



**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
MYCOBACTERIUM BOVIS EM BOVINOS POSITIVOS NO TESTE
INTRADÉRMICO PARA TUBERCULOSE NA REGIÃO DE LIMEIRA,
SÃO PAULO, BRASIL**

EDUARDO LIPPARELLI FERNANDEZ

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO
PAULO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS INSTITUTO
BIOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR
E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM
BOVIS* EM BOVINOS POSITIVOS NO TESTE INTRADÉRMICO PARA
TUBERCULOSE NA REGIÃO DE LIMEIRA, SÃO PAULO, BRASIL.**

EDUARDO LIPARELLI FERNANDEZ

Dissertação apresentada para a obtenção do
título de Mestre em Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio.
Área de concentração: Segurança
Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

São Paulo - SP
2025

EDUARDO LIPARELLI FERNANDEZ

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM*
BOVIS EM BOVINOS POSITIVOS NO TESTE INTRADÉRMICO PARA
TUBERCULOSE NA REGIÃO DE LIMEIRA, SÃO PAULO, BRASIL.**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança
Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientadora:
Professora Dra. Claudia Del Fava

São Paulo
2025

Eu **Eduardo Lipparelli Fernandez**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura:  Data 12 / 06 / 2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Fernandez, Eduardo Lipparelli.

Identificação e caracterização molecular de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose na região de Limeira, São Paulo, Brasil. / Eduardo Lipparelli Fernandez. - São Paulo, 2025.
64 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2025D.EF01

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Sanidade, gestão ambiental e qualidade de alimentos, produtos e processos na produção agropecuária sustentável.

Orientador: Claudia Del Fava

Coorientador: Fabio Celidonio Pogliani

Versão do título para o inglês: Identification and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* from positive cattle in intradermal test for tuberculosis in Limeira's region, São Paulo, Brazil

1. *Mycobacterium bovis* 2. Caracterização molecular 3. Bovinos naturalmente infectados 4. Epidemiologia genética 5. Tuberculose bovina I. Fernandez, Eduardo Lipparelli II. Del Fava, Claudia III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/BiB1/2025/01

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERNANDEZ, Eduardo Lipparelli

Identificação e caracterização molecular de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose na região de Limeira, São Paulo, Brasil

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa, Nilciene, cuja presença amorosa, paciência incansável e apoio incondicional foram fundamentais em cada etapa desta caminhada. Sua força silenciosa e seu olhar compreensivo me sustentaram nos momentos mais desafiadores.

À minha amada filha, Ana Laura, e ao meu filho querido, Eduardo Leo, que, mesmo tão jovens, compreenderam minhas ausências, dividiram comigo o tempo e o silêncio, e me inspiraram diariamente com o brilho de suas existências.

Dedico esta conquista a vocês, que são meu porto seguro, minha razão e meu maior orgulho. Sem o amor e o suporte da nossa família, esta jornada não teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela presença constante, pelos gestos silenciosos de apoio e pelas palavras certas nos momentos incertos. Vocês foram e são o alicerce da minha formação humana e profissional. Tudo o que sou carrego em grande parte da dedicação, valores e força que me transmitiram. Esta conquista também é de vocês.

À Professora Dra. Claudia del Fava, minha orientadora, por todo o suporte, paciência e acolhimento. Sua orientação generosa foi essencial para a condução e conclusão deste trabalho.

À Dra. Cristina Dib, cuja atuação foi absolutamente decisiva para a realização deste projeto. Sem sua intervenção, esta pesquisa não teria sido viável.

Ao Professor Dr. Fábio Celidonio Pogliani, pela amizade sincera, companheirismo e inestimável auxílio prestado em cada etapa deste percurso. Sua presença foi sempre motivo de encorajamento.

À Professora Dra. Lília Hiromi Okuda, pela orientação inicial e pelo acolhimento que marcaram o início desta trajetória acadêmica.

Ao Professor Dr. Marcos Bryan Heinemann, pelas valiosas contribuições técnicas, sugestões pertinentes e disposição em compartilhar seu conhecimento, que enriqueceram este trabalho.

À Gisele Oliveira de Souza e à equipe do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP, que, com paciência e irreverência cativante, me ensinaram as técnicas moleculares e acolheram com entusiasmo cada etapa do processo.

À Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, pelo incentivo ao meu crescimento técnico, profissional e intelectual ao longo da carreira, bem como pelo apoio institucional que possibilitou esta realização.

À minha equipe de trabalho, pelo convívio diário e parceria constante. Em especial ao Thiago, meu melhor amigo hoje, cuja leveza, humor e companheirismo tornam os dias mais tranquilos e suportáveis — sua amizade é um presente. E ao Diego, cuja serenidade e paciência silenciosa fizeram diferença nos momentos mais exigentes. Ter vocês ao lado tornou essa trajetória mais leve.

À equipe da Regional de Defesa Agropecuária de Limeira, especialmente à médica veterinária Emiliana Gomes Ferigolli, ao servidor Luciano José Fegadolli e ao sempre querido João Ricardo Toffolo, pela dedicação na condução dos exames que fundamentaram esta pesquisa.

À equipe da Regional de Defesa Agropecuária de Avaré, especialmente à querida Marília Franco, que me mostrou um caminho menos tortuoso e me lembrou, em momentos decisivos, que há luz no fim do túnel. Ao meu amigo Bruno César, por ter acompanhado — ainda que brevemente — parte dessa jornada, deixando sua marca de apoio e parceria.

E a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram, apoiaram e acreditaram neste projeto, expresso aqui minha mais sincera e profunda gratidão.

RESUMO

FERNANDEZ, Eduardo Lipparelli - Identificação e caracterização molecular de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose na região de Limeira, São Paulo, Brasil. 2025. 64 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2025.

A tuberculose bovina (bTB) é uma zoonose crônica de grande relevância para a saúde pública e animal, causada por *Mycobacterium bovis*, espécie integrante do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Além dos impactos sanitários, a doença ocasiona perdas produtivas, abates sanitários e restrições ao comércio nacional e internacional de animais e produtos de origem bovina. No Brasil, a bTB permanece como enfermidade endêmica, com variações regionais importantes em sua prevalência e risco epidemiológico. O presente estudo teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar molecularmente cepas de *M. bovis* em bovinos naturalmente infectados, positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC), oriundos da região de Limeira, interior do estado de São Paulo. Amostras de tecidos com lesões compatíveis com tuberculose foram coletadas durante inspeções *post mortem*, submetidas a isolamento microbiológico em meios seletivos e posteriormente confirmadas quanto à presença de *M. bovis* por PCR convencional, com amplificação de fragmento específico de 500 pares de bases. Quatro isolados apresentaram positividade e foram submetidos à genotipagem por VNTR-MIRU, utilizando seis *loci* moleculares. A análise dos perfis multilocus revelou a existência de dois complexos clonais distintos (25–26 e 27–32), indicando diversidade genética intrarrebanho e sugerindo múltiplas rotas de introdução ou persistência de diferentes variantes do agente. Esses achados demonstram a aplicabilidade das ferramentas moleculares na vigilância epidemiológica da tuberculose bovina, contribuindo para a elucidação da dinâmica de infecção, rastreabilidade dos focos e aperfeiçoamento das estratégias de controle sanitário regional.

PALAVRAS-CHAVE: *Mycobacterium bovis*, caracterização molecular, bovinos naturalmente infectados, epidemiologia genética, tuberculose bovina.

ABSTRACT

FERNANDEZ, Eduardo Lipparelli – Identification and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* from positive cattle in intradermal test for tuberculosis in Limeira's region, São Paulo, Brazil. 2025. 64 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2025.

Bovine tuberculosis (bTB) is a chronic, infectious, and zoonotic disease caused by *Mycobacterium bovis*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). Endemic in Brazil, bTB remains a constraint to livestock production and trade, with regional differences in prevalence and control effectiveness. This study aimed to isolate and molecularly characterize *M. bovis* from naturally infected cattle that tested positive on the Comparative Cervical Test (CCT) in the Limeira region of São Paulo. Tissue samples showing gross tuberculous lesions were collected during official post-mortem inspection, cultured on selective media, and confirmed as *M. bovis* by conventional PCR targeting a species-specific 500 bp fragment. Four isolates were genotyped using the VNTR-MIRU method across six *loci*. Multilocus analysis identified two genetically distinct clonal complexes (25–26 and 27–32), indicating intraherd diversity and suggesting either polyclonal infection or multiple introduction events. These findings underscore the relevance of molecular epidemiology as a complementary tool in bTB surveillance, enhancing outbreak tracing, understanding of transmission dynamics, and the refinement of regional control strategies.

KEYWORDS: *Mycobacterium bovis*, molecular characterization, naturally infected cattle, molecular epidemiology, bovine tuberculosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. A PREVALÊNCIA DE FOCOS DE TUBERCULOSE BOVINA EM CADA UF (ADAPTADO DE BRASIL, 2022 E BRASIL, 2017).	16
FIGURA 2. LOCALIZAÇÃO DE PROPRIEDADES COM ANIMAIS POSITIVOS PARA TUBERCULOSE BOVINA NO ESTADO DE SÃO PAULO, ENTRE 2013 E 2022 (COSTA ET AL, 2023)	18
FIGURA 3. CIRCUITOS PECUÁRIOS DO ESTADO DE SÃO PAULO (CDA, 2024).	28
FIGURAS 4. EXAMES POST MORTEM REALIZADOS PELO SERVIÇO VETERINÁRIO OFICIAL DA CDA EM ESTABELECIMENTO SOB SERVIÇO DE INSPEÇÃO DE SÃO PAULO (SISP), COM EVIDÊNCIAS DE LESÕES SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA (ARQUIVO PESSOAL, 2023).	35
FIGURA 5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2% DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DOS LOCI VNTR43 E VNTR48, REFERENTES À TIPAGEM MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM BOVIS OBTIDOS DE QUATRO AMOSTRAS CLÍNICAS (25, 26, 27 E 32) ISOLADAS DE BOVINOS POSITIVOS AO TESTE CERVICAL COMPARATIVO NO MUNICÍPIO DE SANTA GERTRUDES (SP) (LABORATÓRIO DE ZOONOSES BACTERIANAS, FMVZ-USP, 2024).	37
FIGURA 6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2% DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DOS LOCI MIRU16, MIRU26, MIRU31 E ETR-A, OBTIDOS POR PCR PARA TIPAGEM MOLECULAR DE QUATRO ISOLADOS CLÍNICOS (AMOSTRAS 25, 26, 27 E 32) DE MYCOBACTERIUM BOVIS ORIUNDOS DE BOVINOS POSITIVOS AO TESTE CERVICAL COMPARATIVO NO MUNICÍPIO DE SANTA GERTRUDES (SP) (LABORATÓRIO DE ZOONOSES BACTERIANAS, FMVZ-USP, 2024).	38
FIGURA 7. DENDROGRAMA UPGMA DOS ISOLADOS DE MYCOBACTERIUM BOVIS COM BASE NOS LOCI VNTR-MIRU.	40
FIGURA 8. MINIMUM SPANNING TREE (MST) DOS ISOLADOS DE MYCOBACTERIUM BOVIS COM BASE NOS PERFIS MULTILOCUS VNTR-MIRU.	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 DADOS CADASTRAIS E AMOSTRAIS DO ESTUDO DE TUBERCULOSE BOVINA E BUBALINA NOS SETE CIRCUITOS, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL (CDA, 2024).	33
TABELA 2. DADOS CADASTRAIS E AMOSTRAIS DO ESTUDO DE TUBERCULOSE BOVINA E BUBALINA NA REGIÃO DE LIMEIRA, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL (CDA, 2024).	34
TABELA 3. CORRESPONDÊNCIA APROXIMADA ENTRE OS TAMANHOS DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR E O NÚMERO DE REPETIÇÕES ATRIBUÍDAS A CADA LOCUS VNTR-MIRU ANALISADO, CONFORME REFERENCIADO POR SUPPLY ET AL. (2006) E RODRÍGUEZ-CAMPOS ET AL. (2012).	39
TABELA 4. MATRIZ DE DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> COM BASE EM PERFIS MULTILOCUS VNTR-MIRU.....	39

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. PRINCIPAIS ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> (MTBC), RESPECTIVOS HOSPEDEIROS E OBSERVAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS (ADAPTADO DE FORRELLAD ET AL., 2013; PFYFFER, 2015).	20
QUADRO 2. IDENTIFICAÇÃO, LOCALIZAÇÃO GENÔMICA E SEQUÊNCIA DOS 26 <i>LOCI</i> MICROSSATÉLITES UTILIZADOS NA GENOTIPAGEM DE <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> POR VNTR-MIRU. ADAPTADO DE SUPPLY (2005).....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG	=	Bacilo de Calmette e Guérin
bTB	=	tuberculose bovina
CDA	=	Coordenadoria de Defesa Agropecuária
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
ETR	=	Exact Tandem Repeat
FAO	=	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IFN	=	intérferon
IL	=	interleucinas
IS	=	sequência de inserção
MAPA	=	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBTC	=	complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MIRU	=	mycobacterial interspersed repetitive units
mL	=	mililitros
mm	=	milímetros
OIE	=	Office International des Epizooties
ONU	=	Organização da Nações Unidas
pb	=	Pares de Base
PCR	=	Reação de Polimerização em cadeia do DNA
PNCEBT	=	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
PRGS	=	sequências polimórficas ricas em GC
QUB	=	interspersed repetitive unit
RD	=	sequências curtas de DNA conhecidas como região de diferença
SNP	=	polimorfismos de nucleotídeo único
TB	=	tuberculose humana
TCC	=	Teste Cervical Comparativo
TNF	=	fator de necrose tumoral
TbD1	=	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> deletion 1 region locus
WOAH	=	World Organisation for Animal Health
WHO	=	World Health Organization
VNTR	=	variable number of tandem repeats
UPGMA	=	Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages
UF	=	Unidade Federativa do Brasil
UV	=	ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específico	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. Agente Etiológico	20
3.2. Diversidade genética no complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC)	21
3.3. Patogênese	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Planejamento Amostral	27
4.2. Protocolo Diagnóstico	28
4.3. Questionário Epidemiológico	28
4.4. Isolamento microbiológico	29
4.4.1. Meios de cultura	29
4.4.2. Descontaminação	29
4.4.3. Leitura das colônias isoladas nos tubos	29
4.5. Identificação molecular das micobactérias	29
4.5.1. Extração do material genético	29
4.5.2. Genotipagem por VNTR-MIRU	30
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A – QUESTIONÁRIO	57
ANEXO B - INSTRUÇÕES PARA O PREENCHIMENTO DO QUESTIONÁRIO	58
ANEXO A- CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-IB	64

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (bTB) é uma doença crônica, contagiosa e zoonótica causada pela bactéria *Mycobacterium bovis*, integrante do complexo *Mycobacterium tuberculosis* – MTBC (SANCO, 2017). Embora afete predominantemente os bovinos, *M. bovis* pode infectar outros mamíferos, incluindo seres humanos, nos quais provoca manifestações clínicas semelhantes às causadas por *M. tuberculosis* (ROCHA et al., 2012). Trata-se também de uma ameaça à saúde de espécies domésticas e silvestres, além de representar um risco relevante à saúde pública, especialmente por se tratar de uma enfermidade reemergente e frequentemente negligenciada (RODRIGUES CAMPOS et al., 2014).

A transmissão da tuberculose zoonótica pode ocorrer de duas formas principais: pela via direta aerógena, por meio da inalação de partículas contaminadas; ou pela via indireta, por meio do consumo de leite cru não submetido a tratamento térmico adequado (FRANCO et al., 2017). A presença de *M. bovis* em tecidos musculares é incomum, mas não se pode descartar a possibilidade de transmissão pelo consumo de carne crua ou malcozida, especialmente diante do elevado número de abates clandestinos ou realizados em matadouros municipais sem inspeção oficial, prática ainda recorrente em várias regiões da América Latina, inclusive em áreas rurais do Brasil (WHO; OIE; FAO, 2017). Em 2010, apesar dos avanços na regulamentação da cadeia produtiva do leite no Brasil, estimava-se que cerca de 25% da produção nacional fosse comercializada sem inspeção oficial, sobretudo em regiões com produção difusa e baixo nível de tecnificação, como parte do Norte, Nordeste e Centro-Oeste, o que configurava um entrave ao controle sanitário, à rastreabilidade e à proteção da saúde pública, além de comprometer a equidade de mercado entre produtores formais e informais (ALMÉRI, 2011; EMBRAPA, 2011).

Além dos riscos à saúde pública e animal, destacam-se as perdas econômicas relacionadas aos programas de erradicação, que envolvem elevados custos operacionais, abate compulsório de animais infectados, descarte de positivos, queda na produtividade e restrições comerciais (ACHA & SZYFRES, 2003). A bTB apresenta distribuição global, com poucos países reconhecidamente livres da enfermidade, permanecendo endêmica em diversas regiões da África, Ásia, Oriente Médio e América Latina. Ainda que a Organização Mundial da Saúde e os líderes dos países membros da ONU tenham como meta a eliminação da tuberculose humana até 2030, a persistência da tuberculose zoonótica causada por *M. bovis* representa um desafio significativo para alcançar esse objetivo (WOAH, 2022).

No Brasil, a bTB ocorre de forma endêmica, com situação epidemiológica variável entre os estados e suas respectivas regiões, sendo observadas maiores prevalências no Espírito Santo, norte de São Paulo, sul de Minas Gerais e sudeste de Goiás, áreas de destaque na produção leiteira nacional (FERREIRA NETO et al., 2016). O estado de São Paulo, por exemplo, possui rebanho estimado em 11.071.603 bovinos e 122.766 bubalinos, dos quais 899.199 são vacas ordenhadas, responsáveis por uma produção anual de 1.514.425.000 litros de leite, distribuída em 188.620 estabelecimentos pecuários que ocupam 16.512.145 hectares (IBGE, 2022). Além da produção leiteira, São Paulo também se destaca no setor de carnes, tendo registrado, em 2023, o abate de aproximadamente 3.489.000 cabeças de bovinos sob inspeção federal, estadual e municipal. O número representa um aumento de 1,8% em relação ao ano anterior e posiciona o estado como o segundo maior em volume de abates no país, evidenciando sua relevância econômica e sanitária no contexto da pecuária nacional (IBGE, 2024).

Diante da relevância econômica e sanitária da atividade pecuária, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2001, com o objetivo de reduzir a prevalência e a incidência dessas enfermidades, visando à sua erradicação (BRASIL, 2001). Desde então, diversas ações estruturantes foram implementadas, resultando em um expressivo volume de dados epidemiológicos que subsidiam estratégias mais eficazes de combate (FERREIRA NETO et al., 2016). No estado de São Paulo, a Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA) é o órgão oficial responsável pela execução dessas ações, realizando a fiscalização de insumos, controle da vacinação contra brucelose, inspeção em eventos de concentração animal, monitoramento dos resultados diagnósticos e orientação aos produtores (CDA, 2023).

A fim de mapear a situação epidemiológica nacional, o PNCEBT recomenda a realização de inquéritos soroepidemiológicos sistemáticos, com abrangência nacional, que possibilitem a definição de condutas e ações ajustadas à realidade de cada estado e região, além de permitir a avaliação da eficácia das medidas adotadas (BRASIL, 2020). Até 2022, os dados oficiais da situação da tuberculose bovina foram publicados em 14 das 27 Unidades Federativas: Bahia (BAHIENSE et al., 2016), Distrito Federal (RIBEIRO et al., 2016), Espírito Santo (GALVIS et al., 2016), Goiás (ROCHA et al., 2016), Mato Grosso (NÉSPOLI et al., 2016), Mato Grosso do Sul (GUEDES et al., 2016), Minas Gerais (BARBIERI et al., 2016), Paraná (RODRIGUES et al., 2022), Pernambuco (LIMA et al., 2016), Rio Grande do Sul (QUEIROZ et al., 2016), Rondônia (VENDRAME et al., 2016), Santa Catarina (VELOSO et al., 2016), São Paulo (DIAS et al., 2016) e Tocantins (FERREIRA NETO et al., 2021). A

prevalência de focos de tuberculose em cada estado está representada na Figura 1, que também apresenta a classificação de risco sanitário adotada pelo programa.

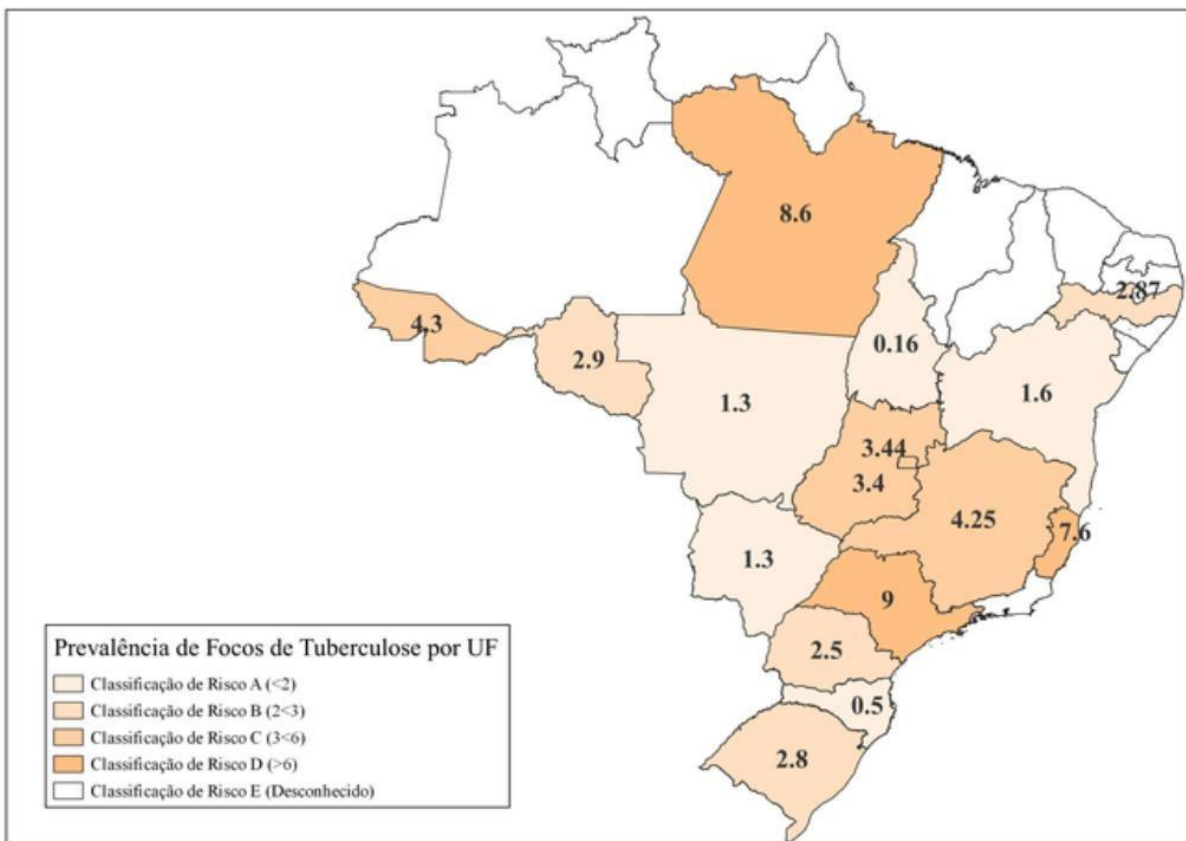


Figura 1-a. A prevalência de focos de tuberculose bovina em cada UF (Adaptado de BRASIL, 2022 e BRASIL, 2017).

Com base nesses dados, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento classificou as Unidades Federativas em cinco categorias de risco sanitário para tuberculose bovina: Classe A (risco insignificante, com prevalência menor do que 2%), Classe B (risco baixo, entre 2 e 3%), Classe C (risco moderado, entre 3 e 4%), Classe D (risco alto, maior do que 4%) e Classe E (risco indeterminado). De acordo com a classificação publicada pelo MAPA em outubro de 2020, os estados de Tocantins, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Bahia estão enquadrados na categoria de risco insignificante (Classe A), enquanto Estados como Paraná, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Rondônia apresentam risco baixo (Classe B). Especificamente no caso de São Paulo, o risco é classificado como elevado (Classe D) tanto para tuberculose quanto para brucelose bovina, conforme os dados do programa. As demais Unidades da Federação apresentam classificações variáveis, entre moderado e alto, havendo ainda estados com classificação indeterminada, seja pela ausência de dados consolidados ou pela necessidade de atualização dos inquéritos epidemiológicos. Essa categorização

fundamenta a definição dos procedimentos de defesa sanitária animal a serem adotados conforme o risco epidemiológico de cada região e compõe a base da estratégia do programa, que também prevê medidas sanitárias compulsórias associadas a ações de adesão voluntária por parte dos produtores e estabelecimentos, conforme orientações do manual técnico do PNCEBT (BRASIL, 2020).

Os principais componentes da vigilância para a tuberculose bovina são: detecção de lesões em abatedouros, com a confirmação laboratorial de *M. bovis*; e realização periódica de estudos transversais com testes tuberculínicos para detecção de focos nas propriedades que não enviam bovinos para abate em estabelecimentos cadastrados junto ao Serviço Veterinário Oficial (CALLEFE e FERREIRA NETO, 2020). Estudos realizados no país, a partir de exames de carcaças em matadouros frigoríficos, estimaram uma prevalência de tuberculose bovina de 0,17% em Minas Gerais, 5,16% no Pará e 0,64% no Rio Grande do Sul (ARAÚJO, 2004). Com o objetivo de caracterizar a distribuição espacial da tuberculose bovina no Estado de São Paulo, Costa et al. (2023) conduziram um estudo retrospectivo com base em registros de bovinos diagnosticados durante inspeções *post mortem*, realizadas entre 2013 e 2022, em frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF). Além da caracterização dos focos detectados em abate, o estudo permitiu a identificação das propriedades de origem dos animais positivos, possibilitando o georreferenciamento das unidades produtoras envolvidas, conforme ilustrado na Figura 2.

A identificação de alterações anatomopatológicas características durante a inspeção *post mortem* em matadouros frigoríficos, associada à aplicação de métodos diretos de diagnóstico, constitui uma ferramenta essencial na vigilância epidemiológica da tuberculose bovina (BIFFA; BOGALE; SKJERVE, 2010). Nos últimos anos, as técnicas moleculares vêm sendo amplamente utilizadas como complemento aos métodos convencionais, tanto para a identificação e confirmação de cepas de *Mycobacterium bovis*, quanto para elucidar aspectos relacionados à epidemiologia molecular da doença (RAMOS et al., 2014). A primeira tentativa de diferenciar isolados de *M. bovis* por meio do polimorfismo da sequência de DNA foi realizada por Collins e De Leslie (1985), marco que impulsionou o desenvolvimento de ferramentas genômicas para o diagnóstico e tipificação. Estudos posteriores demonstraram que a *polimerase chain reaction* (PCR) permite maior acurácia diagnóstica e redução significativa do tempo necessário para a identificação dos isolados, em comparação aos métodos tradicionais.

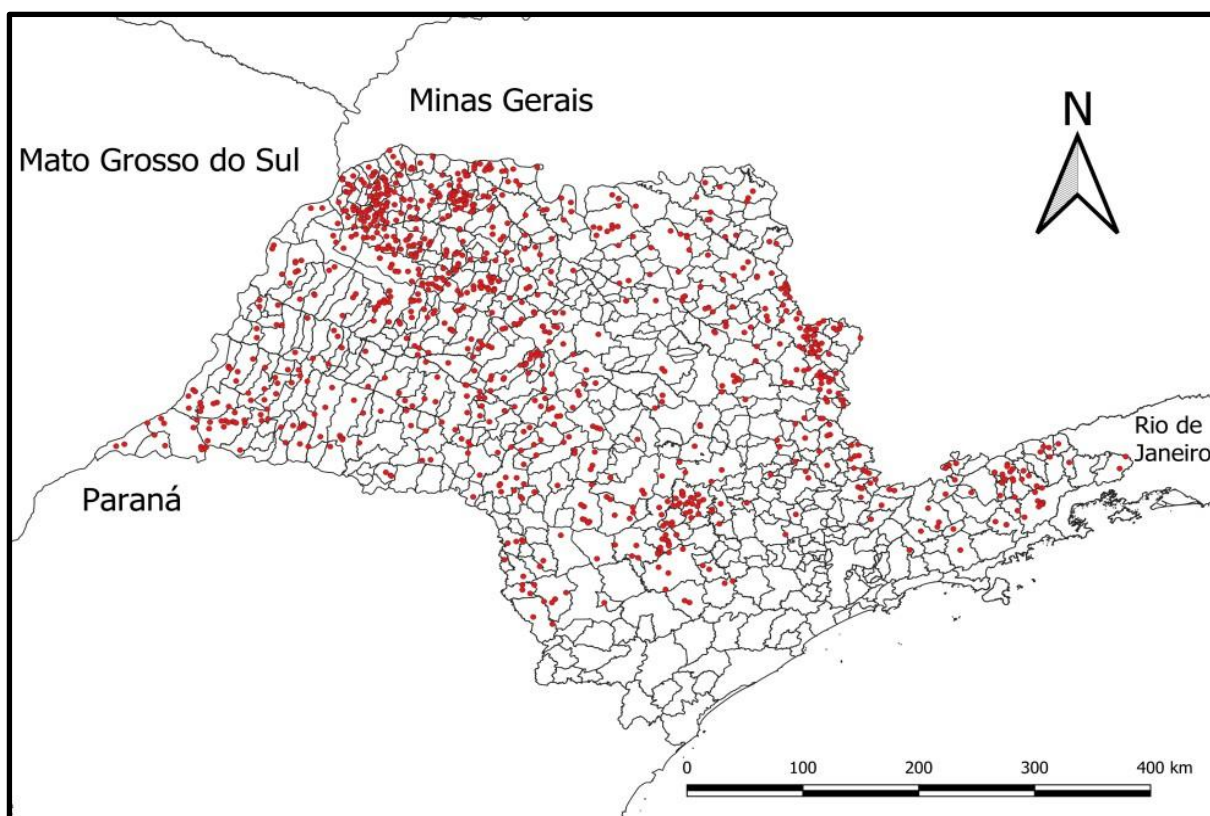


Figura 1-b. Localização de propriedades com animais positivos para tuberculose bovina no Estado de São Paulo, entre 2013 e 2022 (COSTA et al, 2023)

O conhecimento da sequência genômica de *M. bovis* e *M. tuberculosis* viabilizou a aplicação de técnicas de tipificação molecular, que têm contribuído para a compreensão da estrutura populacional, dinâmica de transmissão e evolução do patógeno (RAMOS et al., 2014). A associação entre o isolamento micobacteriano a partir de tecidos bovinos, seguido pela identificação molecular e genotipagem, tem se mostrado fundamental para o aprimoramento das estratégias de vigilância e controle da tuberculose bovina (CAZOLA et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Demonstrar a ocorrência da infecção natural de bovinos por *M. bovis* por meio do isolamento do agente e sua caracterização molecular em amostras de tecidos dos bovinos oriundos da região de Limeira, SP, Brasil.

2.2. Objetivos específico

Isolar, com uso de técnicas clássicas de microbiologia, cepas de *Mycobacterium sp* provenientes de bovinos positivos no TCC e com lesões granulomatosas compatíveis com tuberculose bovina.

Caracterizar os isolados, com vistas à identificação de *M. bovis*.

Conhecer a diversidade genética de *M. bovis* em casos de tuberculose bovina em rebanhos da região do estudo, pela aplicação de genotipagem molecular VNTR-MIRU.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Agente Etiológico

A tuberculose bovina (bTB) é uma enfermidade crônica, contagiosa e zoonótica, causada pelo *Mycobacterium bovis*, integrante do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Esse complexo é composto por micobactérias geneticamente relacionadas, incluindo as espécies *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. suricattae*, *M. mungi* e *M. orygis* (RODRIGUES, 2017). De acordo com Smith (2006) e Van Ingen (2012), algumas dessas espécies, como *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti* e *M. orygis*, possuem ampla capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros mamíferos, sendo agentes etiológicos de formas específicas de tuberculose em várias espécies animais. Essa diversidade de hospedeiros e manifestações clínicas encontra-se detalhada no quadro 1, adaptado de Forrellad et al. (2013) e Pfyffer (2015), o qual apresenta as principais espécies do MTBC e seus respectivos hospedeiros preferenciais.

Quadro 1. Principais espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), respectivos hospedeiros e observações epidemiológicas (Adaptado de FORRELLAD et al., 2013; PFYFFER, 2015).

MTBC	Hospedeiro Principal	Observações principais
<i>M. tuberculosis</i>	Humanos	Agente etiológico clássico da tuberculose humana; principal espécie do complexo.
<i>M. africanum</i>	Humanos (África Ocidental)	Endêmico em algumas regiões da África; menos transmissível que <i>M. tuberculosis</i> .
<i>M. bovis</i>	Bovinos	Zoonose importante; infecta também humanos e outros mamíferos; resistente à pirazinamida.
<i>M. caprae</i>	Caprinos e bovinos	Distribuição principalmente europeia; também zoonótica.
<i>M. microti</i>	Roedores	Baixa virulência em humanos; ocasionalmente isolado de pacientes imunossuprimidos.
<i>M. pinnipedii</i>	Pinípedes (focas e leões-marinhos)	Zoonose emergente; já documentada em humanos em contato com animais marinhos.

<i>M. mungi</i>	Mangustos	Detectado em populações selvagens da África; zoonose ainda não totalmente compreendida.
<i>Mycobacterium suricattae</i>	Suricato	Casos descritos em zoológicos e vida livre na África; importante para conservação animal.
<i>Mycobacterium canettii</i>	Humanos (África Ocidental)	Espécie rara; crescimento liso; considerada ancestral dentro do MTBC.
<i>M. orygis</i>	Antílopes e bovinos (Ásia)	Emergente; já documentado em humanos na Índia e em outros países asiáticos.

Essas bactérias pertencem ao grupo dos bacilos álcool-ácido resistentes, são aeróbias não formadoras de esporos, imóveis, não se coram pelo método de Gram, apresentam morfologia ligeiramente curva e podem apresentar ramificações de ácidos micólicos em sua parede celular (FONG, 2020). As espécies do gênero *Mycobacterium* possuem um envelope de parede celular altamente complexo, com baixa permeabilidade, o que confere resistência a muitos antibióticos e corantes, além de permitir sua distinção em relação a outros gêneros bacterianos por meio da coloração diferencial de Ziehl-Neelsen (KANABALAN et al., 2021).

O gênero *Mycobacterium* pode ser subdividido em dois grandes grupos, com base na velocidade de crescimento em meios de cultura: micobactérias de crescimento rápido e de crescimento lento (KANABALAN et al., 2021). As espécies *M. bovis*, *M. tuberculosis* e *M. leprae*, agentes etiológicos da tuberculose bovina, tuberculose humana e hanseníase, respectivamente, são classificadas como de crescimento lento. Em contraste, espécies como *M. smegmatis*, geralmente não patogênicas ou oportunistas, apresentam crescimento rápido, característica também observada em outras micobactérias não tuberculosas (FORRELLAD et al., 2013).

3.2. Diversidade genética no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

Após a publicação da primeira sequência genômica completa de *Mycobacterium tuberculosis* por Cole (1998), diversos estudos genômicos foram conduzidos com o objetivo de compreender melhor a variabilidade genética entre as micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). A partir desses avanços, diferentes ferramentas de tipagem molecular passaram a ser amplamente utilizadas para investigar a diversidade genética dentro do grupo, destacando-se os trabalhos de Van Embden et al. (1993), Kamerbeek et al.

(1997) e Supply et al. (2001). Esses estudos revelaram uma diversidade genética intrínseca ao MTBC superior ao inicialmente estimado, evidenciando a ocorrência de significativas reorganizações genômicas entre as espécies do complexo (GALAGAN, 2014).

Apesar da alta similaridade genômica entre os membros do MTBC, com mais de 99% de identidade na sequência do DNA, foram identificadas diferenças marcantes relacionadas ao tropismo, à virulência e à patogenicidade (BROSCH et al., 2002; COMAS et al., 2013). Há evidências robustas de que o MTBC evoluiu a partir de um ancestral comum, por meio de eventos sucessivos de inserções e/ou deleções de segmentos de DNA, que contribuíram para o processo de especiação e para a diferenciação fenotípica entre linhagens (KANABALAN et al., 2021).

Estudos de genômica comparativa permitiram a identificação de 14 Regiões de Diferença (RD1 a RD14), presentes no genoma da cepa de referência *M. tuberculosis H37Rv*, mas ausentes em *M. bovis BCG*, cepa atenuada utilizada na vacinação. Essa ausência permitiu inferir a localização de genes cromossômicos associados à patogenicidade (KANABALAN et al., 2021). Em contrapartida, outras seis regiões genômicas, incluindo a deleção específica *TbD1* (*Tuberculosis Deletion 1*) e as deleções RvD1 a RvD5, estão ausentes no genoma da cepa *H37Rv* em comparação com outras linhagens do MTBC, o que indica uma trajetória evolutiva específica dessa cepa laboratorial (FORRELLAD et al., 2013).

Diversos fatores foram identificados como responsáveis pela variação genética entre os membros do MTBC. Dentre eles, destaca-se a localização distinta da sequência de inserção *IS6110* e a variação no número de cópias dessa sequência em diferentes linhagens, como observado nas espécies *M. bovis* e *M. tuberculosis* (KANABALAN et al., 2021). A análise dessa região por meio da técnica de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (*RFLP-IS6110*) constitui um dos métodos moleculares clássicos para a diferenciação de variantes genéticas dentro do MTBC, ao lado da tipagem por oligonucleotídeos espaçadores (*spoligotyping*), que se baseia na detecção de regiões cromossômicas polimórficas associadas a elementos de DNA repetitivos e móveis (BARNES e CAVE, 2003).

Além disso, pequenas alterações genéticas podem resultar da variabilidade nas sequências polimórficas ricas em GC (PGRS), pertencentes ao subgrupo da família de proteínas *Pro-Glu* (PE), cuja diversidade contribui para a diferenciação genômica entre as linhagens do MTBC (PYM et al., 2002). Outro fator importante são as regiões de diferença (RDs), que consistem em sequências curtas de DNA presentes ou ausentes em determinadas estirpes, permitindo identificar eventos de deleção que podem explicar a evolução e a divergência entre os membros do complexo (LEWIS et al., 2003).

Em 1997, Supply et al. identificaram 29 *loci* de VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) presentes no genoma dos membros do MTBC, que denominaram de *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU), por apresentarem semelhança com as sequências de minissatélites descritas no genoma humano. Posteriormente, em 2000, utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), um algoritmo amplamente empregado para comparações entre sequências nucleotídicas e proteicas (ALTSCHUL et al., 1990), Supply et al. identificaram 12 novos *loci* adicionais no genoma da cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Esses *loci* estão dispersos em regiões intergênicas do genoma e apresentam de 40 a 100 pares de bases, sendo considerados marcadores úteis para estudos de evolução molecular e relações filogenéticas entre isolados de *M. bovis* e *M. tuberculosis* (SUPPLY et al., 1997; ROCHA, 2013).

Comparativamente à técnica de *RFLP-IS6110*, a genotipagem baseada em MIRU-VNTR oferece vantagens significativas, como maior rapidez, reprodutibilidade, sensibilidade e aplicabilidade universal a isolados do complexo *M. tuberculosis*, inclusive aqueles com baixo número de cópias do elemento *IS6110*. Além disso, possibilita fácil padronização e comparação de perfis genéticos entre diferentes laboratórios (MAZARS et al., 2001). Os *loci* MIRU são classificados em três classes distintas (I, II e III), com base em seu comprimento, sequência nucleotídica e organização estrutural. As sequências da Classe I possuem aproximadamente 77 pb, enquanto as Classes II e III apresentam, respectivamente, lacunas de 24 pb e 15 pb nas extremidades 3' e 5' das sequências-tipo da Classe I, configurando variações estruturais que conferem utilidade adicional na genotipagem de cepas do MTBC (SUPPLY et al., 1997; ROCHA, 2013).

Além disso, os membros do MTBC manifestam fenótipos patogênicos distintos, o que provavelmente resulta da evolução simultânea e contínua desse grupo bacteriano em diferentes hospedeiros, incluindo humanos e animais (COMAS et al., 2013; GALAGAN, 2014). O isolamento genético prolongado, muitas vezes associado a barreiras geográficas, também contribuiu para o surgimento de fenótipos diferenciados, caracterizando o chamado “isolamento genotípico” (GHEBREMICHAEL et al., 2010). Estudos genômicos comparativos demonstraram que quaisquer dois genomas dentro do MTBC diferem, em média, por aproximadamente 2.500 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), mesmo apresentando mais de 99% de similaridade em sequência (COMAS et al., 2013; COSCOLLA e GAGNEUX, 2014).

Essa heterogeneidade genética culmina em variações fenotípicas e diferenciais na expressão gênica (KANABALAN et al., 2021). Por exemplo, Rustad et al. (2014) investigaram

o papel de 206 fatores transcricionais de *M. tuberculosis* por meio de sua superexpressão a partir de um promotor induzível, identificando 9.335 eventos regulatórios envolvendo 183 desses fatores, os quais afetaram aproximadamente 70% do genoma da bactéria. Shell et al. (2013) também demonstraram que a DNA metiltransferase *MamA* desempenha papel regulatório relevante na expressão gênica em *M. tuberculosis*, sendo crucial para sua sobrevivência sob condições de hipóxia.

Apesar dos avanços, os mecanismos moleculares que impulsionam a evolução adaptativa do MTBC ainda são pouco compreendidos, especialmente considerando os múltiplos hospedeiros, ambientes ecológicos diversos e forças evolutivas atuantes, como a seleção natural e pressões imunológicas, que contribuíram para a especiação e diversidade funcional observadas no grupo (KANABALAN et al., 2021).

Do ponto de vista filogenético, o MTBC é atualmente subdividido em nove linhagens principais (L1 a L9), com distribuição geográfica característica: L1 (região do Oceano Índico e Filipinas), L2 (Leste Asiático), L3 (África Oriental e Índia), L4 (Europa e Américas), L5 e L6 (África Ocidental, conhecidas como linhagens *M. africanum*), L7 (Corno de África), L8 (região dos Grandes Lagos, África Oriental) e L9 (África Oriental) (BRITES et al., 2018; COSCOLLA et al., 2021; NGABONZIZA et al., 2020). Dentre essas, as linhagens L1, L2, L3, L4 e L7, compostas por *M. tuberculosis sensu stricto*, são responsáveis pela maioria dos casos de tuberculose no mundo (BROSCH et al., 2002; SMITH et al., 2009; GALAGAN, 2014). Já as linhagens L5 e L6 apresentam menor virulência e transmissibilidade em comparação com outras linhagens, conforme evidenciado em modelos experimentais (COSCOLLA e GAGNEUX, 2014; ASARE et al., 2018).

Essas linhagens filogenéticas podem ainda ser subdivididas em sublinhagens ou complexos clonais, com base em seus perfis de espoligotipagem e assinaturas genômicas específicas (STREICHER et al., 2007; MERKER et al., 2015; STUCKI et al., 2016). Adicionalmente, com base na presença ou ausência da região *TbD1*, as cepas do MTBC são classificadas em linhagens modernas, com deleção de *TbD1* (L2, L3 e L4), e linhagens antigas, que preservam essa região (L1, L5, L6, L7 e L8) (BORITSCH et al., 2014).

3.3. Patogênese

A patogênese da tuberculose causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), especialmente pela *M. tuberculosis*, envolve uma intrincada interação entre os fatores bacterianos e o sistema imunológico do hospedeiro. Nesse contexto, os macrófagos, a formação de granulomas e a atuação do interferon gama (IFN- γ), produzido por linfócitos T CD4⁺,

constituem o eixo central da imunidade protetora contra a tuberculose, mediando respostas sistêmicas voltadas à contenção da infecção (DE MARTINO et al., 2019).

No estágio inicial da infecção, as gotículas contendo bacilos alcançam os alvéolos pulmonares, onde são fagocitadas por macrófagos alveolares e outras células fagocíticas. A *M. tuberculosis* é, então, internalizada por essas células, que fornecem o nicho celular primário para sua replicação intracelular (AHMAD, 2011). Assim, os macrófagos desempenham papel duplo: ao mesmo tempo que atuam como efetores da imunidade inata, também contribuem para o estabelecimento da infecção latente e para sua disseminação sistêmica, ao transpor a barreira alveolar carregando os bacilos (BERMUDEZ et al., 2002).

A disseminação do patógeno para os linfonodos regionais e outros tecidos ocorre via vasos linfáticos e corrente sanguínea, antecedendo o início da resposta imune adaptativa (AHMAD, 2011). Nos linfonodos, a ativação da resposta imune adaptativa ocorre principalmente por meio da interação entre células dendríticas, que apresentam antígenos, e os linfócitos T CD4⁺, que reconhecem esses antígenos e iniciam a resposta específica. Os macrófagos, embora sejam componentes centrais da imunidade inata, também participam desse processo ao atuarem como células apresentadoras de antígenos e produtoras de citocinas que modulam e amplificam a resposta imune adaptativa (DE MARTINO et al., 2019). A maioria dos indivíduos imunocompetentes desenvolve uma resposta celular eficaz entre duas e oito semanas após a infecção, capaz de conter a multiplicação bacilar (AHMAD, 2011). Quando essa contenção falha, os bacilos se multiplicam no meio extracelular e secretam proteínas e lipídios que modulam a resposta do hospedeiro (PALUCCI & DELOGU, 2018).

A ativação de macrófagos e a resposta adaptativa subsequente levam à fusão do fagossomo com o lisossomo e à liberação de citocinas como IFN- α , TNF- α , IFN- β , IL-1 β , IL-6 e IL-12. Essas citocinas são cruciais para a contenção bacteriana, mas também podem provocar inflamação intensa e destruição tecidual (DOMINGO-GONZÁLEZ et al., 2017). Contudo, ainda não se compreende totalmente o equilíbrio dinâmico entre a contenção da infecção e o dano tecidual em indivíduos imunocompetentes (BARRY et al., 2009). Estudos com primatas não humanos revelaram que granulomas pulmonares podem conter grande número de bacilos replicantes ou, alternativamente, apresentar completa esterilização, resultado da variabilidade das respostas imunes inata e adaptativa (LIN et al., 2014).

A formação de granulomas representa uma tentativa do organismo hospedeiro de isolar os bacilos e limitar a progressão da infecção, ao mesmo tempo que minimiza os danos aos tecidos adjacentes (SANCHEZ et al., 2011). No caso da tuberculose bovina, causada por *M. bovis*, as lesões granulomatosas têm sido amplamente estudadas visando à elucidação dos

mecanismos de controle micobacteriano pelo hospedeiro e à compreensão da persistência do patógeno (ARANDAY-CORTÉS et al., 2013). Essas lesões, de caráter nodular, podem acometer diversos órgãos, com predileção pelo trato respiratório e linfonodos bronquiais e mediastínicos, sendo também observadas em fígado, intestino, baço, pleura e peritônio (HEINEMANN et al., 2008).

Em bovinos, a evolução da tuberculose é crônica, caracterizando-se por granulomas predominantemente localizados no sistema respiratório e nos linfonodos traqueobrônquicos, com infiltrado de células mononucleares, como macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas (NEILL et al., 1994). Apesar dos avanços no entendimento das lesões causadas por *M. bovis*, ainda persistem lacunas significativas sobre a evolução e variabilidade morfológica dos granulomas em diferentes fases da infecção natural (CARRISOZA-URBINA et al., 2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A execução dos exames e a aplicação dos questionários foram realizadas pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA), sob a coordenação do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), com apoio técnico do Centro Colaborador em Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

Antes do início do trabalho de campo, toda a equipe da CDA envolvida foi capacitada quanto ao planejamento amostral, aos testes diagnósticos empregados, à aplicação dos questionários epidemiológicos (Anexo B) e à utilização de equipamentos de georreferenciamento. Os questionários foram elaborados com o intuito de permitir uma caracterização detalhada da tipologia das propriedades foco e da relação dos fatores de risco associados à ocorrência da tuberculose bovina.

4.1. Planejamento Amostral

O delineamento amostral foi desenvolvido pelo MAPA, com suporte técnico do Centro Colaborador em Saúde Animal da FMVZ/USP. O Estado de São Paulo foi dividido em sete circuitos de produção bovina e bubalina (Figura 3), definidos com base em características homogêneas de produção, como sistemas de criação, práticas de manejo, finalidade da exploração, tamanho médio dos rebanhos, sistemas de comercialização e capacidade operacional e logística do serviço veterinário estadual.

O estudo foi estruturado em dois estágios amostrais. No primeiro, foram selecionadas aleatoriamente, a partir do cadastro de propriedades da CDA, um número pré-estabelecido de propriedades com atividade reprodutiva, proporcional a cada circuito. O tamanho amostral por região foi calculado com base na fórmula para amostras aleatórias simples (THRUSFIELD, 2007), utilizando os seguintes parâmetros: prevalência esperada de 20%, nível de confiança de 95% e erro amostral de 10%.

No segundo estágio, o número de animais a serem testados por propriedade foi definido de modo a garantir uma sensibilidade agregada mínima de 85% e uma especificidade agregada mínima de 95%. Os valores individuais considerados foram de 80,0% para sensibilidade e 99,5% para especificidade. Em propriedades com até 99 reprodutores com 24 meses de idade ou mais, foram testados 20 animais; em propriedades com 100 ou mais reprodutores, foram testados 40 animais. A seleção dos animais foi realizada de forma aleatória, com substituição

de vacas gestantes e parturientes (15 dias antes ou após o parto). Todos os animais com resultado positivo foram eutanasiados.

4.2. Protocolo Diagnóstico

Para o diagnóstico da tuberculose bovina, foi aplicado o Teste Cervical Comparativo (TCC), conforme estabelecido pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), descrito por Lage et al. (2006). Os exames foram conduzidos por profissionais da CDA.

Animais que apresentaram resultado inconclusivo foram retestados após 60 dias. Aqueles que apresentaram dois resultados inconclusivos consecutivos foram classificados como positivos. Todos os animais classificados como positivos foram eutanasiados.

4.3. Questionário Epidemiológico

As propriedades participantes também responderam a um questionário epidemiológico (Anexo A), elaborado com o objetivo de identificar possíveis fatores de risco associados à presença da tuberculose bovina.

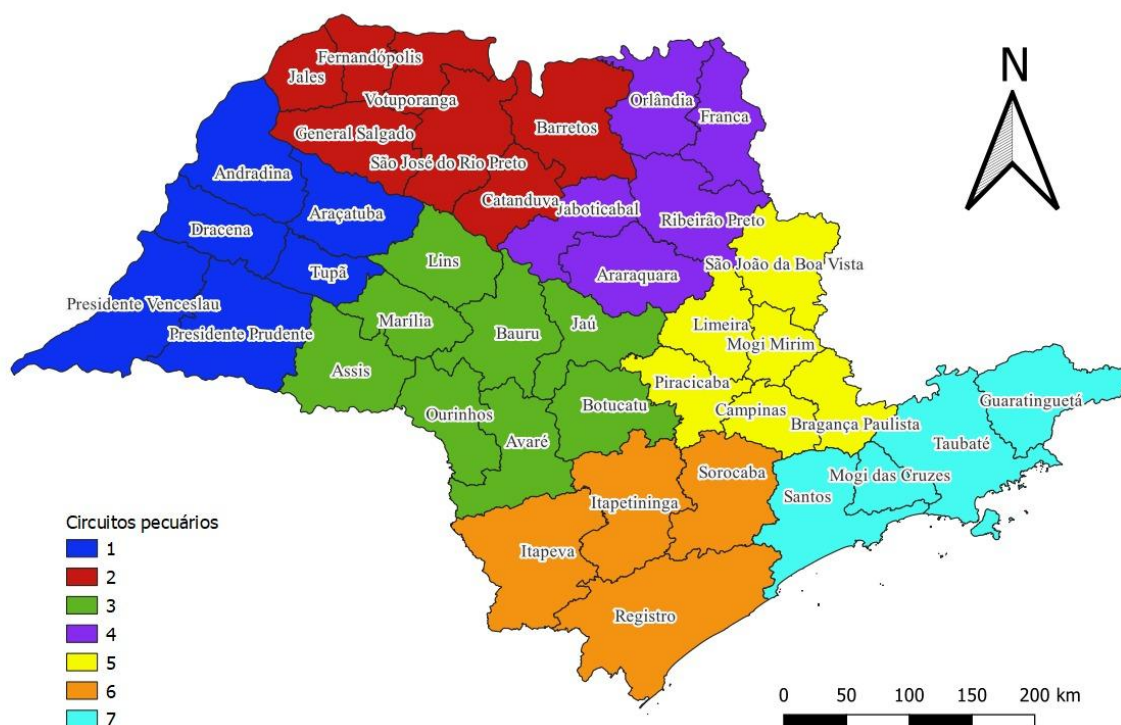


Figura 4-a. Circuitos pecuários do Estado de São Paulo (CDA, 2024).

4.4. Isolamento microbiológico

Foram objetos deste estudo bovinos reagentes positivos ao Teste Cervical Comparativo (TCC), identificados durante o inquérito epidemiológico de tuberculose bovina conduzido na região de Limeira, Estado de São Paulo. O abate sanitário dos animais seguiu os protocolos estabelecidos pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Durante o procedimento de abate ou necropsia, foram coletadas amostras teciduais de pulmão, fígado e linfonodos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose.

4.4.1. Meios de cultura

Para o isolamento micobacteriano, foram utilizados os meios de Stonebrink e de Petragnani, conforme descrito pelo Centro Panamericano de Zoonoses (1979). Os meios foram distribuídos em tubos de vidro (18 × 180 mm) com tampa de algodão hidrofóbico, em volume de 7 mL por tubo. Após a inoculação, os tubos foram flambados e vedados com rolha de cortiça.

4.4.2. Descontaminação

A descontaminação das amostras foi realizada segundo o método clássico de Petroff (KANTOR, 1988), previamente à semeadura nos meios seletivos.

4.4.3. Leitura das colônias isoladas nos tubos

A leitura dos tubos foi conduzida semanalmente e encerrada na 12^a semana após a semeadura. A positividade foi determinada por inspeção visual da presença ou ausência de colônias bacterianas isoladas, de acordo com critério qualitativo.

4.5. Identificação molecular das micobactérias

As colônias obtidas foram submetidas à identificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores JB21 e JB22, originalmente descritos por Rodriguez et al. (1995) e modificados por Harakava et al. (2010), para a detecção específica de *Mycobacterium bovis*.

4.5.1. Extração do material genético

As colônias foram colhidas com alça bacteriológica estéril e suspensas em água ultrapura estéril em microtubos de 1,5 mL. A suspensão foi submetida à fervura a 100 °C por cinco minutos para inativação dos bacilos, seguida de congelamento a -20 °C por pelo menos uma hora, conforme Bemer-Melchior e Dugeon (1999).

A amplificação do DNA foi conduzida com os *primers* JB21 (5'-TCGTCCGCTGATGCAAGTGC-3') e JB22 (5'-CGTCCGCTGACCTCAAGAAG-3'), com protocolo de PCR composto por: desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 64 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 60 segundos; seguidos por extensão final a 72 °C por cinco minutos.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio a 0,01%, visualizados sob luz ultravioleta (UV) e documentados por fotografia digital. A presença de uma banda de 500 pares de bases foi considerada indicativa da presença de *M. bovis* (HARAKAVA et al., 2010).

4.5.2. Genotipagem por VNTR-MIRU

As amostras identificadas como *Mycobacterium bovis* foram submetidas à genotipagem molecular por PCR, utilizando 26 pares de iniciadores específicos correspondentes a *loci* do tipo VNTR-MIRU, conforme apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Identificação, localização genômica e sequência dos 26 *loci* microssatélites utilizados na genotipagem de *Mycobacterium bovis* por VNTR-MIRU. Adaptado de SUPPLY (2005)

Identificação	Lócus	Sequência (5'-3')
MIRU 2	154	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
MIRU 4	580	GCGCGAGAGCCCCGAAGTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC
MIRU 10	960	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MIRU 16	1644	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
MIRU 20	2059	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
MIRU 23	2531	CTGTTCGATGGCCGCAACAAAACG AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC
MIRU 24	2687	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU 26	2996	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG
MIRU 27	3007	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA

		GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU 31	3192	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU 39	4348	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU 40	802	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
VNTR-42	424	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
VNTR-43	577	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
VNTR-52	3690	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
VNTR-53	4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT
VNTR-46	2347	GCCAGCCGCGTGCATAAACCT AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
VNTR-47	2401	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
VNTR-48	2461	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
VNTR-49	3171	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC
VNTR-1955	1955	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC CAACATCGCCTGGTTCTGTA
ETR A	2165	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
QUB-11b	2163b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT
QUB-26	4052	AACGCTCAGCTGTCGGAT CGGCCGTGCCGCCAGGTCCTTCCCGAT
QUB-11a	2163a	CGTGATGTTGATCGGGATGT ACCCTGGAGTCTGGCATC
VNTR 3232	3232	CCCCAGCCTTACGACTGA GTCGGGCTTGGTGAAGG

Amostras das cepas *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* AN5, bem como água livre de nucleases, foram utilizadas como controles positivos e controle negativo da reação, respectivamente. As condições de amplificação por PCR e de eletroforese seguiram o protocolo

descrito por Supply (2005). Os produtos de amplificação, com tamanhos variáveis, foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com migração paralela a um marcador de peso molecular de 100 pb. Após a fotodocumentação, as bandas foram examinadas para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados.

A determinação do número de cópias alélicas foi realizada com base na tabela de conversão publicada por Supply (2005), que correlaciona o tamanho do fragmento ao número de repetições dos *loci* VNTR-MIRU. A validade do teste foi confirmada a partir da conformidade dos resultados obtidos com os controles positivos em relação aos perfis esperados, conforme descrito pelo autor. O código numérico gerado foi utilizado para a elaboração de uma matriz contendo o perfil genético de cada isolado, a qual serviu de base para a construção de um dendrograma, segundo o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), e de uma Minimum Spanning Tree (MST), por meio do software BioNumerics, versão 8.1 (Applied Maths).

5. RESULTADOS

Foram avaliadas 361 fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses, provenientes de propriedades situadas na região de Limeira, Estado de São Paulo. A delimitação geográfica da amostragem decorreu de restrições logísticas e da necessidade de suporte técnico das equipes locais responsáveis pela execução do inquérito. Embora o estudo estadual tenha abrangido diferentes regiões, esta análise concentrou-se exclusivamente nos dados da região de Limeira.

A Tabela 1 apresenta os dados populacionais e amostrais referentes aos diferentes circuitos do Estado de São Paulo incluídos no inquérito, contemplando o número de propriedades com atividade reprodutiva e o efetivo de fêmeas com mais de 24 meses. Na sequência, a Tabela 2 detalha os dados relativos ao circuito 5 (região de Limeira), discriminando as propriedades amostradas e os animais elegíveis por município, permitindo avaliar a representatividade da amostra analisada.

Tabela 1 Dados cadastrais e amostrais do estudo de tuberculose bovina e bubalina nos sete circuitos, Estado de São Paulo, Brasil (CDA, 2024).

Circuitos	Número de propriedades com atividade reprodutiva	Número de fêmeas com idade ≥ 24 meses	Número de propriedades amostradas	Número de fêmeas com idade ≥ 24 meses sorteadas	Número de fêmeas com idade ≥ 24 meses amostradas	Número de fêmeas positivas para tuberculose
1	22856	1203529	300	15929	3605	27
2	16912	728216	322	14200	3474	38
3	15234	836995	308	18601	3190	8
4	5233	228833	287	13363	2788	45
5	9.535	444744	294	12471	3233	50
6	9605	330670	282	9631	2443	62
7	8052	393755	298	12047	3117	22
Total	87427	4166742	2091	96242	21850	252

Tabela 2. Dados cadastrais e amostrais do estudo de tuberculose bovina e bubalina na região de Limeira, Estado de São Paulo, Brasil (CDA, 2024).

Circuito 5 (Regional de Limeira)	Número de propriedades com atividade reprodutiva	Número de fêmeas com idade ≥24 meses	Número de propriedades amostradas	Número de fêmeas com idade ≥24 meses sorteadas	Número de fêmeas com idade ≥24 meses amostradas	Número de fêmeas positivas para tuberculose
Analândia	70	5895	2	31	19	0
Araras	54	3550	2	52	38	2
Cordeirópolis	14	182	1	7	1	0
Corumbataí	181	7636	5	176	54	0
Ipeúna	148	5606	4	156	45	0
Itirapina	143	9997	4	234	51	0
Leme	41	755	2	18	8	0
Limeira	154	5641	5	113	24	0
Pirassununga	122	3482	4	58	45	0
Porto Ferreira	47	1816	2	207	10	0
Rio Claro	244	7182	7	65	24	0
Santa Cruz da Conceição	72	2677	2	12	2	0
Santa Gertrudes	7	195	1	101	40	5
Total	1297	54614	41	1230	361	7

Entre os animais examinados, sete (1,93%) apresentaram resultado positivo ao Teste Cervical Comparativo (TCC) para tuberculose bovina. Dois deles eram provenientes de Araras e cinco de Santa Gertrudes. Os animais de Araras foram eutanasiados conforme os protocolos do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), sem coleta de amostras biológicas. Os cinco animais de Santa Gertrudes foram submetidos a abate sanitário sob inspeção oficial, em estabelecimento sob Serviço de Inspeção de São Paulo (SISP), possibilitando a coleta de tecidos para exames complementares (Figura 4).

Durante a inspeção *post mortem*, foram obtidos fragmentos de órgãos comumente acometidos por lesões tuberculosas — fígado, linfonodos mesentéricos e pulmões. As amostras

foram acondicionadas em frascos estéreis, sem adição de conservantes, e mantidas sob congelamento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o processamento.



Figura 5-a. Exames *post mortem* realizados pelo serviço veterinário oficial da CDA em estabelecimento sob Serviço de Inspeção de São Paulo (SISP), com evidências de lesões sugestivas de tuberculose bovina (Arquivo pessoal, 2023).

(A) Realização da necropsia pelo serviço veterinário oficial; (B) lesão sugestiva de tuberculose em fígado bovino; (C) linfonodo mesentérico com lesão granulomatosa; (D) pulmão com lesões nodulares compatíveis com tuberculose.

Para o isolamento microbiológico, as amostras foram submetidas ao método clássico de descontaminação com ácido sulfúrico a 4% (SANTOS et al., 2017) e semeadas em meio de

Stonebrink enriquecido com extrato de batata e glicerol. Das cinco amostras coletadas, quatro apresentaram crescimento bacteriano após incubação de até 90 dias a 37 °C. As colônias foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, confirmando a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), característicos do gênero *Mycobacterium*.

A identificação da espécie foi realizada por PCR convencional utilizando os primers JB21 e JB22, descritos por Rodrigues et al. (2016), que amplificam um fragmento específico de 500 pares de bases de *Mycobacterium bovis*. Quatro isolados — amostras 25, 26, 27 e 32 — apresentaram padrão de amplificação compatível com *M. bovis*, confirmando a identidade molecular das colônias.

Na sequência, foi realizada a genotipagem molecular por meio da técnica de VNTR-MIRU, utilizando os *loci* MIRU16, MIRU26, MIRU31, ETR-A, VNTR43 e VNTR48, conforme descrito por Supply et al. (2006). Amostras de *M. tuberculosis H37Rv* e *M. bovis AN5* foram utilizadas como controles positivos, enquanto água livre de nucleases foi empregada como controle negativo da reação. A Figura 5 apresenta os resultados de eletroforese dos *loci* VNTR43 e VNTR48, nos quais os quatro isolados apresentaram perfis idênticos, com bandas de mesma altura e intensidade, indicando uniformidade no número de repetições e ausência de polimorfismo nesses marcadores.

Em contrapartida, a análise dos *loci* MIRU16, MIRU26, MIRU31 e ETR-A (Figura 6) revelou variabilidade genética entre os isolados. As amostras 25 e 26 exibiram bandas duplas nos *loci* MIRU16 e MIRU26, sugerindo a presença de dois alelos distintos por locus, o que pode indicar coinfeção por diferentes cepas de *M. bovis* ou eventos de duplicação local no genoma. Já os isolados 27 e 32 apresentaram padrão monomórfico nesses *loci*, com amplificação de única banda por locus.

Além da análise visual das bandas por eletroforese (Figuras 5 e 6), os fragmentos amplificados nos seis *loci* VNTR-MIRU (VNTR43, VNTR48, MIRU16, MIRU26, MIRU31 e ETR-A) foram mensurados e convertidos em perfis numéricos multilocus, utilizando tabela de alelos baseada em Supply et al. (2006) e Rodríguez-Campos (2012) (Tabela 3). Esses perfis consistem na contagem do número de repetições em cada locus, estimada a partir do tamanho do fragmento amplificado, com base em comparação com o marcador de peso molecular (L100).

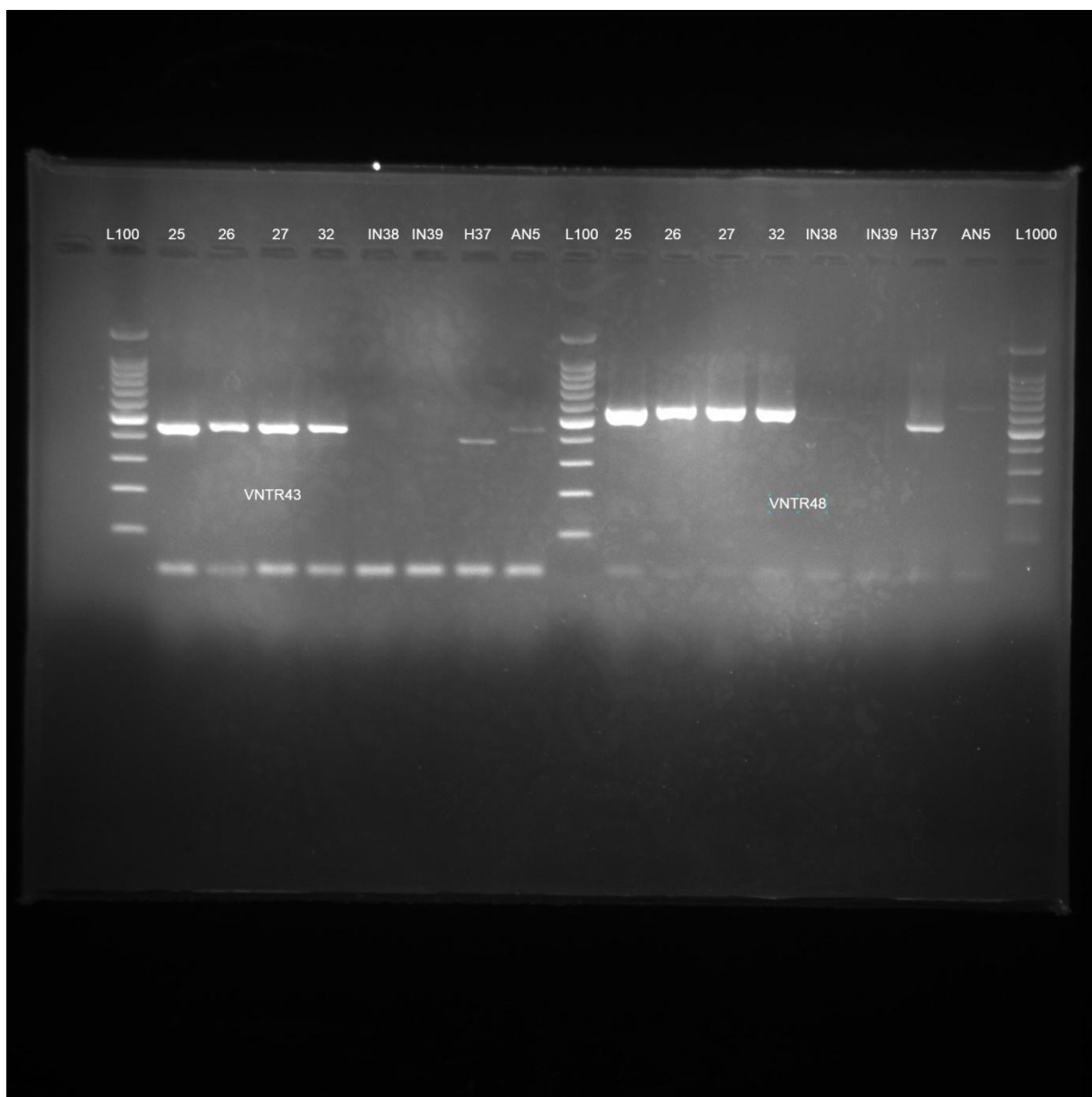


Figura 5-b. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados dos *loci* VNTR43 e VNTR48, referentes à tipagem molecular de *Mycobacterium bovis* obtidos de quatro amostras clínicas (25, 26, 27 e 32) isoladas de bovinos positivos ao teste cervical comparativo no município de Santa Gertrudes (SP) (Laboratório de Zoonoses Bacterianas, FMVZ-USP, 2024).

Os padrões de bandas observados indicam perfis idênticos entre os isolados em ambos os loci, com bandas de mesma altura e intensidade, sugerindo ausência de polimorfismo. Os fragmentos foram comparados a marcador de peso molecular de 100 pb (L100). A genotipagem foi realizada conforme metodologia de SUPPLY et al. (2006), com análise complementar em BioNumerics® 8.1 (Applied Maths), para construção de dendrograma (UPGMA) e Minimum Spanning Tree (MST), os quais confirmaram identidade genotípica entre os isolados.

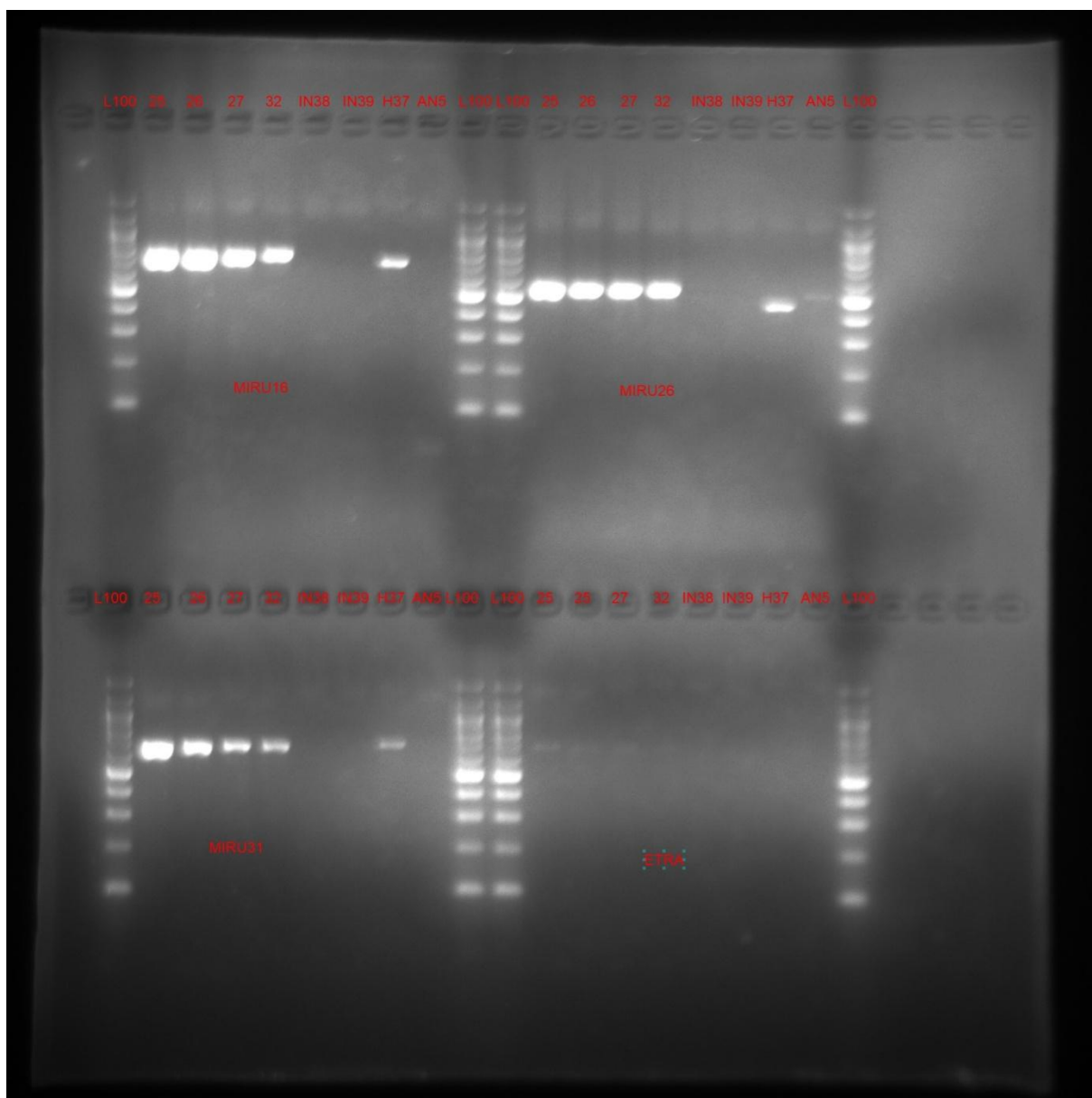


Figura 5-c. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados dos *loci* MIRU16, MIRU26, MIRU31 e ETR-A, obtidos por PCR para tipagem molecular de quatro isolados clínicos (amostras 25, 26, 27 e 32) de *Mycobacterium bovis* oriundos de bovinos positivos ao teste cervical comparativo no município de Santa Gertrudes (SP) (Laboratório de Zoonoses Bacterianas, FMVZ-USP, 2024).

Os fragmentos foram comparados ao marcador de peso molecular de 100 pb (L100), e revelam padrões distintos entre os isolados. As amostras 25 e 26 apresentaram bandas duplas nos *loci* MIRU16 e MIRU26, sugerindo a presença de dois alelos distintos por locus, enquanto as amostras 27 e 32 exibiram perfis monomórficos. Variações observadas nos *loci* MIRU31 e ETR-A reforçam a heterogeneidade genética intra-foco. Os perfis multilocus foram convertidos em códigos numéricos e analisados por BioNumerics® 8.1 para construção de dendrograma (UPGMA) e Minimum Spanning Tree (MST), confirmando a diferenciação entre os isolados.

Com base nos dados multilocus obtidos, foi realizada a análise de agrupamento genético por meio do algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), a partir de uma matriz de similaridade construída com base nas distâncias genéticas calculadas segundo o coeficiente de Dice (DICE, 1945). A análise foi conduzida utilizando o software BioNumerics®, versão 8.1 (APPLIED MATHS, 2016), com base na presença ou ausência de variantes alélicas nos seis *loci* VNTR-MIRU analisados. A matriz de distância genética entre os perfis multilocus dos isolados encontra-se apresentada na Tabela 4. O dendrograma resultante (Figura 7) evidenciou a formação de dois agrupamentos distintos: o primeiro, composto pelos isolados 25 e 26, que apresentaram perfis multilocus idênticos, agrupados com distância genética nula; e o segundo grupo, formado pelos isolados 27 e 32, que também compartilharam o mesmo perfil, caracterizado por monomorfismo nos *loci* avaliados (TENOVER et al., 1995).

Tabela 3. Correspondência aproximada entre os tamanhos dos fragmentos amplificados por PCR e o número de repetições atribuídas a cada locus VNTR-MIRU analisado, conforme referenciado por Supply et al. (2006) e Rodríguez-Campos et al. (2012).

Locus	Tamanho do fragmento	Nº de repetições (Alelos)
MIRU16	200, 240, 280	1, 2, 3
MIRU26	220, 260, 300	2, 3, 4
MIRU31	260	3
VNTR43	200, 250, 300	1, 2, 3
VNTR48	180, 220	1, 2
ETR-A	160, 200, 240	2, 3, 4

Tabela 4. Matriz de distância genética entre isolados de *Mycobacterium bovis* com base em perfis multilocus VNTR-MIRU.

Matriz de similaridade construída a partir da comparação dos perfis multilocus dos isolados 25, 26, 27 e 32, utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e o coeficiente de Dice (DICE, 1945). A análise foi realizada no software BioNumerics®, versão 8.1 (APPLIED MATHS, 2016), com base na presença ou ausência de variantes alélicas nos seis *loci* VNTR-MIRU. Valores “0,0” indicam identidade genética entre os isolados; valores “1,0” indicam completa dissimilaridade. A interpretação dos agrupamentos foi conduzida conforme critérios estabelecidos por Tenover et al. (1995) para tipagem molecular de microrganismos.

Amostras	25	26	27	32
25	0,0	0,0	1,0	1,0
26	0,0	0,0	1,0	1,0
27	1,0	1,0	0,0	0,0
32	1,0	1,0	0,0	0,0

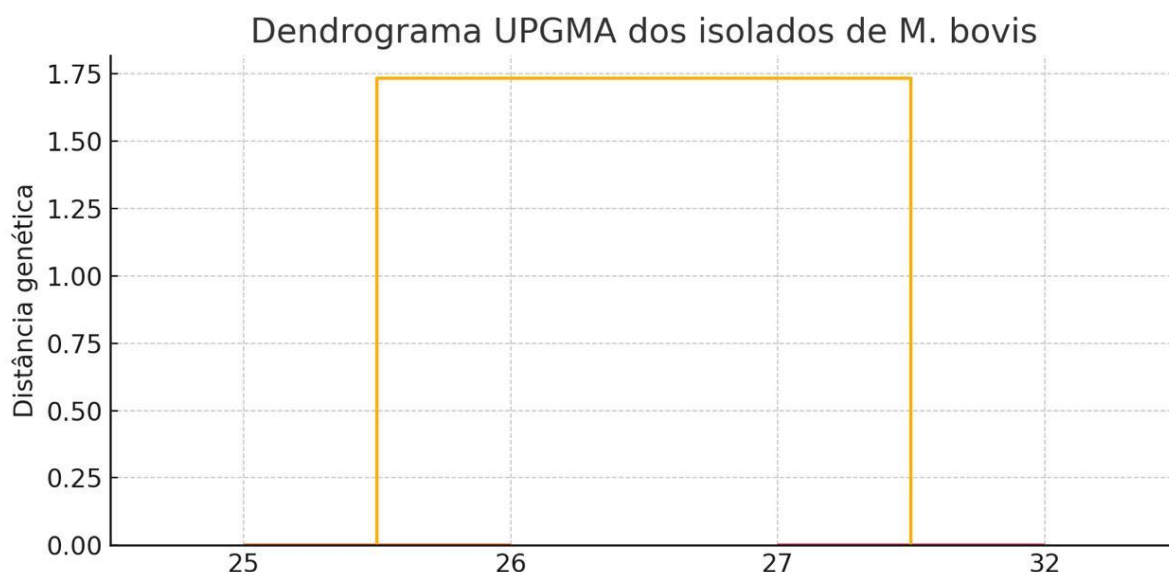


Figura 5-d. Dendrograma UPGMA dos isolados de *Mycobacterium bovis* com base nos *loci* VNTR-MIRU. Representa o agrupamento dos isolados segundo o método UPGMA, a partir das distâncias genéticas estimadas com base nos perfis VNTR-MIRU. Observa-se a formação de dois agrupamentos distintos: o primeiro, composto pelos isolados 25 e 26 (perfil idêntico), e o segundo, pelos isolados 27 e 32 (perfil monomórfico distinto). O uso desse método permite avaliar a similaridade entre amostras com base em dados de tipificação molecular, sendo amplamente empregado em estudos de epidemiologia molecular do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (SUPPLY et al., 2006; ALLIX et al., 2006).

Para complementar a análise, foi construída uma Minimum Spanning Tree (MST) com base nas diferenças de repetições entre os *loci* analisados (Figura 8). A MST confirmou a menor distância genética entre os pares 25–26 e 27–32, sendo que a ligação entre os dois grupos ocorreu por uma aresta de maior peso, sugerindo a existência de dois complexos clonais distintos (APPLIED MATHS, 2016; RODRÍGUEZ-CAMPOS et al., 2012). Essa divergência genética, mesmo em um único foco de infecção, reforça a possibilidade de múltiplas rotas de introdução de *M. bovis* no rebanho de origem ou de evolução paralela de variantes genéticas locais, hipótese compatível com relatos prévios sobre diversidade intrarrebanho e eventos de reinfecção (TENOVER et al., 1995; KLOOSTERMAN et al., 2005).

Esses resultados corroboram a existência de variabilidade intrarrebanho de *M. bovis* e evidenciam o potencial discriminatório da técnica de VNTR-MIRU, mesmo com a aplicação de um conjunto reduzido de *loci*. A análise genética por agrupamento contribui para o rastreamento de fontes de infecção, inferência de rotas epidemiológicas e monitoramento da dispersão de cepas no contexto da vigilância da tuberculose bovina no Estado de São Paulo.

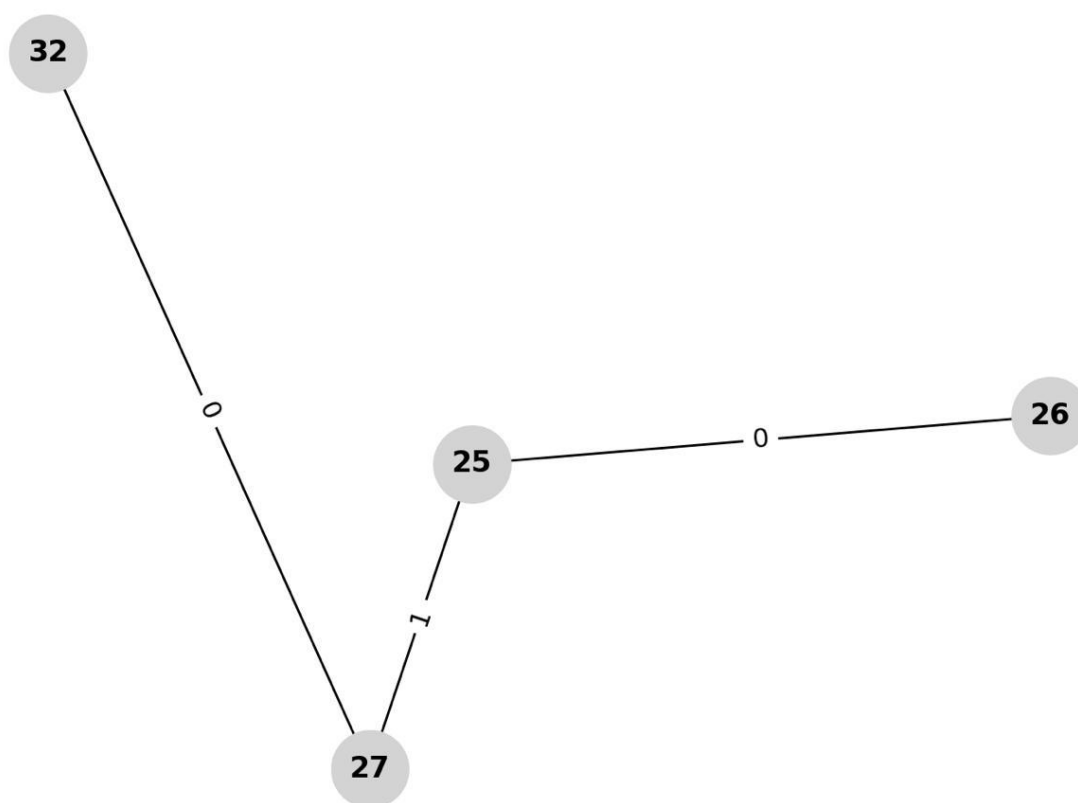


Figura 5-e. Minimum Spanning Tree (MST) dos isolados de *Mycobacterium bovis* com base nos perfis multilocus VNTR-MIRU.

Representação gráfica das distâncias genéticas mínimas entre os perfis multilocus dos isolados 25, 26, 27 e 32, construída a partir da diferença absoluta no número de repetições por locus (distância de Manhattan), conforme descrito por Kloosterman et al. (2005). Cada aresta representa a soma das diferenças alélicas entre pares de isolados. A árvore mínima foi gerada utilizando o software BioNumerics®, versão 8.1 (APPLIED MATHS, 2016). Observa-se a formação de dois complexos clonais: 25–26 e 27–32, conectados por uma aresta de maior peso, sugerindo divergência genética significativa entre os agrupamentos. Tal padrão pode refletir rotas distintas de introdução de *M. bovis* no rebanho de origem ou evolução paralela de variantes locais, como discutido por Rodríguez-Campos et al. (2012) e Tenover et al. (1995).

Além dos exames laboratoriais, todas as propriedades amostradas foram submetidas a um questionário epidemiológico estruturado, com o objetivo de identificar fatores de risco associados à ocorrência da tuberculose bovina. As variáveis investigadas incluíram aspectos sanitários, zootécnicos e de manejo, tais como origem e destino dos animais, práticas de aquisição, descarte e quarentena, presença de outras espécies, compartilhamento de recursos e participação em feiras ou eventos agropecuários.

Na propriedade situada no município de Santa Gertrudes, onde foi confirmado o foco de tuberculose bovina com cinco animais positivos, observou-se um sistema de produção leiteira caracterizado pelo regime semiconfinado. As vacas eram submetidas a duas a três ordenhas mecânicas diárias em sala específica, com armazenamento do leite em tanque de expansão, sendo o produto destinado a laticínios. O rebanho totalizava 89 bovinos, dos quais

27 se encontravam em lactação no momento da investigação. A reprodução era conduzida por meio de inseminação artificial, associada à utilização de touros.

Além dos bovinos, foram identificadas na propriedade a presença de equinos, suínos e aves, sem relato de convivência com animais silvestres de vida livre. Não foi observado histórico recente de abortamentos, e os resíduos biológicos (fetos e placentas) eram descartados por meio de enterro, fossa ou incineração, conforme informado.

A propriedade dispunha de um regime sanitário parcialmente estruturado, realizando diagnóstico para brucelose e tuberculose exclusivamente no momento da aquisição de novos animais, vacinava regularmente contra brucelose e contava com acompanhamento técnico-veterinário. Nos dois anos anteriores à visita, foram introduzidos bovinos oriundos de intermediários pecuários, embora não com a finalidade reprodutiva.

Não havia confinamento formal de animais, porém, piquetes específicos eram mantidos para vacas em período de parto e pós-parto. Na propriedade rural não havia produção de queijos, manteigas ou outros derivados lácteos de forma artesanal.

Entre os fatores de risco epidemiológicos identificados, destacaram-se a ausência de quarentena para os animais recém-introduzidos, o compartilhamento de insumos com outras propriedades vizinhas e o trânsito de veículos e pessoas sem protocolos formais de controle sanitário. Essas fragilidades no manejo podem favorecer a introdução e disseminação de agentes infecciosos no rebanho, como o *Mycobacterium bovis*, e merecem atenção no planejamento de ações de vigilância epidemiológica e educação sanitária.

6. DISCUSSÃO

A tuberculose bovina (bTB), causada por *Mycobacterium bovis*, continua representando um desafio significativo para a sanidade animal e a saúde pública, especialmente em países como o Brasil, onde a doença permanece endêmica (FERREIRA NETO et al., 2016). Este estudo contribui para o entendimento da situação epidemiológica da bTB na região de Limeira, interior do estado de São Paulo, ao integrar métodos clássicos de diagnóstico com ferramentas moleculares de identificação e genotipagem, permitindo uma caracterização mais precisa da estrutura populacional do agente.

A taxa de positividade observada ao Teste Cervical Comparativo (TCC), de 1,93%, foi inferior à média registrada em outras regiões do estado e do país (FERREIRA NETO et al., 2016; BRASIL, 2020). Embora esse número possa sugerir baixa prevalência, ele deve ser interpretado com cautela. A sensibilidade do TCC pode ser limitada, especialmente em casos de infecção latente ou de resposta imune reduzida, o que pode levar à subnotificação da real ocorrência da enfermidade (LAGE et al., 2006).

Dos sete bovinos positivos ao TCC, apenas os cinco oriundos de Santa Gertrudes foram submetidos a abate sanitário com coleta de tecidos para exame laboratorial. Desses, quatro apresentaram crescimento bacteriano em meio de Stonebrink enriquecido com piruvato, e posterior confirmação molecular por PCR convencional utilizando os primers JB21/JB22, específicos para a região RD4 do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, validando sua identificação como *M. bovis*.

A genotipagem molecular baseada em seis *loci* VNTR-MIRU (MIRU16, MIRU26, MIRU31, VNTR43, VNTR48 e ETR-A) permitiu discriminar dois perfis multilocus distintos entre os quatro isolados. As amostras 25 e 26 apresentaram perfis idênticos, enquanto 27 e 32 compuseram um segundo agrupamento com características diferentes. Esse padrão, confirmado por dendrograma UPGMA e Minimum Spanning Tree (MST), indica a coexistência de dois complexos clonais distintos, mesmo dentro de uma única propriedade. Achados semelhantes já foram descritos na literatura, sugerindo a circulação simultânea de múltiplas linhagens de *M. bovis* em ambientes rurais endêmicos (ALMEIDA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2012; GONÇALVES et al., 2021).

A análise de diversidade revelou que quatro *loci* (MIRU16, MIRU26, VNTR43 e VNTR48) apresentaram dois alelos distintos, contribuindo para um índice de diversidade de Hunter-Gaston (HGDI) de 0,667, considerado moderadamente alto. Já os *loci* MIRU31 e ETR-

A foram monomórficos, o que reduziu o poder de discriminação do painel utilizado. A presença de bandas duplas nos *loci* MIRU16 e MIRU26 em dois isolados sugere a possibilidade de coinfeção por cepas distintas ou de eventos de duplicação gênica, como relatado por ZEMAN et al. (2011).

A construção da MST evidenciou alta homologia intra-agrupamentos e divergência genética significativa entre os dois conjuntos. O dendrograma UPGMA reforçou essa estrutura, com formação de dois agrupamentos monofiléticos principais, sugerindo múltiplas introduções do agente ou eventos de reinfecção, cenário compatível com propriedades de manejo vulnerável.

Do ponto de vista sanitário, a propriedade foco apresentava fatores de risco já reconhecidos para manutenção da bTB: ausência de quarentena para novos animais, compartilhamento de equipamentos entre fazendas, trânsito descontrolado de veículos e introdução de bovinos sem histórico sanitário definido (FERREIRA NETO et al., 2016; BASTOS et al., 2021). A presença de suínos, aves e equinos na mesma unidade, embora não diretamente implicada como fonte de infecção, merece atenção. A literatura descreve o potencial de espécies domésticas e silvestres (como cervídeos e tatus) atuarem como reservatórios ou sentinelas em focos de *M. bovis* (SOUZA FILHO, 2019; VARGAS et al., 2014).

Apesar da ausência de análises estatísticas inferenciais, os dados obtidos permitem formular hipóteses relevantes. A concentração dos casos positivos em dois municípios (Araras e Santa Gertrudes), associada à presença de perfis genéticos distintos em uma única propriedade, pode indicar múltiplas rotas de entrada do agente ou falhas no controle sanitário. Futuramente, a aplicação de testes de associação (qui-quadrado), análise de variância molecular (AMOVA) ou estimativas do índice de diversidade de Nei poderá validar essas observações, auxiliando no planejamento de medidas direcionadas.

Este estudo apresenta algumas limitações importantes. O número reduzido de amostras viáveis (quatro isolados) restringe a representatividade e a possibilidade de inferência estatística ampla. Além disso, o uso de apenas seis *loci* VNTR-MIRU, dos quais dois foram monomórficos, limitou a capacidade resolutive do painel genotípico. Técnicas complementares, como o *spoligotyping* ou o sequenciamento genômico (WGS), poderiam oferecer dados mais robustos de caracterização filogenética e rastreamento.

A desigualdade na distribuição da amostragem entre os municípios também pode ter influenciado os resultados, assim como a ausência de informações zootécnicas ou de manejo detalhado dos animais positivos. Além disso, fatores operacionais, como tempo de transporte,

conservação e manipulação das amostras até o cultivo, podem ter impactado negativamente a viabilidade das micobactérias, reduzindo a taxa de isolamento microbiológico e, conseqüentemente, a amplitude da análise.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a caracterização bacteriológica e molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos reagentes ao Teste Cervical Comparativo (TCC) na região de Limeira, estado de São Paulo, contribuindo para a compreensão da diversidade genética do agente em nível regional. A associação entre métodos clássicos de diagnóstico e ferramentas moleculares, como a PCR e a genotipagem por VNTR-MIRU, demonstrou ser eficaz na confirmação da identidade dos isolados e na identificação de diferentes perfis genéticos dentro de uma mesma propriedade.

A detecção de dois complexos clonais distintos sugere múltiplas rotas de introdução ou persistência de diferentes linhagens de *M. bovis*, em um cenário sanitário marcado por vulnerabilidades no manejo, ausência de quarentena, e introdução de animais de origem desconhecida. A integração dos resultados laboratoriais com a avaliação epidemiológica *in loco* reforça a importância do enfoque multidisciplinar na vigilância da tuberculose bovina.

As limitações metodológicas do estudo, como o número reduzido de isolados, a restrição no painel de *loci* utilizados e a ausência de análises estatísticas inferenciais, não invalidam os achados, mas indicam a necessidade de estudos complementares com maior abrangência espacial, amostral e molecular.

Os dados obtidos reforçam a relevância de medidas de prevenção e controle baseadas em diagnóstico precoce, rastreabilidade animal, tipificação genômica e ações educativas junto aos produtores. A consolidação dessas estratégias, alinhadas às diretrizes do PNCEBT e à atuação dos serviços veterinários oficiais, é essencial para o enfrentamento efetivo da tuberculose bovina em regiões endêmicas como o interior paulista.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y los Animales**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 3ª ed, 2003. 398p.
- AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v.17, p.1607-1624, 2011.
- ALLIX, C. et al. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus database for molecular epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2692–2699, 2008.
- ALLIX, C. et al. Evaluation of the epidemiological usefulness of MIRU-VNTR genotyping in *Mycobacterium bovis* TB surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4149–4157, 2006.
- ALMÉRI, N. Menos Leite Informal. Disponível em: www.hojeemdia.com.br. Acesso em: 14 jun. 2012.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S.l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- APPLIED MATHS. **BioNumerics user manual**: version 8.1. Sint-Martens-Latem: bioMérieux, 2016.
- ARANDAY-CORTES, E. et al. Upregulation of IL-17A, CXCL9 and CXCL10 in early-stage granulomas induced by *Mycobacterium bovis* in cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.60, p.525–537, 2013.
- ARAÚJO, C. P. **Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cultura e sua identificação pela reação de polimerase em cadeia**. 2004. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2004.
- ARAÚJO, C. P.; LEITE, C.Q.F.; PRINCE, K.A.; JORGE, K.S.G.; OSÓRIO, A.L.A.R. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.749–752, 2005.
- ASARE, P. et al. Reduced transmission of *Mycobacterium africanum* compared to *Mycobacterium tuberculosis* in urban West Africa. **The International Journal of Infectious Diseases**, v. 73, p.30–42, 2018.
- AZAMBUJA, A. D. **Estratégias de diagnóstico da tuberculose bovina**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2010.
- BAHIENSE, L. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the State of Bahia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n. 5, Supl. 2, p. 3549–3560, 2016.

BARBIERI, J. M.; OLIVEIRA, L.F.; DORNELES, E.M.S.; MOTA, A.L.A.A.; GONÇALVES, V.S.P.; MALUF, P.P.; LAGE, A.P. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Minas Gerais, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n. 5, Suppl. 2, p.3531–3548, 2016.

BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.845–855, 2009.

BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1149–1156, 2003.

BEMER-MELCHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 2350–2351, 1999.

BERMUDEZ, L. E. et al. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.70, p.140–146, 2002.

BIFFA, D.; BOGALE, A.; SKJERVE, E. Diagnostic efficiency of abattoir meat inspection service in Ethiopia to detect carcasses infected with *Mycobacterium bovis*: implications for public health. **BMC Public Health**, v.10, p.462–474, 2010.

BORITSCH, E. C. et al. A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. **Molecular Microbiology**, v.93, p.835–852, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. Institui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Diário Oficial da União, Brasília, DF, 15 jan. 2001. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10, de 3 de março de 2017. Aprova os procedimentos para certificação de propriedades livres e monitoradas para brucelose e tuberculose bovina e bubalina no âmbito do PNCEBT. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 45, p. 6–10, 7 mar. 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose/legislacao>. Acesso em: 23 jul 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT**. Brasília, DF: MAPA, 2020. 68 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/brucelose-e-tuberculose>. Acesso em: 23 de jul 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT: classificação das Unidades da Federação segundo o risco sanitário para brucelose e tuberculose bovinas. Brasília, DF: MAPA/SDA/DSA, out. 2020. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt/copy_of_Classificacaodas. Acesso em: 23 de jul 2023.

BRITES, D. et al. A new phylogenetic framework for the animal-adapted *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2820, 2018.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p.3684–3689, 2002.

CALLEFE, J. L. R.; FERREIRA NETO, J. S. **Sistemas de vigilância em saúde animal**. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2020. 103 p.

CARNEIRO, P. A.; KANEENE, J. B. Bovine tuberculosis control and eradication in Brazil: Lessons to learn from the US and Australia. **Food Control**, v. 93, p. 61–69, 2018.

CARRISOZA-URBINA, J. et al. Atypical granuloma formation in *Mycobacterium bovis*-infected calves. **PLOS ONE**, v.14, 2019.

CAZOLA, D. O. et al. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, p.141–147, 2015.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Bacteriología de la tuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1979. 63p.

COLE, S. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537–544, 1998.

COLLINS, D. M.; DE LESLIE, G. W. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, p.562–564, 1985.

COMAS, I. et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nature Genetics**, v. 45, p.1176–1182, 2013.

COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. São Paulo, 1998–2024. Disponível em: <https://sistemas.defesa.agricultura.sp.gov.br/iepbtl/login/>. Acesso em: 29 jul. 2024.

COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. São Paulo, 1998–2024. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/programas/?/sanidade-animal/programa-estadual-de-controle-e-erradicacao-da-brucelose-e-tuberculose-animal-pecebt-sp/&cod=59>. Acesso em: 02 fev. 2025

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

COSCOLLA, M. et al. Phylogenomics of *Mycobacterium africanum* reveals a new lineage and a complex evolutionary history. **Microbial Genomics**, v. 7, 2021.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Seminars in Immunology**, v. 26, p.431–444, 2014.

COSTA, A. C. F. et al. Tipificação genética, através da técnica de Spoligotyping, de isolados de *Mycobacterium bovis* em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 77, p.233-237, 2010.

COSTA, H. L. R. et al. Tuberculose em bovinos abatidos no Estado de São Paulo entre 2013 e 2022. **Medicina Veterinária**, v.17, p.187-196, 2023.

DE MARTINO, M.; LODI, L.; GALLI, L.; CHIAPPINI, E. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis*: a narrative review. **Frontiers in Pediatrics**, v.7, p.350, 2019.

DIAS, R. A. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of São Paulo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, p.3673-3684, 2016.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v. 26, n. 3, p. 297–302, 1945.

DOMINGO-GONZALEZ, R. et al. Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Microbiology Spectrum**, v. 4, p. 33–72, 2017.

EMBRAPA. **Análise da cadeia produtiva do leite no Brasil**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 2011. 72 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/927408/analise-da-cadeia-produtiva-do-leite-no-brasil>. Acesso em: 29 out. 2024.

ETCHECHOURY, I. et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: First description of a Person-to-Person transmission case. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p.375–381, 2010.

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

FIGUEIREDO, E.E.S. et al. Identification of *Mycobacterium bovis* isolates by a multiplex PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.231–233, 2009.

FONG, I. W. **Current Trends and Concerns in Infectious Diseases**. Heidelberg: Springer, 1ª ed., 2020. 683 p.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v.4, p.3–66, 2013.

FRANCO, M. M. J. et al. Genotyping and rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated from the lymph nodes of slaughtered cattle. **Tuberculosis**, v.107, p.30–37, 2017.

GALAGAN, J. E. Genomic insights into tuberculosis. **Nature Reviews Genetics**, v.15, p.307–320, 2014.

GALVIS, J. O. A. et al. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37 (5, Suppl. 2), p.3567–3578, 2016.

GHEBREMICHAEL, S. et al. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing genotype does not spread in Sweden. **PLOS ONE**, v.5, 2010.

GUEDES, I. B. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37 (5, Suppl. 2), p.3579–3588, 2016.

HARAKAVA, R. et al. Identificação de *Mycobacterium bovis*: otimização da reação de PCR com os primers JB21 e JB22. In: **Seminário Nacional sobre Brucelose e Tuberculose Animal**, 2010, Belo Horizonte, MG.

HEINEMANN, M. B. et al. Tuberculose bovina: uma introdução à etiologia, cadeia epidemiológica, patogenia e sinais clínicos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1–12, 2008.

IBGE. Abate de bovinos cresce 7,8% em 2023 e tem maior volume desde 2019. **Agência de Notícias IBGE**, 14 mar. 2024. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 24 mar. 2024.

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal 2022. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>. Acesso em: 26 jan. 2024.

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

KAMERBEEK, J. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.4, p.907–914, 1997.

KANABALAN, R. D.; LEE, L. J.; LEE, T. Y.; CHONG, P. P.; HASSAN, L.; ISMAILA, R.; CHIN, V. K. Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host-biomarkers discovery. **Microbiological Research**, v. 246, p.1266–1274, 2021.

KANTOR, I. N. **Bacteriología de la tuberculosis humana y animal**. 11. ed. rev. 1. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis, Organización Panamericana de la Salud, 1988. 63 p.

KLOOSTERMAN, A. et al. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis* and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4563–4570, 2005.

LAGE, A. P. et al. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): manual técnico**. Brasília: MAPA, 2006. 184 p.

LEWIS, K. N. et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette–Guérin attenuation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p.117–123, 2003.

LIMA, P. B. et al. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in the state of Pernambuco, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, p.3601–3610, 2016.

LIN, P. L. et al. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. **Nature Medicine**, v.20, p.75–79, 2014.

MAZARS, E. et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p.1901–1906, 2001.

MERKER, M. et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. **Nature Genetics**, v. 47, p.242–249, 2015.

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

NÉSPOLI, J. M. B. et al. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37 (5, Suppl. 2), p.3589–3600, 2016.

NGABONZIZA, J. C. S. et al. A sister lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex discovered in the African Great Lakes region. **Nature Communications**, v.11, p.1–11, 2020.

NEILL, S. D. et al. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1–2, p.41–52, 1994.

OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: World Organisation for Animal Health, 2018.

OLIVEIRA, C. C. Tuberculose bovina no Brasil: de 1999 a 2017. Areia, 2019. 25 f. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2019.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.8, p.2720–2722, 2002.

PALUCCI, I.; DELOGU, G. Host directed therapies for tuberculosis: future strategies for an ancient disease. **Chemotherapy**, v.63, p.172–180, 2018.

PFYFFER, G. E. In: JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology: Mycobacterium – general characteristics, laboratory detection, and staining procedures**. 11. ed. Washington: American Society of Microbiology, v.1, p.536–569.

PYM, A. S. et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. **Molecular Microbiology**, v.46, p.709–717, 2002.

QUEIROZ, M. R. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, p.3647–3658, 2016.

RAMOS, D. F. et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, p.365–372, 2014.

RIBEIRO, L. A. et al. Epidemiological status of bovine tuberculosis in the Federal District of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37 (5, Suppl. 2), p.3561–3566, 2016.

ROCHA, V. C. F. **Avaliação do Spoligotyping, MIRU-VNTR e Multispacer Sequence Typing na discriminação de isolados autóctones de *Mycobacterium bovis***. 2013. 75 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ROCHA, V. C. F. et al. *Mycobacterium bovis* como agente causal da tuberculose humana. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.10, p.22–31, 2012.

RODRIGUES, W. M. E. D. et al. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Goiás, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3625–3638, 2016.

RODRIGUES, D. L. et al. Apparent prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in the state of Paraná, Brazil: an assessment after 18 years since the beginning of the Brazilian program. **Tropical Animal Health and Production**, v.54, p.360–370, 2022.

RODRIGUES, R. A. **Reações falso-negativas ao Teste Cervical Comparativo para tuberculose bovina**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, MS, 2017.

RODRIGUES CAMPOS, S. et al. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v.97, p.5–19, 2014.

RODRIGUES CAMPOS, S. et al. Limitations of spoligotyping and variable-number tandem-repeat typing for molecular tracing of *Mycobacterium bovis* in a high-diversity setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.3361–3364, 2011.

RODRIGUEZ, J. G. et al. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, v.141, p.2131–2138, 1995.

RODRÍGUEZ-CAMPOS, S. et al. Tools for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.104, p.1–9, 2012.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, p.55–65, 2007.

RUSTAD, T. R. et al. Mapping and manipulating the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptome using a transcription factor overexpression-derived regulatory network. **Genome Biology**, v.15, p.502, 2015.

SANCHEZ, J. et al. Microscopical and immunological features of tuberculoid granulomata and cavitary pulmonary tuberculosis in naturally infected goats. **Journal of Comparative Pathology**, v.145, p.107–117, 2011.

SANCO, W. D. Working document on eradication of bovine tuberculosis in the EU. Accepted by the bovine tuberculosis subgroup of the Task Force on Monitoring Animal Disease Eradication. Brussels, 2017. [Projeto de Pesquisa]

SANTOS, A. C. S. et al. Diagnóstico laboratorial da tuberculose bovina: revisão de métodos e desafios atuais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.84, p.1–10, 2017.

SHELL, S. S. et al. DNA methylation impacts gene expression and ensures hypoxic survival of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLOS Pathogens**, v.9, 2013.

SHITAYE, J. E. et al. A prevalence study of bovine tuberculosis by using abattoir meat inspection and tuberculin skin testing data, histopathological and IS6110 PCR examination of tissues with tuberculous lesions in cattle in Ethiopia. **Veterinárni Medicina**, v.51, p.512–522, 2006.

SMITH, N. H. et al. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.537–544, 2009.

SMITH, N. H. et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Theoretical Biology*, v.239, n.2, p.220–225, 2006.

SOUZA FILHO, A. F. de. **Caracterização molecular de *Mycobacterium bovis* isolados no Brasil**. 2019. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

STONEBRINK, B. A simplified medium for rapid growth of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.24, p.373–376, 1958.

STREICHER, E. M. et al. Spoligotype signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.237–240, 2007.

STUCKI, D. et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. **Nature Genetics**, v.48, p.1535–1543, 2016.

SUPPLY, P. et al. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3563–3571, 2001.

SUPPLY, P. et al. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. **Molecular Microbiology**, v.26, p.991–1003, 1997.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v.36, n.3, p.762–771, 2000.

SUPPLY, P. **Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis***. Lille: Institut de Biologie, Institut Pasteur de Lille, 2005. 73 p.

SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Units–Variable-Number Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, n.12, p.4498–4510, 2006.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–2239, 1995.

THOEN, C. O.; LOBUE, P.; DE KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v.112, p.339–345, 2006.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. Cambridge: Blackwell Science, 3rd ed., 2007. 610 p.

VAN EMBDEN, J. D. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.406–409, 1993.

VAN INGEN, J. et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, p.653, 2012.

VELOSO, F. P. et al. Prevalence and herd-level risk factors of bovine tuberculosis in the State of Santa Catarina, **Brazil. Semina: Ciências Agrárias**, v.37, p.3659–3672, 2016.

VENDRAME, F. B. et al. Epidemiologic characterization of bovine tuberculosis in the State of Rondônia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, p.3639–3646, 2016.

WHO; OIE; FAO; UNION. **Roadmap for Zoonotic Tuberculosis**, 2017. Disponível em: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/roadmap-zoonotic-tb.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2024.

WOAH. **Terrestrial Animal Health Manual**. Capítulo 3.1.13: Mammalian tuberculosis: Infection with Mycobacterium tuberculosis complex. 2022. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access>. Acesso em: 20 jul. 2024.

ANEXO B – QUESTIONÁRIO

BRUCELOSE E TUBERCULOSE EM BOVINOS E BUBALINOS - Estudo epidemiológico																																																																																													
01-Identificação: Município: _____ REGIÃO: _____ UF: _____ Proprietário: _____ Propriedade: _____ Código de cadastro no serviço de defesa: _____						03 – Código do rebanho no estudo (10 dígitos) 04 – Coordenadas Lat _____° _____', _____". Lon _____° _____', _____". Altitude _____																																																																																							
02 – Data da colheita sangue/inoculação tub. e da leitura tub.: _____/_____/_____, e _____/_____/_____																																																																																													
05- Tipo da Exploração: ☐ corte ☐ leite ☐ mista 06- Tipo de Criação: ☐ confinado ☐ semi-confinado ☐ extensivo 07- Nº de Ordenhas por dia (apenas leite e mista): ☐ 1 ordenha ☐ 2 ou 3 ordenhas ☐ Não ordenha 08- Tipo de Ordenha (apenas leite e mista): ☐ manual ☐ mecânica ao pé ☐ mecânica em sala de ordenha ☐ Não ordenha 09- Produção de leite (apenas leite e mista): a) Nº de vacas em lactação: _____ b) Produção diária de leite na fazenda: _____ litros 10- Usa inseminação artificial? ☐ não ☐ usa inseminação artificial e touro ☐ usa só inseminação artificial 11- Raça predominante - Bovinos: ☐ zebu ☐ europeu de leite ☐ europeu de corte ☐ mestiço ☐ outras raças - Bubalinos: ☐ murrh ☐ mediterrâneo ☐ carabao ☐ jaffarabadi ☐ outras raças																																																																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th colspan="5">12(a)- Bovinos existentes</th> <th colspan="5">12(b)- Bubalinos existentes</th> </tr> <tr> <th>Machos Castrados</th> <th colspan="4">Machos inteiros (meses)</th> <th colspan="4">Fêmeas (meses)</th> <th>Machos Castrados</th> <th colspan="4">Machos inteiros (meses)</th> <th colspan="4">Fêmeas (meses)</th> </tr> <tr> <th>Total</th> <th>0-6</th> <th>6-12</th> <th>12-24</th> <th>> 24</th> <th>0-6</th> <th>6-12</th> <th>12-24</th> <th>> 24</th> <th>Total</th> <th>0-6</th> <th>6-12</th> <th>12-24</th> <th>> 24</th> <th>0-6</th> <th>6-12</th> <th>12-24</th> <th>> 24</th> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>de reprod</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>de reprod</td> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>												12(a)- Bovinos existentes					12(b)- Bubalinos existentes					Machos Castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)				Machos Castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)				Total	0-6	6-12	12-24	> 24	0-6	6-12	12-24	> 24	Total	0-6	6-12	12-24	> 24	0-6	6-12	12-24	> 24									de reprod									de reprod																		
12(a)- Bovinos existentes					12(b)- Bubalinos existentes																																																																																								
Machos Castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)				Machos Castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)																																																																															
Total	0-6	6-12	12-24	> 24	0-6	6-12	12-24	> 24	Total	0-6	6-12	12-24	> 24	0-6	6-12	12-24	> 24																																																																												
								de reprod									de reprod																																																																												
13- Outras espécies domésticas na propriedade: ☐ ovinos/caprinos ☐ equídeos ☐ suínos ☐ aves de quintal ou comerciais ☐ cão ☐ gato 14- Espécies silvestres em vida livre na propriedade: ☐ não tem ☐ cervídeos ☐ capivaras ☐ felídeos ☐ marsupiais (gambá) ☐ macacos ☐ outros mamíferos: _____ 15- Alguma vaca/búfala abortou nos últimos 12 meses? ☐ não ☐ sim ☐ não sabe 16- O que faz com o feto abortado e a placenta? ☐ enterra/joga em fossa/queima ☐ alimenta porco/cão ☐ não faz nada 17- Faz testes para diagnóstico de brucelose? ☐ não ☐ sim, regularidade dos testes: ☐ uma vez ao ano ☐ duas vezes ao ano ☐ quando compra animais ☐ qd. há aborto na fazenda ☐ qd. exigido para trânsito/eventos/crédito 18- Faz testes para diagnóstico de tuberculose? ☐ não ☐ sim, regularidade dos testes: ☐ uma vez ao ano ☐ duas vezes ao ano ☐ quando compra animais ☐ qd. exigido para trânsito/eventos/crédito 19- Nos últimos 2 anos houve introdução de bovinos ou bubalinos? ☐ não ☐ sim Onde/de quem: ☐ em exposição ☐ em leilão/feira ☐ de comerciante de gado ☐ diretamente de outras fazendas 20- Introduziu fêmeas ou machos (bovinos ou bubalinos) com finalidade de reprodução? ☐ não ☐ sim Onde/de quem: ☐ em exposição ☐ em leilão/feira ☐ de comerciante de gado ☐ diretamente de outras fazendas 21- Vende fêmeas ou machos para reprodução? ☐ não ☐ sim A quem/onde: ☐ em exposição ☐ em leilão/feira ☐ a comerciante de gado ☐ diretamente a outras fazendas 22- Vacina contra brucelose com B19/RB51? ☐ não ☐ sim ☐ não sabe 23- Local de abate das fêmeas e machos adultos: ☐ na própria fazenda ☐ em estabelecimento sem inspeção veterinária ☐ em estabelecimento de abate com inspeção veterinária ☐ não abate 24- Aluga pastos em alguma época do ano? ☐ não ☐ sim 25- Tem pastos em comum com outras propriedades? ☐ não ☐ sim 26- Compartilha outros itens com outras propriedades? ☐ não ☐ sim, qual: ☐ insumos ☐ equipamentos ☐ funcionários 27- Existem na propriedade áreas alagadiças às quais o gado tem acesso? ☐ não ☐ sim 28- Existe na propriedade área(s) onde o gado permanece concentrado durante o dia ou à noite? ☐ não ☐ sim, qual: ☐ palafitas ☐ outra: _____ 29- Tem piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto? ☐ não ☐ sim 30- A quem entrega leite (apenas leite e mista)? ☐ cooperativa ☐ laticínio ☐ direto ao consumidor ☐ não entrega 31- Resfriamento do leite (apenas leite e mista): ☐ não faz ☐ faz, como: ☐ em resfriador ou tanque de expansão próprio ☐ em resfriador ou tanque de expansão coletivo 32- A entrega do leite é feita a granel (apenas leite e mista)? ☐ não ☐ sim 33- Produz queijo, manteiga ou outro lácteo na propriedade? ☐ não ☐ sim, finalidade: ☐ p/ consumo próprio ☐ p/ venda 34- Consome leite cru ou derivado lácteo produzido com leite cru? ☐ não ☐ sim 35- Tem assistência veterinária? ☐ não ☐ sim, de que tipo? ☐ veterinário da cooperativa ☐ veterinário particular 36- Alimenta bovinos com soro de leite bovino? ☐ não ☐ sim 37- Nos últimos 12 meses comprou bovinos/bubalinos: Nº de animais: _____ De quantas fazendas? _____ 38- Nos últimos 12 meses vendeu bovinos/bubalinos: Nº de animais: _____ Para quantas fazendas? _____ 39- Compartilha aguadas/bebedouros com animais de outra(s) propriedade(s) em algum período do ano? ☐ não ☐ sim 40- Propriedade possui área para pouso de boiada em trânsito? ☐ não ☐ sim 41- Vacinas contra brucelose é adequadamente conservada? (apenas para aquelas que vacinam: questão 22) ☐ não ☐ sim ☐ não respondeu/não vacina 42- Vacinação contra brucelose é corretamente executada? (apenas para aquelas que vacinam: questão 22) ☐ não ☐ sim ☐ não respondeu/não vacina 43- Classificação da propriedade? ☐ rural clássica ☐ aldeia indígena ☐ assentamento ☐ periferia urbana																																																																																													
NOME DO VETERINÁRIO _____						ASSINATURA _____																																																																																							

ANEXO C - INSTRUÇÕES PARA O PREENCHIMENTO DO QUESTIONÁRIO

As questões e campos a serem respondidos estão relacionados a seguir, com suas respectivas instruções para preenchimento.

CAMPO 1 - IDENTIFICAÇÃO

Deverá ser utilizada letra de forma legível e maiúscula, devendo ser preenchido na unidade local do serviço de defesa animal, antes de ir à propriedade.

Deverá ser identificado o município onde a propriedade está localizada e sua respectiva Unidade Federativa, o nome completo do(s) proprietário(s) dos animais e o nome da Propriedade. O código de cadastro a ser identificado é o número (ou código) de identificação da propriedade no serviço de defesa oficial local.

A região é o nº do estrato de amostragem ao qual pertence o município em questão, conforme definido no plano amostral do Estado. Este campo deverá ser preenchido pelo coordenador do levantamento.

CAMPO 2 - DATA DA COLHEITA, INOCULAÇÃO DA TUBERCULINA E LEITURA

Deverá ser preenchido utilizando-se dois dígitos no dia e no mês da visita. O ano deverá ser indicado com os quatro dígitos.

CAMPO 3 - CÓDIGO DO REBANHO NO ESTUDO (10 DÍGITOS)

Este código será a base do controle das amostras e informações das propriedades, sendo de fundamental importância.

Os primeiros 7 (sete) dígitos são de identificação do município onde a propriedade está localizada, correspondente ao número de identificação no IBGE, que é único para cada município do País. Os últimos 3 (três) dígitos são relativos à ordem de sequência das propriedades daquele município a serem trabalhadas no inquérito.

CAMPO 4 - COORDENADAS

O objetivo é ter a localização geográfica exata ou a mais exata possível da propriedade (sede) onde estão os animais amostrados. Preferencialmente, deverá ser preenchido utilizando-se aparelho GPS. A latitude e a longitude deverão ser identificadas com graus, minutos, segundos e décimo de segundos (7 dígitos) e a altitude em metros em relação ao nível do mar.

QUESTÃO 5 - TIPO DE EXPLORAÇÃO

Marcar uma única opção, aquela que mais caracterize o rebanho amostrado na propriedade.

Entende-se por “corte” aqueles rebanhos destinados à cria, recria e engorda ou qualquer uma destas fases separadamente, desde que os animais tenham como objetivo final a engorda para posterior abate (pecuária de corte) e produção de carne. A existência de alguns animais para produção de leite na propriedade (geralmente para consumo próprio), não descaracteriza esse rebanho como sendo de corte, desde que esta produção leiteira não seja uma atividade de importância econômica.

Entende-se por “leite” os rebanhos que podem ser caracterizados como pertencentes à pecuária de leite. Têm por finalidade e atividade principal a produção leiteira, independente do destino dado ao leite produzido (consumo próprio ou venda).

Na opção “mista”, encontram-se aquelas explorações onde o rebanho possui animais criados com objetivo de produzir leite e também animais para cria, recria e engorda ou parte deste ciclo, com objetivo final de abate e produção de carne. Os animais da produção leiteira e

os da produção de carne convivem em ambientes comuns e/ou fazem uso de instalações em comum.

Em propriedades que possuam rebanhos separados de corte e de leite (explorações distintas geograficamente e de manejos independentes e diferentes), este levantamento soroepidemiológico deverá ser realizado naquele rebanho de maior importância econômica para a propriedade.

QUESTÃO 6 - TIPO DE CRIAÇÃO

Marcar uma única opção, aquela que melhor caracterize o rebanho amostrado na propriedade.

Considera-se “confinado” aquele tipo de exploração intensiva onde os animais são mantidos em espaço limitado e reduzido, sendo a alimentação (volumoso, concentrado, sal mineral) e água fornecidas de forma sistemática e controlada, dentro do próprio local onde eles estão alojados.

Em “semi-confinado” encontram-se os tipos de criação semi-intensiva onde os animais permanecem na pastagem e recebem suplementação alimentar (volumoso e/ou concentrado) durante todo o ano ou parte deste (por exemplo, na época da seca).

Como “extensivo” entende-se os tipos de criação nos quais os animais são mantidos exclusivamente em regime de pasto, podendo receber concentrado proteico e/ou sal mineral.

QUESTÃO 7 - NÚMERO DE ORDENHAS POR DIA (apenas leite e mista)

Marcar uma única opção, aquela que caracterize o rebanho amostrado na propriedade.

QUESTÃO 8 - TIPO DE ORDENHA (apenas leite e mista)

Escolher uma única opção, aquela que caracterize o rebanho amostrado.

Marcar “manual” se a ordenha for feita por serviço de pessoal que não utiliza nenhum equipamento específico, utilizando somente as mãos e recipiente para o leite ordenhado.

A opção “mecânica ao pé” deverá ser marcada quando a ordenha for feita utilizando-se ordenhadeira mecânica, pelo sistema de balde ou latão ao pé, onde não há circuito fechado.

Entende-se por “mecânica em sala de ordenha” a ordenha realizada em circuito fechado, instalado em sala de ordenha apropriada.

Se não é feita ordenha do rebanho amostrado (exemplo: gado de corte), deverá ser marcada a opção “não ordenha”.

QUESTÃO 9 - PRODUÇÃO DE LEITE (apenas leite e mista)

Indicar o número de vacas que estão em lactação (sendo ordenhadas) no rebanho da propriedade, na ocasião do inquérito soroepidemiológico e a média de produção total de leite por dia, em litros.

Caso o rebanho amostrado seja constituído somente por animais de corte, onde não é feita ordenha, este item deverá ser deixado sem resposta.

QUESTÃO 10 - USA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL?

Marcar uma única opção, aquela que caracterize o rebanho amostrado na propriedade.

QUESTÃO 11 - RAÇA PREDOMINANTE

Marcar uma única opção, aquela que caracterize a propriedade amostrada.

Quando o rebanho amostrado for de bovinos, escolher as opções indicadas, considerando:

- Zebu: qualquer raça de bovinos da espécie *Bos indicus*. Exemplo: considera-se raça zebu predominante quando o rebanho for composto por: (1) bovinos de uma única raça (ex:

nelore); (2) bovinos de duas ou mais raças diferentes (ex: nelore e guzerá); (3) bovinos resultantes de cruzamentos entre raças zebuínas, independente do grau de sangue (ex: nelore X guzerá);

- Europeu de leite: raças de origem europeia, ou seja, bovinos da espécie *Bostaurus*, especializadas em produção leiteira, podendo o rebanho ser constituído por animais de uma única raça ou de cruzamentos entre raças desta mesma espécie. Exemplo: holandes e jersey;
- Europeu de corte: raças de origem europeia, ou seja, bovinos da espécie *Bostaurus*, especializadas em produção de carne, podendo o rebanho ser constituído por animais de uma única raça ou de cruzamentos entre raças desta mesma espécie. Exemplo: angus, charolês e simental;
- Mestiço: é o bovino resultante de cruzamentos entre raças, não permitindo que ele seja caracterizado dentro de uma ou mais raças específicas, sendo, portanto, considerado como sem raça definida;
- Outras raças: todas as categorias que não se enquadrarem nas opções acima. São incluídos aqui os bovinos resultantes de cruzamentos entre as espécies *Bostaurus* e *Bosindicus*, que dão origem ao gado cruzado (europeus X zebus), independente do grau de sangue. Exemplo: girolanda.

Quando o rebanho amostrado for de bubalinos, escolher uma das opções indicadas, considerando as características fenotípicas mais específicas da raça predominante. Caso as características fenotípicas não sejam suficientes para identificar uma das raças indicadas, marcar a opção “outras raças”.

CAMPO 12 - (a) BOVINOS EXISTENTES e (b) BUBALINOS EXISTENTES

Escrever, no espaço próprio, o número de animais existentes, de acordo com a indicação de sexo e faixa etária (em meses).

O preenchimento deverá ser feito conforme a resposta obtida na propriedade, e não de acordo com a ficha de controle do serviço oficial. O objetivo não é fiscalizar o criador, mas saber a realidade daquele rebanho, sem fins punitivos para aqueles que indicarem quantidades diferentes das conhecidas pelo serviço oficial.

QUESTÃO 13 – OUTRAS ESPÉCIES DOMÉSTICAS NA PROPRIEDADE

Marcar uma ou mais das opções que indicam as espécies que estão presentes na propriedade.

QUESTÃO 14 - ESPÉCIES SILVESTRES EM VIDA LIVRE NA PROPRIEDADE

Marcar uma ou mais das opções que correspondam às espécies de animais já avistadas na propriedade, fazendo parte da fauna do ambiente e não criadas em cativeiro. Caso não tenha sido vista nenhuma espécie silvestre de vida livre, marcar “não tem”.

Na opção “outros mamíferos”, escrever no espaço próprio qual(is) outra(s) espécie(s) de mamíferos avistada(s).

QUESTÃO 15 - ALGUMA VACA/BÚFALA ABORTOU NOS ÚLTIMOS 12 MESES?

Marcar uma única opção, procurando fazer com que esta não seja uma resposta imediata, pois poderá ter havido casos no rebanho amostrado que podem não ser lembrados com facilidade. O entrevistador pode fazer perguntas indiretas que permitam chegar à resposta correta; evitando usar termos muito técnicos com os entrevistados.

Deve-se evitar a opção “não sabe”, procurando sugerir a quem está respondendo a busca de ajuda com outra pessoa da propriedade que poderia esclarecer a resposta.

QUESTÃO 16 - O QUE FAZ COM O FETO ABORTADO E A PLACENTA?

Marcar uma ou mais opções, de forma a obter correspondência com as ações executadas no rebanho amostrado. Em casos de jogar em leitos de água, optar pela resposta “não faz nada”, pois entende-se que, não fazendo nada ou não dando um destino adequado, está havendo contaminação do ambiente.

QUESTÃO 17 - FAZ TESTES PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE?

Marcar uma única das opções e, sendo a resposta “sim”, marcar uma ou mais das opções que indicam a regularidade dos testes e as possíveis outras ocasiões em que eles são feitos na propriedade.

QUESTÃO 18 - FAZ TESTES PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE?

Marcar uma única das opções e, sendo a resposta “sim”, marcar uma ou mais das opções que indicam a regularidade dos testes e as possíveis outras ocasiões em que eles são feitos na propriedade.

QUESTÃO 19 - NOS ÚLTIMOS 2 ANOS HOVE INTRODUÇÃO DE BOVINOS OU BUBALINOS?

Marcar uma única opção e, em caso de resposta ser “sim”, completar a questão marcando se os animais adquiridos foram ou não tuberculinizados. Marcar uma ou mais das opções que correspondam às respostas de “de onde” ou “de quem”.

Observação: Lembrar que o objetivo não é fiscalizar a propriedade.

QUESTÃO 20 - INTRODUZIU FÊMEAS OU MACHOS (BOVINOS OU BUBALINOS) COM FINALIDADE DE REPRODUÇÃO?

Marcar uma única das opções, aquela que indique esta atividade no rebanho amostrado e, em caso da resposta ser “sim”, completar a questão marcando uma ou mais das opções que correspondam às respostas de “de onde” ou “de quem”.

Observação: Lembrar que o objetivo não é fiscalizar a propriedade.

QUESTÃO 21 - VENDE FÊMEAS OU MACHOS PARA REPRODUÇÃO?

Marcar uma única das opções, aquela que indique esta atividade no rebanho amostrado e, em caso da resposta ser “sim”, completar a questão marcando uma ou mais das opções que correspondam às respostas de “a quem” ou “onde”.

Observação: Lembrar que o objetivo não é fiscalizar a propriedade.

QUESTÃO 22 - VACINA CONTRA BRUCELOSE COM B19/RB51?

Marcar uma única opção, aquela que indique a atividade no rebanho amostrado, independente das informações constantes na ficha de controle da propriedade no serviço oficial.

QUESTÃO 23 - LOCAL DE ABATE DAS FÊMEAS E MACHOS ADULTOS

Marcar uma ou mais das opções que caracterizem a atividade no rebanho amostrado.

Pode haver mais de uma resposta.

Caracteriza-se como “estabelecimento sem inspeção veterinária” os açougues ou açougueiros que compram animais para abate e venda da carne, sem inspeção oficial.

QUESTÃO 24 - ALUGA PASTO EM ALGUMA ÉPOCA DO ANO?

Marcar uma única opção, aquela que indique esta atividade na propriedade. Marcar “sim” se a propriedade aluga pastos próprios para terceiros ou se aluga pastos de terceiros para colocar seu rebanho. Marcar “não” se não aluga pastos.

QUESTÃO 25- TEM PASTOS EM COMUM COM OUTRAS PROPRIEDADES?

Marcar uma opção adequada, considerando que pastos em comum são aqueles onde os animais de duas ou mais propriedades permanecem, por qualquer período, sob pastejo em comum.

QUESTÃO 26 - COMPARTILHA OUTROS ITENS COM OUTRAS PROPRIEDADES?

Indicar, em caso afirmativo, quais os itens compartilhados com outras propriedades.

QUESTÃO 27 - EXISTEM NA PROPRIEDADE ÁREAS ALAGADIÇAS ÀS QUAIS O GADO TEM ACESSO?

Marcar uma opção, aquela que indique a situação para o rebanho amostrado.

QUESTÃO 28 – EXISTE NA PROPRIEDADE ÁREA(S) ONDE O GADO PERMANECE CONCENTRADO DURANTE O DIA OU À NOITE?

Marcar uma opção. Sendo a resposta “sim”, especifique o local de aglomeração.

QUESTÃO 29- TEM PIQUETE SEPARADO PARA FÊMEAS NA FASE DE PARTO E/OU PÓS-PARTO?

Marcar uma opção, aquela que indique a situação para o rebanho amostrado.

QUESTÃO 30- A QUEM ENTREGA LEITE? (apenas leite e mista)

Marcar uma ou mais das opções, aquela(s) que indique(m) a atividade na propriedade.

QUESTÃO 31- RESFRIAMENTO DO LEITE (apenas leite e mista)

Marcar a opção correspondente à atividade na propriedade e, sendo a resposta “faz”, complementar marcando a opção de como é feito o resfriamento.

QUESTÃO 32 - A ENTREGA DO LEITE É FEITA A GRANEL? (apenas leite e mista)

Marcar a opção que indique a atividade na propriedade.

Entende-se por “entrega de leite a granel” quando o leite é armazenado em tanque de expansão e coletado em caminhões próprios (tanque).

O leite entregue em latão corresponde à resposta “não”.

QUESTÃO 33- PRODUZ QUEIJO, MANTEIGA OU OUTRO LÁCTEO NA PROPRIEDADE?

Marcar uma das opções, aquela que indique a atividade na propriedade.

Sendo a resposta “sim”, marcar uma ou mais das opções que sejam adequadas à finalidade dada ao produto.

QUESTÃO 34 - CONSOME LEITE CRU OU DERIVADO LÁCTEO PRODUZIDO COM LEITE CRU?

Marcar a opção que indique este hábito, abrangendo todas as pessoas que vivem ou trabalham na propriedade. Marque sim se pelo menos uma pessoa consumir regularmente leite cru na propriedade.

QUESTÃO 35 - TEM ASSISTÊNCIA VETERINÁRIA?

Considera-se “assistência veterinária” a atividade de médicos veterinários que tenham uma regularidade de visitas, com orientações específicas no manejo produtivo e/ou sanitário do rebanho. Nesta questão, não se considera como “assistência veterinária” visitas de profissionais

para atendimento a casos isolados de urgência (exemplo: atendimento a um animal intoxicado ou com problemas de parto).

Marcar a opção “sim” se houver assistência veterinária à propriedade e “não”, caso não haja assistência veterinária. Havendo assistência, complementar com as opções seguintes.

QUESTÃO 36 - ALIMENTA BOVINOS COM SORO DE LEITE BOVINO?

Marcar uma única opção, aquela que indique esta atividade na propriedade. Marcar “sim” se existe o hábito de se oferecer soro de leite bovino aos bovinos de qualquer idade presentes na propriedade, seja de forma contínua ou apenas em alguns períodos do ano.

CAMPO 37 - NOS ÚLTIMOS 12 MESES COMPROU BOVINOS/BUBALINOS?

Informar quantos e de quantas fazendas.

CAMPO 38 - NOS ÚLTIMOS 12 MESES VENDEU BOVINOS/BUBALINOS?

Informar quantos e para quantas fazendas.

QUESTÃO 39- COMPARTILHA AGUADAS OU BEBEDOUROS COM OUTRA PROPRIEDADE EM ALGUM PERÍODO DO ANO?

Marcar uma opção, aquela que indique a situação para o rebanho amostrado.

QUESTÃO 40 - PROPRIEDADE POSSUI ÁREA PARA POUSO DE BOIADA EM TRÂNSITO?

Marcar uma opção, aquela que indique a situação para o rebanho amostrado.

CAMPO 41 – VACINA CONTRA BRUCELOSE É ADEQUADAMENTE CONSERVADA? (apenas para aquelas que vacinam: questão 22)

Se a vacina foi mantida sob refrigeração até o momento da aplicação e se foi obedecido o prazo de validade, marcar sim. Apenas para as que vacinam.

CAMPO 42 – VACINAÇÃO CONTRA BRUCELOSE É CORRETAMENTE EXECUTADA? (apenas para aquelas que vacinam: questão 22)

Se houve a correta marcação das vacinadas e se foi feita por veterinário ou vacinador cadastrado, marcar sim. Apenas para as que vacinam.

QUESTÃO 43 - CLASSIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE

Marcar uma opção, aquela que indique a situação para o rebanho amostrado.

IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO

O médico veterinário responsável pelo preenchimento do formulário deverá identificar-se no espaço próprio, colocando nome completo por extenso e com letra de forma, e assinando no local indicado.

ANEXO D- CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-IB

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

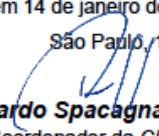
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 053/08 sobre o Projeto: “Avaliação anatomopatológica de materiais provenientes de animais suspeitos de enfermidades, encaminhados ao serviço de rotina diagnóstica do Laboratório de Anatomia patológica do Instituto Biológico/APTA”, sob a responsabilidade de Claudia Del Fava, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA). A CEUA-IB aprova apenas as atividades desenvolvidas dentro do Instituto Biológico.

Protocolo analisado pela CEUA-IB em 21 de maio de 2008 e revalidado em 14 de janeiro de 2025.

São Paulo, 14 de janeiro de 2025


Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da CEUA-IB

CEUA – IB

Registro

Número: 058/09

Livro: 01

Folha: 58

Data: 14/01/25