84 dias, com média de 39 dias. Nove das 11 amostras positivas nos meios de cultura apresentaram BAAR, totalizando 28,1% das amostras analisadas. As amostras positivas foram originárias dos municípios de Itagibá/BA, Tomar do Geru/SE (Estado de Sergipe), Ibicuí/BA, Gongoji/BA, Jaremoabo/BA, Euclides da Cunha/BA, Barreiras/BA, São Gonçalo dos Campos/BA e Teodoro Sampaio/BA (Figura 2).

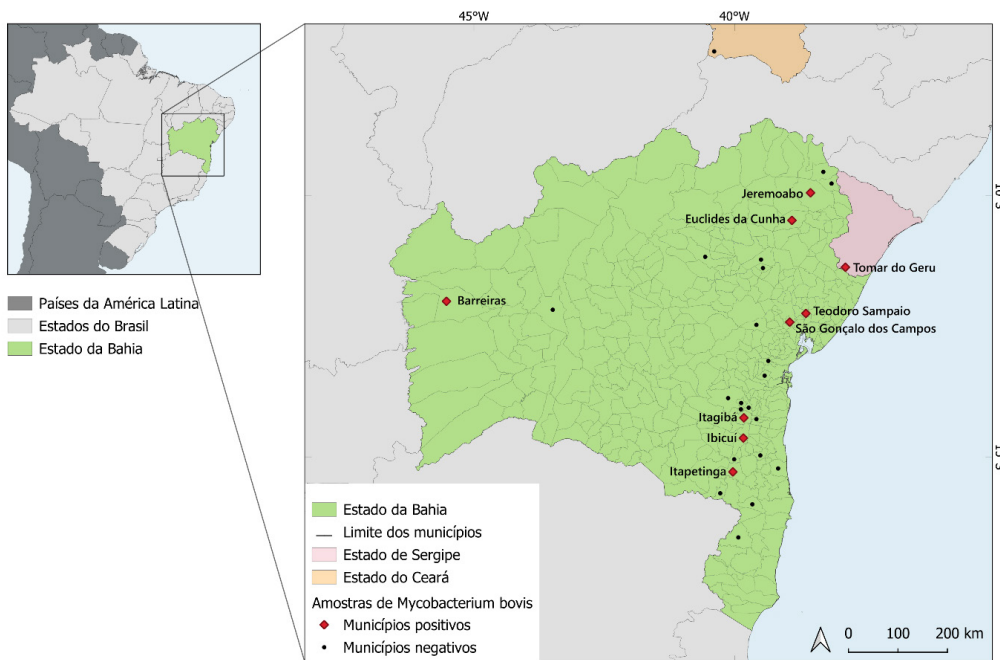


Figura 2. Mapa da Bahia com os municípios amostrados para investigação de *Mycobacterium bovis* por meio de cultura bacteriana e PCR multiplex. Os círculos pretos indicam os municípios negativos para presença do agente *Mycobacterium bovis*; diamantes vermelhos municípios positivos para *Mycobacterium bovis*.

Todas as amostras BAAR amplificaram as regiões RD1, RD4, RD9 e RD12 através de PCR multiplex (Figura 3), confirmando a presença de *M. bovis*.

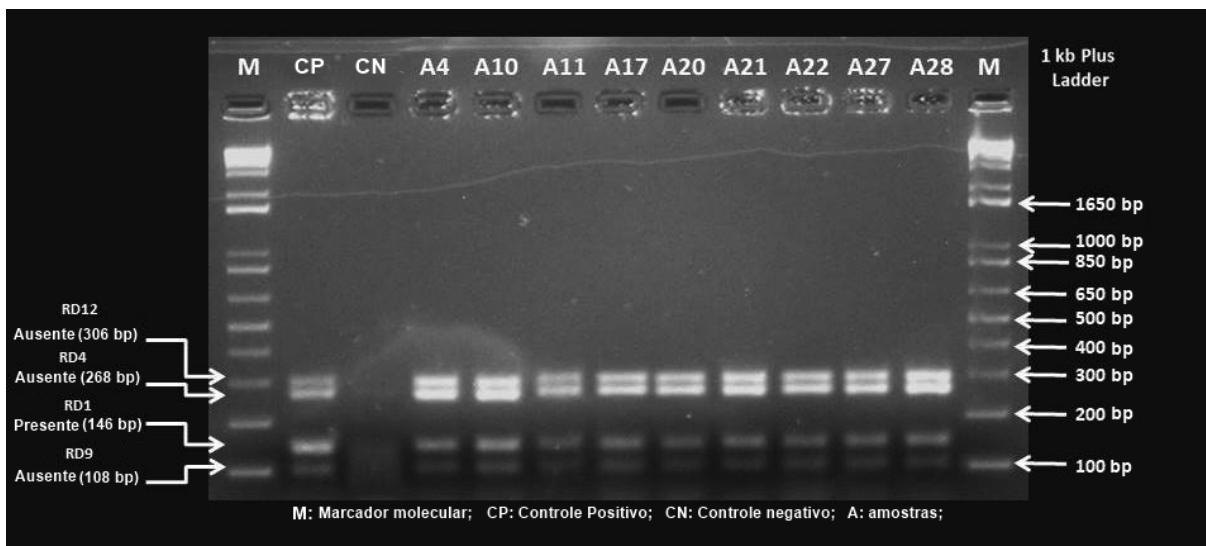


Figura 3. M- marcador molecular; CP – controle positivo; NC – controle negativo; A4-A28 – amostras de animais. As setas brancas indicam a amplificação das regiões RD1 (146 pb), RD4 (268 pb), RD9 (108 pb) e RD12 (306 pb), confirmando a presença de *M. bovis* em todas as amostras.

4. Discussão

Amostras sugestivas de tuberculose provenientes de 32 animais e 16 matadouros, onde o sistema de inspeção oficial inspecionou 991.316 carcaças bovinas. A cultura bacteriológica,

coloração e técnica de PCR Multiplex confirmaram 9/32 (28,1%) das amostras suspeitas de TB coletadas. Essas nove amostras foram provenientes de nove animais com idade superior a 36 meses de nove municípios, sendo oito municípios da Bahia/BA e um de Sergipe/SE, na divisa com a Bahia. A TB foi investigada na Bahia em estudo realizado entre 2009 e 2012, demonstrando 56% (14/25) de positividade em amostras sugestivas de TB coletadas em frigoríficos e confirmadas pela técnica de PCR multiplex⁽¹⁰⁾. No estudo citado, as principais localizações das lesões foram: linfonodos, pulmões, carcaça, fígado, língua e abomaso. Lesões macroscópicas da tuberculose são geralmente encontradas nos pulmões, cadeias linfáticas pulmonares, linfonodos e fígado⁽¹²⁾. Outros autores também relatam predomínio do acometimento de linfonodos mediastinais, seguidos de pulmão e fígado ^(10,13,14).

Em relação ao crescimento em meios de cultura específicos, as bactérias necessitaram de 14 a 94 dias para se formar, com média de 39 dias. Esses achados assemelham-se aos descritos por outros autores^(12,15,16), que encontraram tempos médios de crescimento de 21 dias, 36 dias e 28 dias, respectivamente. Embora todas as amostras do presente estudo tenham crescido no meio ST, apenas uma cresceu tanto no meio ST quanto no meio LJ. A amostra que se desenvolveu no meio LJ apresentou colônias menores que o meio ST. A redução do crescimento pode ter dependido da ausência de piruvato no meio LJ, utilizando glicerina como fonte de substrato. Essa diferença favorece o crescimento de outras micobactérias além de *M. bovis* ⁽¹⁷⁾. Porém, *M. bovis* adaptou-se ao meio de cultura, crescendo mesmo na ausência de piruvato ⁽¹⁸⁾.

A análise estatística revelou que o índice de positividade não se correlaciona com o sexo dos animais. Inúmeros outros fatores podem afetar o número de casos positivos, incluindo a imunidade do animal, que pode isolar ou espalhar a infecção através de secreções nasais, salivares, vaginais, uterinas, urinárias, de esperma e de fezes ⁽¹⁹⁾, visto que a tuberculose é uma doença infecciosa. Além disso, quanto mais velho o animal, maior a probabilidade de ele ter tido contato com outros animais infectados devido à segregação dos animais na propriedade de acordo com seu desenvolvimento ⁽²⁰⁾.

Este trabalho observou que todos os animais TB-Positivos, independente do sexo, tinham idade superior a 36 meses. Esse fato reforça o longo período que esses animais podem permanecer na propriedade até o abate, contribuindo assim para a disseminação da doença no rebanho ⁽²¹⁾. Além disso, as vacas infectadas pelo bacilo da tuberculose têm boa aparência e são vendidas pelos seus donos em vez de serem descartadas. Esse comportamento explica porque é possível encontrar vacas doentes de criadores legais, mesmo que os veterinários das fazendas leiteiras recomendem o abate. Esses animais tornam-se fontes de disseminação, causando riscos até mesmo aos manipuladores, uma vez que lesões suspeitas de TB podem ser isoladas e somente encontradas no momento do abate com base em achados *post-mortem*⁽²⁾. Outro fator que corrobora a disseminação da TB é a falta de testagem tuberculínica (TT) nas pequenas propriedades, uma vez que os animais TT positivos são descartados conforme orientações do programa, o que é visto como um prejuízo pelo produtor e faz com que ele não procure veterinários qualificados ou as agências de defesa do estado responsáveis pela realização do teste. Assim, os produtores vendem os animais ilegalmente.

O exame bacteriológico associado à coloração de Ziehl-Neelsen e PCR multiplex elimina resultados falso-positivos. Mesmo que se formem colônias, isso não indica que sejam cepas de *M. bovis*, pois pode haver o crescimento de outros microrganismos, como bactérias gram-positivas que, quando coradas, não serão visualizadas BAAR, bem como há bactérias positivas para BAAR que não são *M. bovis*. No presente trabalho, apenas uma amostra foi negativa para coloração, não indicando o isolado como BAAR. Santos ⁽⁷⁾ observou resultado semelhante, aplicando a técnica de cultivo bacteriológico seguido de coloração de Ziehl-Neelsen em amostras sugestivas de TB coletadas em feiras livres. As amostras que apresentaram crescimento de colônias no meio de cultura foram negativas para a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen.

Na presente pesquisa, a PCR multiplex possibilitou uma identificação mais precisa do agente etiológico com base na amplificação de regiões genômicas de diferença do MTBC. As regiões específicas do genoma permitem diferenciá-las pela presença ou ausência, apresentando bandas no gel de agarose com diferentes tamanhos de pares de bases (pb). As regiões amplificadas no gel foram RD1 (146 pb), RD4 (268 pb), RD9 (108 pb) e RD12 (306 pb) (Figura 3), confirmando a presença do agente *Mycobacterium bovis* em todos os isolados positivos para BAAR. Outros autores ^(10,22), que também utilizaram PCR multiplex associada à cultura bacteriana para identificar membros do complexo MTBC e fornecer um diagnóstico etiológico mais preciso, descrevem resultados semelhantes.

Apesar dos grandes avanços no campo do diagnóstico da tuberculose, os estudos ainda não demonstraram a existência de um teste ideal para o diagnóstico rotineiro da tuberculose em bovinos, sendo fundamental aumentar o investimento em pesquisas para resolver esta questão crítica no combate à doença ⁽²³⁾. Além disso, Cosivi⁽¹⁵⁾ ressalta que nenhum dos métodos diagnósticos pode ser utilizado isoladamente e que técnicas complementares (TT, bacteriologia, coloração, técnicas de PCR) devem ser sempre utilizadas para obter um diagnóstico eficaz e completo.

O serviço de fiscalização implementado em frigoríficos é uma ferramenta fundamental para rastrear áreas que podem se tornar focos de tuberculose bovina. A coleta de amostras suspeitas de TB e suas cidades de origem podem fornecer registros epidemiológicos, auxiliando as atividades do PNCEBT. Desta forma, será possível implementar um sistema de controle e monitoramento dadas as condições socioeconômicas dos municípios baianos.

5. Conclusão

A Tuberculose bovina está presente em bovinos no estado da Bahia, e a aplicação da técnica de PCR multiplex associada a exames *post-mortem* e bacteriologia permitiu o diagnóstico e identificação do *Mycobacterium bovis* com maior precisão nos municípios destacados do estado.

Declaração de conflito de interesses

Afirmamos que não há conflito de interesses relacionado à redação, autoria ou publicação deste artigo.

Contribuições do autor

Conceituação: B. S. Ribeiro, A. V. Silva, B. M. Maciel e F. F. Alzamora. *Análise formal:* H. F. Ferraz. *Metodologia:* B. S. Ribeiro, A. V. Silva, B. M. Maciel e H. F. Ferraz. *Investigação:* B. S. Ribeiro. *Administração do projeto:* F. F. Alzamora e B. M. Maciel. *Supervisão:* F. F. Alzamora e B. M. Maciel. *Redação (revisão e edição):* B. S. Ribeiro e F. F. Alzamora.

Agradecimentos

Os pesquisadores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES pelo apoio financeiro e à Agência de Defesa Agropecuária da Bahia-ADAB, pela colaboração na obtenção de amostras em frigoríficos do estado da Bahia. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001

Referências

1. Smaniotto, B. D.; Roca, R. O.; Barbosa, L. G. B.; Farias, I. M. S. C.; Brito, E. P.; Gallo, C. C.; PonteS, T. C. C.; Delbem, N. L. C. Bovine tuberculosis: impacts for livestock and risks for public health. *Veterinaria e Zootecnia*, 2019; v. 26: 45-59. Disponível em: link.gale.com/apps/doc/A634503934/AONE?u=uesc&sid=googleScholar&xid=045b95fd.
2. Murakami, P. S; Fuverki, R. B. N; Nakatani, S. M; Filho4, I. R. B; Biondo5, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar, Umuarama*,2009; v. 12: 67-74 Disponível em: <https://revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/2936>
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. In: Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília. p. 184, 2006. Português. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt>
4. Oliveira, V.M.; Fonseca, A.H.; Pereira, M.J.S.; Carneiro, A.V.; Jesus, V.L.T.; Alves, P.A.M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2008; v. 60: 574-579. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000300008>
5. Costa, L. B. Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no estado da Bahia. Dissertação. Universidade Federal da Bahia, Salvador. Bahia, 2012. Disponível em: (<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-402>)
6. Mustafa, T. et al. Immunohistochemistry using a *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Modern Pathology*, 2006; v. 19: 1606-1614, Disponível em : <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800697>
7. Santos E.S.V; Alzamora F. F., Ribeiro B.S; Silva A.V.; Gomes H. M; Suffys P.N; and Costa J.N. Spoligotyping, genotyping, and spatial distribution of *Mycobacterium bovis* in cattle in the state of Bahia, Brazil. *Pesquisa veterinária Brasileira*. 2021 V.41: e06729. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6729>
8. Zanini, M. S; Moreira E.C; Lopes M.T.P; Oliveira R.S; Leão S.C; Fioravanti R.L; Roxo E; Zumarraga 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 spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2001 v. 96: 809-813. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000600012>
9. Pacheco, A. M.; Hamzè, A. L.; Avanza, M. F. B.; Pereira, D. M.; Pereira, R. E. P.; Cipriano, R. S.; Lot, R. F. S. Tuberculose bovina – relato de caso. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 2009; V:7 :13. Disponível em: <https://faef.revista.inf.br/site/a/927-tuberculose-bovina-relato-de-caso.html>
10. Alzamora F, F.; Vasconcellos, S. E.; Gomes, H. M.; Cavalcante, M. P.; Suffys, P. N.; Costa, J. N. Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2014; v. 34: 103-108. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000200001>.
11. Warren, R. M.; Pittius, N. C.; Barnard, M.; Hesseling, A. 1; Engelke, E.; De Kock, M.; Gutierrez, M. C. ; Chege, G. K. ; Victor, T. C.; Hoal, E. G.; Van Helden, P. D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*,2006; v. 10: 818-822, 2006. Disponível em: (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16850559/>).

12. Corner, L. A.; Melville L; Mccubbin K; Small KJ; Mccormick B.S; Wood P.R; Rothel J.S. Efficiency of inspection procedures for detection of tuberculosis lesions in cattle. Australian Veterinary Journal, 1990; v. 67: 389-392. Available from: (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2085291/>). Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1990.tb03020.x>
13. Gathogo, S.M., Kuria, J.K.N.; Ombui, J.N. Prevalence of bovine tuberculosis in slaughter cattle in Kenya: a *post-mortem*, microbiological and DNA molecular study. Tropical Animal Health Production, 2012. v. 44: 1739-1744. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0131-3>
14. Pereira J.D.B; Cerqueira V.D; Junior P.S.B; Bezerra D.K.O; Araújo F. R; Dias A.C.L; Araújo C.P; Correa G.R. Diagnóstico histopatológico e molecular de lesões sugestivas de tuberculose em búfalos abatidos nos municípios de Macapá e Santana, estado do Amapá. Pesquisa Veterinária Brasileira, 2017. v.37:1198-1204. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001100003>
15. Cosivi O., Granja J., Daborn C., Raviglione M., Fujikura T., & Cousins D. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerging Infectious Diseases, v. 4, p. 59-70, 1998, pmid: 9452399. Disponível em: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627667/>)
16. Mota, P.M.P.C.; Lobato, F.C.F., Assis, R.A.; Lage, A.P., Parreiras, P.M. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2001; v.53:1-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000400003>
17. Da Silva D.A.V. Comparação entre os métodos de diagnóstico da tuberculose em bovinos abatidos em matadouros - frigoríficos do estado de São Paulo. 2015. Dissertação – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/133ccdee-db7d-491c-b4b6-769fc55ba968>
18. Centro panamericano de zoonosis. Métodos de laboratorio de micobacteriologia veterinaria para el aislamiento e identification de micobaterias. Ramos Meija, Buenos Aires, 1973. (Séries de Monografias científicas y Tecnicas, C.P.Z).
19. Abrahão, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. Archives of Veterinary Science, 1999. v. 4: 5-15. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5380/avs.v4i1.3771>
20. Kazwala, R. R., Kambarag, E. D. M., Daborn, C. J., Nyange, J., Jiwa, S. F. H., Sharp, J. M. Risk factors associated with the occurrence of bovine tuberculosis in cattle in the Southern Highlands of Tanzania, Veterinary Research Communications, Amsterdam, 2001 v. 25: 609-614. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/a:1012757011524>
21. Campos, Dúnia Ibrahim et al. Condenação de carcaças bovinas por tuberculose, brucelose e cisticercose em abatedouro-frigorífico de Uberaba-MG e métodos de diagnóstico de tuberculose em carcaças. 2019. Dissertação - Universidade Federal de Uberlândia. Available from: <https://doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1263>
22. Pinsky, B. A.; Banaei, N. Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members to the Species Level, 2008 v. 46: 2241-2246, 2008. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM.00347-08>
23. Ruggiero, A. P., A.A. Ikuno, V.C.A. Ferreira, E. Roxo. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.74, n.1, p.55-65, jan./mar., 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v74p0552007>