PATRICIA ROSSI MORICONI

Pesquisa de *Mycobacterium* spp. em queijos minas meia cura
obtidos em feiras-livres da cidade de São Paulo

São Paulo

2013

PATRICIA ROSSI MORICONI

**Pesquisa de *Mycobacterium* spp. em queijos minas meia cura obtidos
em feiras-livres da cidade de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador: Profa. Dra. Evelise de Oliveira Telles

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2860
FMVZ

Moriconi, Patricia Rossi
Pesquisa de *Mycobacterium* spp. em queijos minas meia cura obtidos em feiras-livres da cidade de São Paulo. / Patricia Rossi Moriconi. -- 2013.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise de Oliveira Telles.

1. *Mycobacterium* spp. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. Queijo Minas meia-cura. 4. Leite cru. 5. Tuberculose zoonótica. 6. Feiras-livre. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de *Mycobacterium* spp em queijos meia cura obtidos em feiras livres na cidade de São Paulo", protocolado sob o nº 2008/2010, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/09/2010.

We certify that the Research "Recovery of *Mycobacterium* spp in meia cura minas cheese from open markets of the São Paulo city", protocol number 2008/2010, under the responsibility Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/29/2010.

São Paulo, 30 de setembro de 2010

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MORICONI, Patricia Rossi

Título: **Pesquisa de *Mycobacterium* spp. em queijos minas meia cura obtidos em feiras-livres da cidade de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sandra Regina Rossi Moriconi e Roberto Moriconi

Ao meu irmão Rodrigo Rossi Moriconi

Ao meu namorado Rafael de Camargo

A meu Nono Loris Moriconi (in memoriam)

*"Se vi mais longe foi por estar de pé
sobre ombros de gigantes."*

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus passos e por guiar meu destino.

Aos meus pais, Sandra Regina Rossi Moriconi e Roberto Moriconi, por todos os ensinamentos e valores que me passaram e por abrirem janelas quando todas as portas se fecharam. Devo tudo a vocês!

Ao meu irmão, Rodrigo Moriconi, pelas constantes risadas, fazendo-me abstrair do cansaço cotidiano e tornando meus dias mais leves. Muito importante.

Ao meu namorado, Rafael de Camargo, por toda a ajuda na realização das coletas, por sempre me incentivar a ir em frente e por ser um modelo admirável de inteligência. Inspiro-me muito em você.

À Professora Dra. Evelise de Oliveira Telles pela orientação, confiança e ensinamentos transmitidos durante o curso de Pós-Graduação. Muito obrigada por tudo.

A minha tia Leila, meu tio Luiz, meu primo Márcio e às minhas avós Luisa e Marcela por serem minha família e estarem comigo nos momentos mais importantes e decisivos de minha vida. Meu muito obrigada.

Às minhas grandes amigas Simone Kuramoto, Caroline Cha, Fernanda Rodrigues Agreste, Carolina Liza, Mariana Paula Martinho e Luisa Zanolli Moreno pelas palavras de conforto e pelos anos de amizade. Vocês são muito importantes pra mim!

Às minhas amigas de graduação: Laura Botton Lins, Cintia M. M. Araújo, Julia Yeri Lee, Fernanda Sevciuc, Luciana Toporcov, Nívea Alves Biaggio, Priscila Pedra e Pedro Barbosa pela amizade durante os 5 anos da faculdade e por todas as aventuras vividas e compartilhadas durante esse tempo. Adoro vocês!

A uma nova grande amiga que a pós-graduação me deu: Paloma de Oliveira Tonietti e que foi muito importante na realização de parte desse trabalho. Muito obrigada!

A todos meus colegas de pós-graduação pelos bons momentos, pelas risadas, e pelas idéias no trabalho. Por dividirem como as angustias e felicidades do mundo da pós-graduação. Em especial a: Camila Fontanesi, Fernanda Arellano, Gian Pacola, Fabiana Gasperazzo, Renata Maturino, ao Residente Gustavo Yamashita, Sandra Salaberry, Aline Hora e Luis Espinoza.

Ao Professor Êneo Alves da Silva Jr. E José Cezar Panetta por serem exemplos de profissionais a serem seguidos: sempre apaixonados pelo que fazem. Muito orgulho de ter sido aluna de vocês.

A Doutoranda do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Cássia Ikuta, por ter me ensinado e me ajudado muito. Muito obrigada!

Às técnicas Sandra Sanches, Gisele de Oliveira, Sheila de Oliveira e Zenaide por terem me auxiliado na realização do experimento, pelo apoio e pela amizade e aos demais funcionários do Departamento por todo o auxílio e amizade. Em especial: Danival Lopes Moreira, Renatinho e Antônio.

Ao Alberto Pascucci, amigo da família, que acredita na importância e relevância do meu trabalho.

Ao meu nono, Loris Moriconi, (*in memoriam*) porque eu sei que ele está olhando por mim. Se em mim existe alguma criatividade para inventar algo novo sei que é por você.

Ao professor Fábio Gregori pela disponibilidade em utilizar seu laboratório. Muito obrigada!

A todos que auxiliaram direta ou indiretamente a execução desse trabalho.

RESUMO

MORICONI, P. R. **Pesquisa de *Mycobacterium* spp. em queijos minas meia cura obtidos em feiras-livres da cidade de São Paulo.** [Recovery of *Mycobacterium* spp. in meia cura minas cheese from open markets of the São Paulo city]. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O gênero *Mycobacterium* spp. compreende microrganismos saprófitas e patogênicos de interesse em saúde animal e humana. A espécie *M. bovis*, que causa tuberculose nos animais, é excretada através do leite de bovinos infectados e tem no consumo de leite cru e seus derivados uma importante via de transmissão para o homem, causando uma doença tão grave quanto à causada pelo *M. tuberculosis*. Como a doença nos animais é endêmica no Brasil e o queijo minas meia cura é normalmente fabricado com leite cru e muito apreciado pelo consumidor paulistano, amostras desse produto, obtidas em feiras-livres, foram analisadas quanto à ocorrência de micobactérias. As amostras foram descontaminadas pelo método HPC 1,5%, semeadas em meio Stonebrink-Leslie (incubadas a 37°C/90 dias) e as colônias suspeitas, submetidas à reação de PCR TB multiplex e sequenciamento nucleotídico. Em 12% das amostras (16/133) foram isoladas 26 colônias de *Mycobacterium* spp., tendo sido identificadas 6 espécies, todas ambientais: *Mycobacterium fortuitum*, *M. confluentis*, *M. elephantis*, *M. novocastrense*, *M. sphagni* e *M. arupense*; 7 isolados, no entanto, permaneceram sem caracterização quanto à espécie. O *M. fortuitum* é um patógeno oportunista importante em saúde pública, sem que haja, entretanto, evidências de transmissão alimentar; o *M. novocastrense*, *M. arupense* e *M. elephantis* também têm sido consideradas espécies com potencial patogênico ao ser humano. Os resultados sugerem, tal como era esperado, que a frequência e a carga inicial de *M. bovis* em queijo Minas meia cura sejam baixas, mas se deve considerar que a metodologia empregada, por falta de outra específica, não privilegia a detecção em cenário de baixa carga inicial do agente acompanhada por alta carga contaminante. Sugerem também a necessidade de se avaliar a importância da transmissão alimentar de micobactérias não tuberculosas, especialmente para indivíduos imunossuprimidos.

Palavras-chave: *Mycobacterium* spp. *Mycobacterium bovis*. Queijo Minas meia-cura.
Leite cru. Tuberculose zoonótica. Feiras-livres.

ABSTRACT

MORICONI, P. R. **Recovery of *Mycobacterium* spp. in meia cura minas cheese from open markets of the São Paulo city.** [Pesquisa de *Mycobacterium* spp. em queijos minas meia cura obtidos em feiras-livres da cidade de São Paulo]. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Mycobacterium genus consists of saprophytic and pathogenic microorganisms of interest in animal and human health. *M. bovis* specie, which causes *tuberculosis* in animals, is excreted through the milk of infected cattle and the consumption of raw milk and its derivatives is an important route of transmission to humans, causing a disease as serious as the one caused by *M. tuberculosis*. Considering that the disease in animals is endemic in Brazil and that minas meia cura cheese cure is usually made from raw milk and much appreciated by paulistano consumer, samples of the product acquired in open markets, were analyzed for the occurrence of mycobacteria. The samples were decontaminated by the method HPC 1.5%, sown in Stonebrink-Leslie medium (incubated at 37 °C/90 da ys) and the suspected colonies, submitted to PCR TB multiplex and nucleotide sequencing reaction. In 12% of samples (16/133) were isolated 26 colonies of *Mycobacterium* spp. and 6 species have been identified, all of them are environmental *Mycobacterium fortuitum*, *M. confluentis*, *M. elephantis*, *M. novocastrense*, *M. sphagni* and *M. arupense*; 7 isolates, however, remained without characterization for the specie. *M. fortuitum* is an important opportunistic pathogen in public health, without, however, evidence of being transmitted by food; *M. novocastrense*, *M. arupense* and *M. elephantis* species have also been considered potentially pathogenic to humans. The results suggest that the frequency and/or contamination load of *M. bovis* in meia cura Minas cheese is (are) low (s). We have to consider, however, that this result may have been influenced by the absence of an analytical method capable of identifying the agent in the food matrix in which a low load of microorganism is expected, accompanied by high load of contaminants. Also suggest the need to evaluate the possible importance of foodborne non-tuberculous mycobacteria, especially for immunocompromised individuals.

Keywords: *Mycobacterium* spp. *Mycobacterium bovis*. Minas cheese half-cure. Raw milk. Zoonotic *tuberculosis*. Open markets.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Descrição dos *primers* utilizados na reação de PCR TB multiplex e sequência 5' → 3' de cada um deles46
- Quadro 2 - Tamanho do produto esperado, em pares de bases (pb), para cada par de *primer* amplificador utilizado na reação de PCR TB multiplex. Resultado em gênero, complexo ou espécie indicado pela combinação dos pares de *primers*.....47
- Quadro 3 - Amostras positivas para micobactérias através da técnica de sequenciamento nucleotídico. Classificação quanto à região da cidade onde a amostra foi adquirida, ao tipo de queijo e a espécie de micobactéria isolada.....54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Reação de PCR TB multiplex para amplificação de DNA de micobactérias isoladas em meio Stonebrink-Leslie, evidenciando bandas de aproximadamente 1030 pb 51
- Figura 2 - Colônia de *Mycobacterium fortuitum* isolada em amostra de queijo minas meia cura obtido em feira-livre da região central da cidade de São Paulo. São Paulo, 2013 52
- Figura 3 - Colônia de *Mycobacterium novocastrense* isolada em amostra de queijo minas meia cura obtido em feira-livre da região central da cidade de São Paulo. São Paulo, 2013..... 53
- Figura 4 - Colônia de *Mycobacterium elephantis* isolada em amostra de queijo minas meia cura obtido em feira-livre da região oeste da cidade de São Paulo. São Paulo, 2013 53
- Figura 5 - Colônia de *Mycobacterium confluentis* isolada em amostra de queijo minas meia cura obtido em feira-livre da região oeste da cidade de São Paulo. São Paulo, 2013 53
- Figura 6 - Árvore filogenética construída com o método de *neighbor-joining* através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (Software Mega v.5) para a região parcial (503 nucleotídeos) do gene 16S rRNA das micobactérias 55
- Figura 7 - Árvore filogenética construída com o método de *neighbor-joining* através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (Software Mega v.5) para a região parcial (505 nucleotídeos) do gene 16S rRNA das micobactérias identificadas como *Mycobacterium fortuitum* 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
C	Citosina
CB-18	Carboxipropilbetaina
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
ddNTP	Dideoxynucleotídeos Trifosfatos
DNA	Ácido Desoxiribunucleico
dNTP	Desoxynucleotídeos Trifosfatos
DPEC	Dietilpirocarbonato
DR	Direct Repeat
EDTA	Ácido Etilenodiaminatetracético
EUA	Estados Unidos da América
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G	Guanina
g	Grama
<i>g</i>	Gravidade
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPC	Hexa-Cetil-Piridínio
HPLC	High Performance Liquid Chromatography/ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LHA	Laboratório de Higiene Alimentar
Log	Logarítimo
LZB	Laboratório de Zoonoses Bacterianas
M	Molar
<i>M. abcessus</i>	<i>Mycobacterium abcessus</i>
<i>M. arupense</i>	<i>Mycobacterium arupense</i>
<i>M. avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>

<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>M. confluentis</i>	<i>Mycobacterium confluentis</i>
<i>M. elephantis</i>	<i>Mycobacterium elephantis</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>Mycobacterium gordonae</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>M. lentiflavum</i>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
<i>M. marinum</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>M. moriokaense</i>	<i>Mycobacterium moriokaense</i>
<i>M. novocastrense</i>	<i>Mycobacterium novocastrense</i>
<i>M. sphagni</i>	<i>Mycobacterium sphagni</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
MIRU	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
MIRU-VNTR	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeat
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MNT	Micobactérias Não Tuberculosas
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
O ₂	Oxigênio
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomol
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
p/v	Partes por Volume
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para

rDNA	Ácido Desoxiribonucleico Ribossômico
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis
RNA	Ácido Ribonucleico
rpoB	RNA Polymerase Beta-subunit Encoding Gene
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T	Timina
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UHT	Ultra High Temperature
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
V	Volts
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
°C	Graus Celsius
5S	Unidade ribossomal 5S
16S	Unidade ribossomal 16S
23S	Unidade ribossomal 23S

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 MICOBACTÉRIAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS	22
2.2 MICOBACTERIAS: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	25
2.2.1 Isolamento	25
2.2.2 Caracterização molecular das micobactérias	28
2.3 TRANSMISSÃO ALIMENTAR: <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> E OUTRAS MICOBACTÉRIAS	32
2.4 <i>M. BOVIS</i> E OUTRAS MICOBACERIAS EM PRODUTOS LÁCTEOS	34
3 OBJETIVOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 AMOSTRAGEM E COLETA DAS AMOSTRAS	44
4.2 DESCONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS	44
4.3 SEMEADURA DAS AMOSTRAS	44
4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS MICOBACTÉRIAS	45
4.4.1 Amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	45
4.4.1.1 Extração de DNA (Kremer et al., 1999)	45

4.4.1.2 PCR TB multiplex (WILTON; COUSINS, 2007)	46
4.4.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA	48
4.4.2.1 Reação de sequenciamento nucleotídico	48
4.4.2.2 Análise das sequências nucleotídicas	49
5 RESULTADOS	50
5.1 TÉCNICA DE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	50
5.2 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E INFERÊNCIA FILOGENÉTICA	51
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem apresentando, ano após ano, um cenário crescente na produção de leite. Dados recentes estimam que em 2010 a produção no país atingiu a marca de 30,7 milhões de litros, o que coloca o país como o 5º maior produtor mundial. No entanto, apenas 21,0 milhões de litros foram registrados pelos Serviços de Inspeção Federal (EMBRAPA, 2013), sendo o restante absorvido pelos Serviços de Inspeção Estaduais e Municipais e, uma parte considerável, pelo mercado informal. Nesse âmbito, a produção do queijo tipo Minas e, em especial a variedade Minas meia cura, é uma alternativa interessante por ser de fácil fabricação, ter alto valor agregado e ser muito apreciado pela população brasileira (LIMA, 2009; BORELLI, 2011). No entanto, esses produtos são fabricados à margem da legislação higiênico-sanitária e, provavelmente, com leite cru, o que pode incorrer risco à Saúde Pública.

Um dos importantes perigos veiculados pelo leite é o *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), agente da tuberculose bovina, que pode ser transmitido ao homem pelo consumo de leite cru e seus derivados. Embora a fabricação de queijos com leite cru seja permitida pela legislação, o tempo praticado de maturação nos queijos tipo Minas meia cura é de cerca de 10 a 20 dias, apenas (PERRY, 2007; CRUZ; MENASCHE, 2011), sendo que o período mínimo de maturação exigido para esses produtos é de 60 dias (BRASIL, 1996). Desta forma, é provável que as transformações ocorridas na matriz do queijo não sejam suficientes para inviabilizar a sobrevivência do *M. bovis*.

Dados da ocorrência da tuberculose em bovinos apontam para uma prevalência média nacional de 1,3% entre os anos de 1989 e 1998 (BRASIL, 2002). A prevalência atual da doença deverá ser divulgada em breve, como resultado de um estudo (em andamento) para mapear a tuberculose e a brucelose bovinas no país, proposto pelo PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose) (BRASIL, 2002).

Apesar de a tuberculose estar presente no rebanho brasileiro, não é frequente o isolamento do agente em amostras de leite cru ou de seus derivados (PARDO et al., 2001; LEITE et al., 2003; VIALTA, 2007). As razões estão associadas, entre

outras, ao provável baixo nível de contaminação por *M. bovis* no leite de mistura e aos altos níveis de microrganismos competidores nesse produto.

Não se sabe ao certo qual o grau de participação, atualmente, do *M. bovis* nos casos humanos de tuberculose e isso se deve aos fatos de que a sintomatologia clínica, as lesões patológicas e o tratamento da doença causada pelo *M. bovis* e pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) são similares (DE LA RUA-DOMENECH, 2006) e impedem uma caracterização específica do agente (THOEN et al., 2009; SOBRAL et al., 2011). Salienta-se que a metodologia diagnóstica mais comumente utilizada diminui a chance de crescimento do *Mycobacterium bovis*, se presente (SOBRAL et al., 2011), ou não diferencia os membros do complexo *M. tuberculosis* (ROCHA et al., 2012), dificultando, então, a obtenção de dados sobre prevalência de infecção por *M. bovis* em humanos.

Visando contribuir com dados para futuros estudos de Avaliação de Risco da ocorrência de tuberculose humana causada pelo consumo de queijos elaborados com leite cru, este estudo se propôs a avaliar a presença de *M. bovis* em queijos tipo Minas meia cura comercializados em São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICOBACTÉRIAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

As micobactérias pertencem à família Mycobacteriaceae e ao gênero *Mycobacterium* (KANTOR, 1979). São bacilos curtos, não formadores de esporo, imóveis, não capsulados, não flagelados e aeróbicos (embora algumas espécies possam crescer em concentração reduzida de oxigênio - O₂) (PFYFFER; BROWN-ELLIOT; WALLACE JR., 2003). Possuem formato ligeiramente curvo ou reto (PFYFFER; BROWN-ELLIOT; WALLACE JR., 2003) medindo entre 0,2 e 0,6 µm de largura por 1 a 10 µm de comprimento, podendo apresentar ramificações. Formam colônias cuja morfologia varia de lisa a rugosa e de não pigmentada a pigmentada, o que difere entre as espécies (PFYFFER; BROWN-ELLIOT; WALLACE JR., 2003).

Para que um organismo possa ser atribuído ao gênero *Mycobacterium*, deve possuir características mínimas necessárias tais como ser Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR), ser rico em ácidos micólicos, os quais são responsáveis pela álcool-ácido-resistência, e ter um conteúdo de ligações G+C (guanina + citosina) no DNA que varie entre 61 a 71 mol % (LÉVY-FRÉBAULT; PORTAELS, 1992). O alto conteúdo de lipídios complexos presentes em sua parede celular não permite que as micobactérias sejam coradas pelos corantes comuns, mas possibilita a retenção da fucsina, impedindo-a de ser removida pelo álcool (agente descolorante), característica essa denominada de álcool-ácido-resistência. Embora o método de Gram não imprima uma boa coloração a esse gênero, geralmente se diz que as micobactérias são gram-positivas (PFYFFER; BROWN-ELLIOT; WALLACE JR., 2003).

Com o advento de técnicas bioquímicas e moleculares para cultura e identificação (PFYFFER; BROWN-ELLIOT; WALLACE JR., 2003), o número de micobactérias descritas tem aumentado constantemente sendo que, até o presente momento, existem 163 espécies descritas no gênero *Mycobacterium* (EUZÉBY, 2013), as quais podem ser classificadas como patógenos obrigatórios, patógenos oportunistas e saprófitas (PFYFFER; BROWN-ELLIOT; WALLACE JR., 2003).

Dentre os patógenos obrigatórios têm-se os componentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, no qual estão inseridas as principais espécies de importância epidemiológica para o ser humano, quais sejam o *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium Canetti* (PFYFFER; BROWN-ELLIOT; WALLACE JR., 2003). Entre as micobactérias causadoras da tuberculose, o *Mycobacterium bovis* é uma espécie de considerável importância em animais, visto que, dentre os patógenos conhecidos, é um dos que infecta o maior espectro de hospedeiros diferentes (O'REILLY; DABORN, 1995). Além disso, é um patógeno de relevância pelas reduções que causa na produção de leite e carne e pelo aumento do esforço reprodutivo necessário no animal infectado (ZINSSTAG et al., 2006).

As micobactérias oportunistas e saprófitas, por sua vez, são também conhecidas como micobactérias não tuberculosas (MNT), micobactérias atípicas ou micobactérias outras que não o bacilo da tuberculose. São microrganismos de vida livre e usualmente são encontradas em ambientes como lagos, rios e solo úmido (PFYFFER; BROWN-ELLIOT; WALLACE JR., 2003); embora não possam ser considerados microrganismos aquáticos (COLLINS; GRANGE; YATES, 1984). Podem ser encontradas também na areia e em água estagnada (COLLINS; GRANGE; YATES, 1984).

Atualmente, sabe-se que as micobactérias não tuberculosas são transmitidas pelo ambiente, através de diversas vias, incluindo a ingestão de alimentos (KONUK et al., 2007). Esses microrganismos têm sido isolados de diversos tipos de alimentos, como por exemplo, carne, água, vegetais, frutas e peixe além de leite e produtos lácteos (HOSTY; McDURMONT, 1975; MEDIEL et al., 2000; CHANG et al., 2002). No entanto, a importância do achado de micobactérias não tuberculosas em alimentos de forma geral e em amostras de lácteos precisa ser melhor estudada. É importante considerar que as infecções que possuem como agente etiológico micobactérias não tuberculosas causam morbidade e mortalidade em pessoas que possuem o sistema imunológico frágil e é por esse motivo que o papel dos produtos lácteos como possíveis fontes de infecções por esse tipo de agente tem ganhado importância (KONUK et al., 2007). Neste contexto, autores citam a necessidade de se conhecer melhor as fontes de infecção e rotas de transmissão das micobactérias não tuberculosas aos seres humanos (YODER et al., 1999).

Ainda sobre a importância das MNT para a saúde humana, Falkinham (2003) cita que a prevalência de doenças causadas por micobactérias não tuberculosas irá aumentar considerando não apenas o aumento do número de pessoas susceptíveis a esse tipo de infecção, mas também o fato dessas bactérias estarem presentes nos mesmos lugares que o homem. Wagner e Young (2003) relatam que o advento da epidemia de AIDS e a introdução de terapias imunossupressoras são responsáveis por aumentar a incidência de doenças causadas pelas MNT, o que tem feito com que sejam reconhecidas como patógenos importantes. Além disso, existem trabalhos que mostram evidências de que as doenças transmitidas por micobactérias de crescimento rápido (como *M. fortuitum*) têm aumentando também em indivíduos imunocompetentes (HOWARD; BYRD, 2000).

As micobactérias atípicas causam um amplo espectro de doenças que variam desde infecções localizadas, afetando diversos órgãos, até doenças disseminadas. Além disso, a maioria desse tipo de micobactéria é resistente ao tratamento convencional para tuberculose e é sensível a diferentes drogas, sendo que o tratamento pode envolver remoção cirúrgica (HOWARD; BYRD, 2000). Atualmente, já se reconhece que alimentos, além de água e leite, podem carrear micobactérias não tuberculosas devido ao seu caráter ubiquitário e apesar de seu papel exato nesses produtos ainda não estar bem esclarecido (DING et al., 2006), alguns autores citam que as micobactérias não tuberculosas são transmitidas, entre outros modos, pela ingestão (COLLINS; GRANGE; YATES, 1984), via de entrada comum a todos os patógenos que causam doenças gastrointestinais. Outro dado que suporta essa idéia refere-se ao fato de que as MNT são encontradas nas fezes de pessoas saudáveis sugerindo também que alimentos e água potável podem ser considerados fontes de ingestão (VAEREWIJK et al., 2005).

2.2 MICOBACTERIAS: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

2.2.1 Isolamento

O isolamento de micobactérias de amostras clínicas pode ser realizado em diversos meios de cultura (KONEMAN, 2001). A variedade de meios e métodos existentes atualmente permite que os laboratórios façam a melhor escolha, adequando-a a suas necessidades (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003). Existem meios de cultura à base de ovos (também ditos não seletivos), à base de Agar, meios seletivos (que utilizam antimicrobianos) e outros sistemas mais elaborados de detecção e isolamento de micobactérias (KONEMAN, 2001; PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003).

No entanto, apesar de existirem meios líquidos bastante utilizados por melhorarem a rapidez do resultado, como o Middlebrook 7H9, sabe-se que, ainda hoje, é necessária a incubação complementar em meio sólido visto que esse procedimento fornece informações sobre a morfologia da colônia além de permitir o crescimento de espécies que não crescem nos meios líquidos (KONEMAN, 2001).

Dentre os meios sólidos, os meios à base de ovos possuem boa capacidade tamponante além de permitirem o crescimento da maioria das micobactérias (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003). Esses meios são compostos de ovos inteiros ou gema de ovo, fécula de batata, sais e glicerol; ingredientes adequados ao ótimo crescimento dos representantes do gênero *Mycobacterium* (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003), além de possuírem um corante capaz de inibir a flora contaminante (verde malaquita). Exemplos desse tipo de meio de cultura são os meios de Petragnani e Lowenstein-Jensen (KONEMAN, 2001), sendo este último muito utilizado em laboratórios clínicos, mas que é excelente em recuperar *M. tuberculosis* em detrimento de outras espécies (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomenda a semeadura concomitante nos meios de cultura Löwenstein-Jensen e Stonebrink-

Leslie para o isolamento de qualquer bactéria do gênero *Mycobacterium* (BRASIL, 2002). No entanto, sabe-se que o meio mais favorável para o crescimento de *M. bovis* contém piruvato a 0,4% e não contém glicerol (KONEMAN, 2001), visto que esse bacilo apresenta crescimento no meio Lowenstein-Jensen sem piruvato, mas cresce consideravelmente menos quando o glicerol é adicionado (ROWE; DONAGHY, 2008). Quando se substitui o glicerol por piruvato, no entanto, observa-se que o *M. bovis* tem seu crescimento estimulado (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003), motivo pelo qual esse sal é adicionado nos meios de cultura que buscam recuperar esse agente, especificamente.

As micobactérias são organismos de crescimento relativamente lento (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003) e variável de acordo com os diferentes tipos de meio de cultura utilizados. O tempo médio de isolamento de micobactérias em meios à base de ovos é 21 dias, podendo variar desde 3 a 5 dias até 60 dias dependendo da espécie (KONEMAN, 2001).

Com relação à temperatura de incubação, a maioria das culturas requer entre 35 e 37°C, mas a temperatura ótima necessária pode variar desde menos de 30°C até 45°C (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003). Especificamente para o *M. bovis*, recomenda-se que o tempo de incubação seja de 30 a 90 dias visto que esse bacilo cresce lentamente em meios de cultura artificiais (BRASIL, 2006) e que a temperatura de incubação seja de 37°C (KONEMAN, 2001). Corrêa e Corrêa (1992) também sugerem que o cultivo seja feito por 90 dias, pois referem que ao redor de 10% das amostras de *M. bovis* só apresentam colônias visíveis após 60 dias de cultivo.

O elevado tempo de incubação necessário para o crescimento de grande parte das espécies de micobactérias torna essencial a seleção de métodos apropriados de pré-tratamento e processamento, além da escolha de meio de cultura e condições de incubação adequados para otimizar a recuperação dos bacilos (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003).

Para evitar a proliferação de uma variedade de microrganismos acompanhantes, os quais podem atrapalhar o isolamento das micobactérias, deve ser realizada, no processamento de amostras passíveis de conter microbiota

bacteriana, uma etapa de descontaminação (KONENAM, 2001; PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003). Para este fim, existem diversos tipos de agentes descontaminantes que podem ser utilizados (CORNER; TRAJSTMAN; LUND, 1995), sendo o mais comum o hidróxido de sódio (NaOH) (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003). Corner, Trajstman e Lund (1995) referem que o agente de descontaminação ideal não deveria interferir na viabilidade da micobactéria na amostra e, ao mesmo tempo, deveria matar todos os microrganismos contaminantes. Entretanto, embora relativamente resistentes aos agentes químicos, sabe-se que todos os descontaminantes são tóxicos em algum grau para o *Mycobacterium* spp. (CORNER; TRAJSTMAN; LUND, 1995).

Comparando os quatro agentes descontaminantes mais utilizados nos Laboratórios Australianos de Diagnóstico Veterinário, os autores elegeram em seu trabalho, o HPC (Hexa-Cetil-Piridinio) como agente de escolha devido à baixa toxicidade para *M. bovis* devendo ser usado em concentrações que variam desde 0,075% a 0,75% em amostras de alto risco, ou seja, aquelas que possuem, com grande chance, altas contaminações. Além disso, a toxicidade do HPC para o *Mycobacterium tuberculosis* é considerada tão baixa que estudos mostram que o número relativo de bacilos não diminuiu mesmo após exposição de 8 dias ao agente na concentração final de 0,5%, sugerindo que o agente pode ser recomendado para a descontaminação de amostras enviadas pelo correio (SMITHWICK; STRATIGOS; DAVID, 1975).

Uma das etapas necessárias no isolamento de micobactérias é a centrifugação que visa a sedimentar os bacilos, concentrando-os. Um detalhe importante nesse procedimento é referente à força aplicada durante essa etapa. Rickman e Moyer (1980) relatam em seu trabalho que um isolamento ótimo de micobactérias em cultura ocorre quando se aumenta a força centrífuga de 1260 g para 3000 g, sendo a última um valor adequado para o bom isolamento dos bacilos (KONEMAN, 2001).

Por fim, deve-se considerar a possibilidade de semear, além do pellet formado na centrifugação, a gordura suspensa. Embora não haja diferença estatisticamente significativa, Dundee et al. (2001) relatam que foi possível recuperar um maior número de células de *M. avium paratuberculosis* da gordura formada

(17,3%) do que do pellet (6,3%) utilizando o método de descontaminação denominado CB-18 (Método de Carboxipropilbetaina).

Até o momento, não existe uma metodologia oficial padronizada para a pesquisa de *Mycobacterium bovis* em matriz alimentar (STARIKOFF, 2011), o que dificulta as pesquisas nessa área. Além disso, no Brasil, os laboratórios de modo geral não realizam pesquisa desse bacilo rotineiramente, prejudicando a obtenção de dados a respeito do isolamento do agente e sobre a doença causada por *M. bovis* em humanos. Por outro lado, atualmente a necessidade de se diferenciar os principais agentes do complexo *M. tuberculosis* tem ganhado importância, visto que o *M. bovis* é naturalmente resistente à pirazinamida, um dos medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose (SOBRAL et al., 2011).

Considerando que os métodos tradicionais de isolamento podem ser demorados, tem-se utilizado cada vez mais os métodos moleculares como diagnóstico primário da presença de micobactérias, embora o cultivo ainda seja o padrão ouro (COLLINS, 2011).

2.2.2 Caracterização molecular das micobactérias

Durante os últimos anos, muitos métodos moleculares têm sido desenvolvidos com diversas finalidades, inclusive identificação de espécies (COLLINS, 2011; SOINI; MUSSER, 2001). A principal vantagem desses métodos é a redução do tempo de diagnóstico, que de semanas passa a ser de dias (SOINI; MUSSER, 2001).

A reação de polimerização em cadeia (PCR) é uma técnica altamente sensível através da qual pequenas quantidades de DNA ou RNA podem ser amplificadas com o uso de enzimas a uma quantidade que permita que esse material genético alcance um limiar de detecção (PERSING, 1991). É uma tecnologia que tem desempenhado um papel importante em muitos laboratórios para determinar ou confirmar a identificação das espécies após cultura (COLLINS, 2011).

Várias modificações da técnica de PCR encontram-se disponíveis na atualidade. Uma delas é a PCR multiplex, técnica na qual são inseridos múltiplos pares de *primers* para diferentes regiões-alvo do DNA na mesma reação (KONEMAN, 2001; SETTANNI; CORSETTI; 2007). A técnica de PCR multiplex é utilizada em muitos campos da microbiologia para se obter a rápida diferenciação das espécies de microrganismos sem comprometer a precisão (SETTANNI; CORSETTI; 2007). Geralmente essa técnica utiliza como alvo o gene 16S rRNA, que é o mais utilizado para inferir proximidade filogenética entre bactérias (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

Uma das técnicas de PCR multiplex aplicada às micobactérias (PCR TB multiplex) utiliza como base *primers* para esse gene, permitindo a identificação do gênero *Mycobacterium*, bem como a distinção entre o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e as principais micobactérias oportunistas, isto é, *M. avium* e *M. intracellulare* (WILTON; COUSINS, 2007). Para isso utiliza um total de 6 *primers*, sendo que dois deles (Mycgen F e Mycgen R) amplificam uma região específica para o gênero *Mycobacterium* cuja sequência varia muito pouco entre as espécies de micobactérias. A combinação de todos esses 6 *primers*, em pares, gera bandas de tamanhos específicos que permitem a diferenciação da espécies e/ou complexos (WILTON; COUSINS, 2007). Neste caso, os *primers* TB1-F e TB1-R geram uma banda que corresponde ao Complexo *M. tuberculosis*; os primers Mycav-R e Mycgen-F geram banda que identifica o Complexo *M. avium* e o par Mycint-F e Mycgen-R identifica o *M. intracellulare*.

As espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium Canetti*, pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*, são geneticamente muito similares (possuem 99,9% de similaridade a nível nucleotídico) o que impossibilita a diferenciação desses membros através da técnica de PCR (ROWE; DONAGHY, 2008). Desse modo, no que se refere especificamente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, as técnicas mais conhecidas de diferenciação entre suas espécies são RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis*), *spoligotyping* e a técnica denominada MIRU-VNTR (*Micobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats*) (ZAMANI et al., 2013).

A técnica de RFLP que usa a sequência repetitiva IS6110 (de 1.355 pares de base) como probe é considerada o padrão ouro para identificar as espécies do complexo *M. tuberculosis*. Essa sequência de inserção é repetitiva e encontrada apenas nos membros deste complexo, sendo que suas espécies apresentam variabilidade no número de cópias da mesma (que varia de 0 a 25) e na posição cromossomal delas (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003). Por exemplo, enquanto o *M. tuberculosis* possui até 19 cópias, o *M. bovis* possui apenas entre 1 e 5 (VAN SOOLINGEN et al., 1991). A técnica fundamenta-se nas etapas de digestão do DNA genômico e sondagem com um marcador específico através de técnicas de *Southern blotting*. A combinação das enzimas de restrição utilizadas e a sequência de DNA das probes permite que os polimorfismos do DNA genômico sejam visualizados (HARRIS, 2006).

O método de *spoligotyping*, também denominado *spacer oligotyping*, por sua vez, baseia-se no polimorfismo do locus denominado DR (direct repeat) (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003). Esse locus único é composto de uma série de 43 sequências DR idênticas, cada uma com 36 pb entre as quais existem regiões que de 35 a 41 pb (KAMERBEEK et al., 1997). Essa região também está presente em todos os membros do complexo e as espécies são diferenciadas com base nas variações do número de elementos de 36 pb repetidos e na presença ou ausência de alguns espaços (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003).

Por fim, a técnica de MIRU-VNTR baseia-se na variação do número de repetições de uma determinada sequência genética (denominada tandem) de unidades repetitivas e interespaçadas do DNA de micobactérias (HARRIS, 2006). Os isolados são tipificados através da determinação do número de cópias de unidades de repetição específicas que variam entre 52 a 77 nucleotídeos, em vários locus MIRU-VNTR dispersas pelo genoma. Nessa técnica, o número de unidades repetidas, dentro de um locus específico, é determinado pela amplificação do locus inteiro ao que se segue a eletroforese. O número de repetições é determinado com base no tamanho dos amplificadores obtidos na PCR (HARRIS, 2006). Os resultados são transformados numa tabela numérica com informações sobre o número de unidades repetidas em cada locus. O MIRU-VNTR é uma técnica específica baseada em 12 locus de um tipo de sequência VNTR que são denominadas de MIRU. Considerando que o locus apresenta entre 2 a 8 alelos, é possível que se

obtenha 16 milhões de combinações diferentes, o que faz com que o método tenha um alto poder de discriminar as espécies (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003).

Por fim, no núcleo do desenvolvimento tecnológico, encontra-se a técnica de sequenciamento de DNA, processo que gera informação capaz de ser usada para distinguir rapidamente microrganismos ao nível de espécie ou para diferenciar cepas entre indivíduos de mesma espécie (COLLINS, 2011).

Essa outra técnica que é utilizada para identificar bactérias é comumente conhecida por reação de sequenciamento nucleotídico. O sequenciamento do DNA é um método comum de análise pós amplificação utilizado para identificar com sucesso bactérias, micobactérias e fungos (KONEMAN, 2001). O sequenciamento de DNA tradicional, conhecido como método de Sanger, descrito por Sanger; Nicklen; Coulson (1997), ou método de terminação de cadeia, tem cada vez mais sido aplicado em laboratórios de microbiologia molecular e patologia molecular (KONEMAN, 2001).

Nos últimos 25 anos, as técnicas envolvendo a análise do rRNA e de seu gene codificador têm revolucionado a taxonomia dos microrganismos procariotos. Isso se dá devido ao fato do gene que codifica essa molécula ser altamente conservado devido ao papel desempenhado por ela nos seres vivos. Por serem moléculas grandes e que contêm um nível de informação genética considerável, elas têm sido escolhidas como base para a realização de reconstruções filogenéticas, dentro do grupo dos procariotos. As moléculas de rRNA são classificadas pela sedimentação durante a ultracentrifugação em 23S, 16S e 5S as quais possuem cadeias de comprimento em nucleotídeos de respectivamente 3300, 1650 e 120 nucleotídeos (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001). Os genes que codificam essas subunidades ribossômicas constituem os alvos genéticos mais utilizados para a identificação de microrganismos baseado na sequência (KONEMAN, 2001). Atualmente, a grande quantidade de sequências do gene 16S rRNA depositadas em bancos genômicos faz com que o sequenciamento desse gene seja rotineiro e popular (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001). Além desse gene, outros têm sido estudados como alvos de sequenciamento genético, tais como hsp 65, dnaJ, rpoB, dentre outros (PHYFER; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2003).

2.3 TRANSMISSÃO ALIMENTAR: *MYCOBACTERIUM BOVIS* E OUTRAS MICOBACTÉRIAS

A tuberculose bovina, causada pelo *Mycobacterium bovis*, é uma zoonose relevante que pode ser transmitida aos seres humanos através de duas formas principais: a ingestão de leite cru e derivados, e a inalação de partículas infecciosas (THOEN AND BARLETTA, 2005).

Atualmente, tem-se observado um aumento na incidência da localização extrapulmonar de micobactérias, tanto em países desenvolvidos como nos não desenvolvidos, sendo que nos EUA um quinto dos casos de tuberculose é desse tipo. Além disso, a chamada tuberculose extrapulmonar tem se mostrado mais comum após a descoberta da AIDS (HANDA; MUNDI; MOHAN, 2012).

Até o século passado a tuberculose zoonótica, ou seja, causada por *M. bovis*, manifestava-se principalmente em crianças, causando escrofulose (linfadenite cervical), tuberculose intestinal e outras formas extrapulmonares da doença (GRANGE; YATES, 1994). Contudo, a ampla utilização da pasteurização tem tornado a rota digestiva menos importante que a respiratória (THOEN; LoBLUE; KANTOR, 2006), sendo a primeira notória nos locais em que a doença não está controlada nos bovinos e/ou no caso de haver consumo de leite não pasteurizado advindo desses locais (HAJMEER; FUNG, 2006).

O abdômen é o sítio anatômico mais afetado em pacientes com tuberculose extrapulmonar, sendo que a área mais afetada são os linfonodos, seguidos das vísceras e por fim do trato gastrointestinal (SHAO et al., 2012). Dentre as espécies causadoras desse tipo de manifestação, no homem, o *Mycobacterium bovis* é uma das que são reconhecidamente causadoras da tuberculose intestinal primária (YOUNG; CONNOR, 2005).

Vanhoenacker et al. (2004) relatam que a tuberculose do sistema gastrointestinal é uma manifestação rara da doença causada pelas micobactérias do complexo *tuberculosis* e que sua incidência exata não é conhecida. Em adicional,

sabe-se que a tuberculose da válvula íleo-cecal é a forma mais comum desta categoria da doença, ocorrendo em 90% dos casos (VANHOENACKER, 2004).

Na tuberculose gastrointestinal, os bacilos causadores podem atingir o abdômen de várias maneiras. Uma delas é através do consumo de leite infectado com *M. bovis* ou *M. tuberculosis* (VANHOENACKER et al., 2004). O sintoma clínico mais freqüente, nesses casos, é a diarreia, embora febre, suores noturnos, dores e distensão abdominal, anorexia, melena, sangramento retal e perda de peso ocorram com menor frequência; além disso, pode ser palpada uma massa no quadrante inferior direito do abdômen em 25 a 50% dos pacientes (VANHOENACKER et al., 2004; GOLDEN; VIKRAN, 2005).

A infecção tuberculosa na cavidade abdominal cursa com casos em que existe o envolvimento não apenas do trato gastrointestinal, mas também do peritônio (RIDAURA-SANZ; LÓPEZ-CORELLA; LOPEZ-RIDAURA, 2013). Em março de 2004, na cidade de Nova Iorque, um garoto de quinze meses de idade morreu de peritonite tuberculosa, uma forma de tuberculose que afeta o abdômen, causada por *M. bovis*, após ter iniciado o tratamento para a doença. O garoto apresentava como sintomas diarreia e febre (CDC, 2005).

Outra manifestação extrapulmonar comumente associada às micobactérias, entre elas ao *M. bovis*, é a tuberculose dos linfonodos periféricos, também conhecida por escrófula (PHILLBERT; KIM; CHUNG, 2004), uma doença que também pode ser transmitida através do leite (GRANGE; YATES, 1994). Os linfonodos cervicais compõem o sítio mais afetado por essa doença (PHILLBERT; KIM; CHUNG, 2004). As micobactérias não tuberculosas têm sido apontadas cada vez mais como causa de linfadenite (HANDA; MUNDI; MOHAN, 2012); *Mycobacterium scrofulaceum*, *M. avium-intracellulare* e *M. kansasii* são MNT sabidamente causadoras da escrofulose (HANDA; MUNDI; MOHAN, 2012). Apesar do *M. fortuitum* ser considerado raramente causa de linfadenite em adultos e crianças, existe uma descrição de dois casos de indivíduos HIV positivos que apresentaram a doença sendo causada por esse microrganismo (BUTT, 1998). Em 2005, ocorreu um caso desse tipo de tuberculose na Irlanda, país onde a incidência da tuberculose zoonótica, nos bovinos, atinge 5% anualmente. Esse caso fez parte de um surto ocasionado pelo consumo do leite in natura de uma vaca de 7 anos por

uma família residente no sudoeste do país. O animal apresentava mastite tuberculosa e o consumo de seu leite levou ao desenvolvimento de um caso de tuberculose latente em uma criança de 7 anos e um caso de tuberculose ativa num garoto de 4 anos que teve teste de *Mantoux* positivo e aumento em dois linfonodos cervicais (DORAN et al., 2009)

A linfadenite causada por MNT é uma doença tipicamente infantil (HAZRA et al., 1999). A rota de entrada das micobactérias não tuberculosas causadoras da doença é, muito provavelmente, oral e pode estar associada ao hábito infantil de colocar as mãos e objetos na boca (TORTOLI, 2004). Os pacientes podem apresentar ou não aumento progressivo dos linfonodos e alguns deles apresentam sintomas sistêmicos, tais como, febre, perda de peso, fadiga e ocasionalmente suores noturnos. No entanto, tais sintomas são vistos mais frequentemente em pacientes HIV positivos (HANDA; MUNDI; MOHAN, 2012). Quando os nódulos existem, são discretos e firmes, tornando-se flutuantes e drenando espontaneamente caso o paciente não seja tratado (GOLDEN; VIKRAN, 2005).

2.4 *M. BOVIS* E OUTRAS MICOBACTÉRIAS EM PRODUTOS LÁCTEOS

Nos bovinos, é sabido que a infecção primária da tuberculose dá-se pelos tratos respiratório e intestinal (íleo, jejuno e linfonodos drenantes) (COLLINS, 2000). É uma doença significativamente mais prevalente e com maior severidade de lesões encontradas ao abate nos bovinos de raças de exploração leiteira do que em zebus ou mestiços, mesmo sob condições idênticas de criação (BRASIL, 2002).

O consumo de leite não pasteurizado está entre as principais fontes de infecção por *M. bovis* para humanos, juntamente com o consumo de carne incorretamente tratada pelo calor e o contato direto com animais infectados (BELCHIOR, 2001). Um estudo realizado em Minas Gerais no ano de 1999 apontou que 92,9% dos queijos produzidos em 1600 propriedades rurais analisadas eram feitos com leite in natura (BELCHIOR, 2001). Com base nessas evidências, Jorge (2011) realizou um estudo em Mato Grosso do Sul utilizando um rebanho holandês

diagnosticado clinicamente com tuberculose, recuperando 44,4% de micobactérias e 33,3% de *M. bovis* em amostras de leite de vacas aparentemente saudáveis, sustentando a premissa de que o leite pode representar importante fonte de transmissão desse bacilo para o próprio rebanho, outros animais domésticos e para o homem. Contudo, deve-se levar em consideração que estes percentuais caem significativamente quando a avaliação é dada em leite in natura de rebanho sem diagnóstico clínico da doença, a exemplo do estudo de Leite (2003), cuja taxa de positividade foi de apenas 4,3%, reforçando a ideia de que a presença de *M. bovis* depende tanto da prevalência da doença no rebanho quanto da infecção dos úberes e a capacidade de excreção. Outro fator que pode influenciar a ocorrência de casos de *M. bovis* em humanos é o atual crescimento no interesse pelo consumo de queijos artesanais, alguns dos quais são feitos de leite cru (ROWE; DONAGHY, 2008).

Poucos trabalhos relatam a frequência da excreção de *M. bovis* no leite, sendo que acredita-se que apenas 1% das vacas infectadas elimina o bacilo de forma intermitente por essa via (GRANGE; YATES, 1994; CORRÊA; CORRÊA, 1992; ROXO, 1997). Mesmo em estudos em que a coleta do leite foi contínua por 15 dias, o padrão de eliminação das micobactérias no leite teve a mesma característica de irregularidade (PARDO, 2001). Segundo Lake (2002), o *M. bovis* não se multiplica no leite, ou o faz lentamente; mas se sabe que grande quantidade dessas bactérias é eliminada diretamente da glândula mamária infectada para este alimento (LAKE et al., 2009). Além disso, a excreção do agente no leite pode ocorrer antes mesmo do aparecimento de sinais clínicos (EFSA, 2006).

Incriminar os produtos lácteos como causa de tuberculose em humanos é um fato depende de diversas variáveis, dentre elas a prevalência da doença nos bovinos, visto que a maior ou menor ocorrência do bacilo em produtos lácteos depende da quantidade de animais infectados pelo agente. Outro fator igualmente importante é a quantidade de bacilo excretado no leite. A excreção de *Mycobacterium bovis* por um úbere infectado pode variar de 10^2 a 10^5 UFC/mL (BALL, 1943; SINHA, 1994) embora a excreção de micobactérias no leite seja intermitente, sendo que até 30% das vacas infectadas podem eliminar a bactéria no alimento (PEREZ et al., 2002).

Além da excreção de *Mycobacterium* pela glândula mamária, existem outras maneiras do leite e dos derivados lácteos tornarem-se contaminados por micobactérias. A contaminação exógena pode ocorrer através modos, por exemplo pelo contato com excretas de bovinos (fezes, urina, secreções vaginais e uterinas) infectados que eliminam a bactéria via trato gastrointestinal (ROXO, 1997; STEELE; RANNEY, 1958), pela contaminação pós-ordenha, durante o processo de engarrafamento do produto (LEITE et al., 2003) e pelo contato com bacilos provenientes de equipamentos de ordenha sujos e mal lavados (ABRAHÃO, 2005), entre outros modos.

Bacilos viáveis também podem ser encontrados no iogurte e nos queijos cremosos por até 14 dias e, na manteiga, por até 100 dias após a preparação (KLEEBERG, 1984; JORGE, 2011). Sinha (1994) observou que 31,3% das vacas em lactação positivas ao teste de tuberculinização eliminaram o bacilo no leite, mas apenas 4% desses animais excretaram *M. bovis* em quantidade capaz de ser mensurada por cultura. Apesar de a cultura bacteriológica ser o método referência e o teste definitivo para a confirmação da presença das micobactérias, é um procedimento extremamente lento que pode levar até mesmo dois ou três meses para sua conclusão. Além disso, a sensibilidade da cultura não é de 100%, podendo ocorrer culturas falso-negativas. Perdas por contaminação dos cultivos por outros microrganismos e/ou processos de descontaminação à base de ácidos (HCl), álcalis (NaOH) e/ou mucolíticos (duodecil sulfato de sódio - SDS - e N-acetil L cisteína) somado a sucessivas centrifugações implicam sempre em perda da viabilidade celular (SEPKOWITZ et al., 1995; ZANINI, 1998).

Mesmo quando se sabe que a doença ocorre nos animais, como é o caso do Brasil, nem sempre é possível encontrar o agente em amostras de seus produtos. Isso pode acontecer devido a diversos fatores. Um deles é a diluição do agente, em tanques de mistura (FRANCO et al., 2013), o que diminui a chance de isolamento positivo. Outro fator de grande importância é a injúria da célula bacteriana em produtos que sofreram processamento térmico. Nesse contexto, vale ressaltar que as técnicas microbiológicas básicas para detectar presença/ausência de um patógeno em alimentos em geral incluem uma ou mais etapas de enriquecimento da amostra, que podem ser decisivas no resultado, por três motivos. Primeiro, é comum que a população do patógeno esteja abaixo do limite de detecção dos métodos de

quantificação direta. Segundo, as células podem estar injuriadas por causa de processamentos tecnológicos (calor, refrigeração, alteração de pH, de atividade de água etc.), sendo necessária a recuperação das injúrias para reativação metabólica essencial à multiplicação. Além disso, normalmente estão acompanhados por alta carga de microrganismos competidores que precisam ser inibidos para que o alvo tenha oportunidade de se multiplicar (SILVA et al., 2010).

Para verificar a ocorrência de *M. bovis* em tanques de leite cru de fazendas, na Província de Santa Fé, Argentina, que teve 6 casos de tuberculose humana entre 2006 e 2011 (KANTOR et al., 2008), Zumárraga et al. (2012) coletaram 177 amostras advindas de propriedades com certificação de livres para tuberculose e 80 de criações sem esse certificado. Os pesquisadores obtiveram, através de métodos moleculares (PCR), uma positividade de 44% em amostras de leite advindas de propriedades não certificadas e 38% em amostras provenientes de propriedades certificadas. No entanto, não foi possível o isolamento do agente nos meios de cultura Stonebrink-Leslie e Lowenstein-Jensen.

No Brasil, existem poucos trabalhos a respeito do isolamento de micobactérias do leite de animais (PARDO et al., 2001). Esse grupo realizou a análise de *Mycobacterium* spp. em 780 amostras de leite adquiridas de 52 vacas provenientes de seis diferentes fazendas leiteiras do estado de São Paulo, as quais haviam apresentado reações suspeitas ou positivas para tuberculose ao teste de Stormont's, um tipo de teste intradérmico. Esses autores obtiveram um resultado de 36,54% (19 de 52) das vacas eliminando *Mycobacterium* spp. no leite, sendo que também houve uma intermitência e irregularidade nessa excreção. Todas as vacas que excretaram o *Mycobacterium* no leite eram normais ao exame clínico (não demonstravam mastite clínica). No entanto, 78,95% dos animais que eliminavam o *Mycobacterium* no leite possuíam mastite subclínica, uma frequência elevada. Considerando que os autores submeteram à identificação apenas colônias que possuíam crescimento mais característico, apenas um animal dos 19 excretou *M. bovis* no leite (resultado obtido através da metodologia de *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC). Entretanto, mesmo que o leite de 15 dos 19 animais não tenha apresentado crescimento bacteriano característico, esses animais haviam reagido positivamente ao teste de Stormont's o que reforça a possibilidade de serem animais excretadores. Além disso, os autores isolaram também *M. fortuitum* e *M.*

avium. Outro trabalho em que ocorre uma situação semelhante é o de Kahla et al. (2011) no qual obteve-se um isolamento positivo (por cultura) no leite de apenas 5% de um total de 102 vacas positivas ao teste intradérmico cervical, na Tunísia.

Leite et al. (2003) coletaram amostras de leite de diversos supermercados varejistas do Estado de São Paulo as quais incluíram 78 amostras de leite cru, 40 de leite pasteurizado e 10 de leite esterilizado pelo processo UHT (*Ultra High Temperature*), totalizando 128 amostras. No laboratório, as amostras sofreram descontaminação pelo método do ácido oxálico e foram cultivadas em meios Stonebrink-Leslie e Lowenstein-Jensen ao que se seguiu a incubação a 30 °C e a 37°C em concentrações de 5 a 10% de gás carbônico (CO₂) por 90 dias. Micobactérias foram isoladas de 18% (23 de 128) amostras de leite. No entanto, após uso de métodos moleculares, a autora encontrou o *Mycobacterium bovis* em apenas 1 dessas 128 amostras de leite. Essa amostra era composta por leite que não havia sofrido processamento térmico e a autora enfatiza em seu trabalho que devemos considerar a possibilidade de investigar o grau de prevalência do *M. bovis* em outras regiões do país uma vez que aproximadamente 50% do leite consumido no Brasil não é pasteurizado, ou seja, os consumidores desse leite estão sob risco de infecção por esse agente. A autora obteve ainda 22,5% de positividade para micobactérias não tuberculosas em leite pasteurizado e 16,7% em leite cru isolando as espécies *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. kansasii* e *M. gordonae* além de outras não identificadas. Não houve positividade nas amostras de leite esterilizado.

Com relação ao leite da espécie bubalina, existem dois trabalhos recentes, um realizado no Nepal e outro no Brasil, sendo que o grupo estrangeiro conseguiu isolar *M. bovis* tanto em amostras de leite, como em amostras de fezes de bovinos e bubalinos, caracterizando as espécies não tuberculosas através da reação de seqüenciamento do gene *rpoB*. Entre as espécies encontradas em amostras de búfalos estão *M. kansasii* em leite e *M. fortuitum* em leite e fezes. É importante relatar, no entanto, que os animais testados haviam sido selecionados por apresentarem reações positivas em testes intradérmicos (VIJAY et al., 2007). O trabalho brasileiro, por sua vez, isolou MNT em 5 amostras de leite de 23 amostras extraídas de bubalinos de uma importante fazenda do estado de São Paulo. Algumas das espécies isoladas pelo grupo foram: *M. kansasii*, *M. gordonae* e *M.*

lentiflavum as quais foram caracterizadas através da tecnologia de HPLC (determinação de ácidos micólicos) (JORDÃO-JR et al., 2009).

Com relação ao isolamento de *Mycobacterium bovis* em queijos, alguns trabalhos focados na epidemiologia da doença têm motivado a realização de estudos buscando isolar o agente nessa matriz alimentar. Dankner e Davis (2000) realizaram uma atualização da tuberculose, causada por *M. bovis*, em crianças na região de São Diego – Baixa Califórnia – entre os anos de 1980 e 1997. Nesse trabalho, os autores concluíram que o *M. bovis* foi o responsável por 10,8% dos casos de tuberculose em crianças sendo a maioria dos pacientes de origem Hispânica (90,2%) e tendo casos de doença extrapulmonar (95,1%). Em 2001, Besser et al. realizaram um estudo de caso controle com crianças cujo resultado do teste de Mantoux era positivo. O estudo analisou vários fatores de risco tais como serem estrangeiros, terem recebido a vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin) e terem consumido produtos lácteos crus. A análise univariável permitiu estabelecer a relação dos casos com esses fatores de risco, embora o modelo multivariável não tenha permitido uma associação entre o consumo de lácteos crus e o resultado positivo no teste de Mantoux. No entanto, os autores alegam que possa ter havido uma interferência da vacinação com BCG e justifica uma possível associação baseada nos trabalhos de Dankner e Davis (2000). Para reforçar essa hipótese, o trabalho de LoBlue et al. (2003) comparou características da infecção por *M. bovis* com as características da infecção por *M. tuberculosis* dos casos notificados em São Diego. Esse trabalho demonstrou uma ocorrência alta da tuberculose causada por *M. bovis* em sítios extrapulmonares, particularmente no abdômen, o que ocorreu com frequência 9 vezes maior do que nos casos de infecção por *M. tuberculosis*. Os autores, então, sugerem que a transmissão de *M. bovis* esteja ocorrendo através do consumo de produtos lácteos não pasteurizados.

Em Nova Iorque, entre os anos de 2001 a 2004 ocorreram 35 casos de tuberculose causados pelo *M. bovis*. Desses, 48% ocorreram em crianças de até 15 anos, 57% ocorreram em indivíduos nascidos no México e 60% dos casos tiveram o envolvimento de sítios extrapulmonar. Em entrevista com 23 dos 35 casos, 83% relataram consumo de queijos produzidos no México (CDC, 2005).

Então, para que se investigasse a possibilidade de transmissão de *M. bovis* (e outros agentes biológicos) através de queijos frescos advindos do México, dois grupos de pesquisa publicaram trabalhos complementares, no ano de 2007. Um deles foi o grupo de Kinde et al. (2007). Esse grupo procurou a ocorrência de diversos patógenos, entre eles *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium* spp., em queijos que atravessaram a fronteira do México com os EUA através de comércio ilegal. Para isso, realizaram-se entrevistas com viajantes que se deslocavam entre essa fronteira, em San-Ysidro/São Diego. Para isso, realizaram-se entrevistas com viajantes que atravessavam a fronteira dos Estados Unidos com o México, em San-Ysidro/São Diego. Os agentes verificaram informações a respeito do tipo de queijo, onde foi adquirido e qual era a intenção de uso do produto. Além disso, o grupo realizou a coleta de amostras de queijos transportados pelos viajantes. As amostras foram processadas para a pesquisa de diversas bactérias, entre as quais o *Mycobacterium* spp. e para a verificação da realização ou não de pasteurização. Para essa análise, o grupo enviou as amostras para o Mycobacterial Laboratory, National Veterinary Services Laboratories (Ames, Iowa) liderado pelo grupo de Harris et al. que em 2007 publicou um trabalho de identificação das espécies encontradas.

O grupo de Kinde et al. (2007) relatou, em seu trabalho, que os tipos de queijo mais comumente encontrados foram fresco, seco, ranchero, cotija, panela, oaxaca, quesadilla, e asadero. Verificou-se que 93% dos queijos não tinha rotulagem adequada e dos 23 que tinham, apenas um tinha a informação de ter sido pasteurizado. Os queijos haviam sido obtidos na Baixa Califórnia (19%) e em outros estados mexicanos. Apenas 1% dos indivíduos que responderam ao questionário indicou que iria vender o queijo e grande parte assinalou que seria para consumo próprio. O teste de pasteurização, por sua vez, detectou que leite cru havia sido usado na produção de 94% desses queijos. Os testes referentes à pesquisa de micobactérias, realizados por Harris et al. (2007), em 203 amostras de queijos enviadas pelo grupo de Kinde et al. (2007), revelou a presença de 10 amostras (4,9%) contendo *Mycobacterium* spp., sendo que 9 dessas 10 amostras continham micobactérias não tuberculosas (cinco *M. fortuitum*, uma pertencente ao complexo *M. fortuitum*, uma *M. moriokaense* e uma sem identificação de espécie) e uma continha *M. bovis* (queijo fresco). A descontaminação das amostras obtidas havia

sido realizada com o método da acetilcisteína NaOH e o pellet obtido havia sido inoculado em meios líquidos BACTEC 12B e BBL MGIT 960, adicionados de antibióticos. Após incubação, as colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos e ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, segundo métodos padronizados. As 10 amostras das quais se isolou o gênero *Mycobacterium* foram recuperadas de diversas variedades de queijo, inclusive de tipos de queijo duro (para ralar), queijos semi-duros e de diversos tipos de queijos macios.

Outro ponto importante desse trabalho foi a realização de uma pesquisa para saber se a cepa de *M. bovis* recuperada do queijo era relacionada com cepas recuperadas de animais na América do Norte. Como resultado, obteve-se que o isolado de *M. bovis* do queijo, originado no México, era muito similar a 3 isolados de *M. bovis* recuperados de bovinos de origem mexicana que adentraram os EUA. No entanto, nenhum link epidemiológico direto pode ser feito para que se tivesse certeza da origem comum dessas 3 cepas (HARRIS et al., 2007). Por fim, o grupo de Kinde et al. (2007) cita que, apesar da existência de normas para a importação de queijos para venda, muitos casos de comércio ilegal de queijo têm sido registrados na Califórnia. Estimando-se em um ano, 75 milhões de quilogramas de queijo são importados através de portas não comerciais nas fronteiras da Califórnia, o que representa um sério risco à saúde pública, uma vez que a maioria desses queijos é feita com leite não pasteurizado.

Para os autores o isolamento de *Mycobacterium bovis* em uma amostra não é surpreendente, pois a doença é um problema comum nos animais leiteiros na maioria dos estados mexicanos com uma prevalência a nível de abatedouro de 16% de lesões de tuberculose nesses animais (MILIAN-SUAZO et al., 2000). Além disso, o isolamento de micobactérias não tuberculosas em queijos semi-duros também não surpreende, uma vez que não se conhece, até o momento, a cinética de morte desses microrganismos durante a cura de queijos, não sendo possível que se estipule um período de maturação a partir do qual o queijo feito de leite cru se torne um alimento seguro e isento de microrganismos potencialmente patogênicos. No Brasil, os primeiros passos nesse sentido ainda estão sendo dados, enquanto em outros países pesquisas para determinar esse período já vem sendo feitas. Nesse aspecto, Hammer e Babel (1957) determinaram que queijos cheddar infectados por *Mycobacterium tuberculosis* estavam, ainda, infectantes após 220 dias de cura,

enquanto Kastli e Binz (1949) determinaram tempos de sobrevivência de *M. bovis* de 22 dias em queijo suíço e de 305 dias em queijo semi-duro. No Brasil, Starikoff (2011) também estudando a inativação de *M. bovis* em queijos parmesão contaminados experimentalmente, observou uma redução média de 1,36 log UFC/g de *M. bovis* durante um período de 63 dias, sendo que ao final do estudo, os queijos ainda tinham uma contaminação próxima de 4 log UFC/g. Desse modo, a autora sugere que o estudo seja aprofundado visto que a cura por 60 dias pode não permitir a redução do bacilo a níveis seguros. Todos esses trabalhos mostram a falta de fundamento científico no tempo proposto pela legislação brasileira de cura para queijos feitos com leite cru e no tempo realmente praticado no país. Nossa legislação exige um tempo de cura de mínimo 60 dias (BRASIL, 1996), ao passo que existem variedades de queijo, no país, como os queijos Minas artesanais (por exemplo, queijo da Serra da Canastra e do Serro), que são fabricados com tempo de maturação ao redor de 20 dias (PERRY, 2007) fato esse que pode trazer riscos à saúde dos consumidores desses produtos.

O trabalho mais recente realizado para verificar a presença de *M. bovis* em queijos mexicanos foi realizado por Martín-Herrera et al. (2013). O grupo realizou coleta de 60 amostras de queijo vendidas em mercados por comerciantes registrados pelas autoridades sanitárias. Dessas amostras, apenas uma apresentou *M. fortuitum*, não sendo isolado *M. bovis*. Os autores citam que a contaminação pode ter ocorrido em qualquer ponto da cadeia de produção ou, ainda, durante a venda desse produto no mercado.

Por fim, a literatura a respeito do isolamento de micobactérias em queijos no Brasil é escassa. Um dos poucos trabalhos, realizado por Vialta et al. (2003), pesquisando produtos lácteos clandestinos apreendidos no estado de São Paulo, encontrou 22,7% de positividade (25 de 110 amostras de leite e queijo) pela técnica de PCR para o DNA de *Mycobacterium bovis*, embora o trabalho não tenha conseguido isolar o agente em nenhuma delas. O que dificulta a realização de trabalhos em nosso país são a baixa prevalência da doença (BRASIL, 2002) aliada à intermitência e irregularidade na excreção do agente no leite (PARDO et al., 2001) e à falta de uma técnica adequada para o isolamento de *M. bovis* em lácteos (STARIKOFF, 2011).

3 OBJETIVOS

Considerando a importância da tuberculose no cenário mundial, atualmente, e a possibilidade de sua transmissão através do consumo de produtos de origem animal lácteos consumidos crus, o presente trabalho possui como objetivos verificar a ocorrência de *Mycobacterium bovis* e outras micobactérias em queijos minas meia cura vendidos nas feiras-livres da cidade de São Paulo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM E COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 161 amostras de queijo minas meia cura (100 a 200 g) em feiras-livres das 5 regiões da cidade de São Paulo (Norte, Sul, Leste, Oeste e Centro) entre abril de 2012 e março de 2013. As amostras foram identificadas e transportadas em sacola térmica com gelo até o Laboratório de Higiene Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LHA – FMVZ/USP), onde permaneceram em geladeira até início da análise.

4.2 DESCONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram homogeneizadas com solução salina 0,85% (25g: 225 mL) e, então, 2 mL foram submetidos à descontaminação em tubos *falcon*, pelo método HPC 1,5% (cloreto de hexa-cetil-piridínio) (CORNER; TRAJSTMAN; LUND, 1995). Após 30 minutos, foi realizada a centrifugação a 3000 g por 20 minutos (KONEMAN, 2001).

4.3 SEMEADURA DAS AMOSTRAS

O sedimento e a gordura formados após a centrifugação foram então misturados, desprezando-se a fase líquida. Procedeu-se a re-suspensão em 1 mL de salina 0,85% com Tween 80 0,05% e homogeneização para dissolução máxima do pellet. Em seguida, 0,1 mL (100 µL) da mistura foi semeada, em triplicata, em meio Stonebrink-Leslie (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES, 1972). Os tubos e garrafas de cultivo foram então incubados em estufa a 37° C por 90 dias. Todas as colônias que cresceram no meio de cultura, sem deteriorá-lo, foram consideradas suspeitas e submetidas às técnicas moleculares.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS MICOBACTÉRIAS

Para a identificação dos isolados foram utilizadas duas provas moleculares. Inicialmente, foi utilizada a reação PCR TB multiplex (WILTON; COUSINS, 2007), que discrimina genes do gênero *Mycobacterium* spp., bem como os genes que caracterizam os complexos *M. tuberculosis*, *M. avium* e o *M. intracellulare*. Quando, através dessa técnica, houve a identificação do gene que representa o gênero, mas não dos genes da espécie/complexos citados, o isolado foi submetido ao sequenciamento dos genes do ácido ribonucléico ribossomal (16S rRNA).

4.4.1 Amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação do material genético foi realizada a técnica descrita por Wilton e Cousins (2007), denominada PCR TB Multiplex. Para isso, foi feita inicialmente a extração de DNA através da técnica do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), descrita por Kremer et al. (1999).

4.4.1.1 Extração de DNA (KREMER et al., 1999)

Retirou-se uma alçada de massa bacteriana de cerca de 50 mg de cada colônia que foi transferida para tubos contendo 400 µL de tampão (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA - pH 8,0 -TE). Procedeu-se sua homogeneização e incubação a 80°C por 20 minutos (BEMER-MELCHIOR; DRUGEON, 1999). Em seguida, adicionou-se 50 µL de lisozima a 10 mg/mL e realizou-se homogeneização e incubação a 37°C *overnight*.

No dia seguinte, acrescentou-se 75 µL de uma solução de proteinase K/SDS ao que se seguiu a homogeneização e incubação a 65°C por 10 minutos. Prosseguiu-se com a adição de 100 µL de NaCl (5 M) e 100 µL de solução

CTAB/NaCl pré aquecida a 65 °C. Essa mistura foi homogeneizada e incubada novamente por 10 minutos a 65°C. Em seguida, acrescentou-se 750 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1), agitou-se e centrifugou-se a 12000 g por 7 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 450 µL de isopropanol (2-propanol) e resfriado a -20°C por 30 minutos. Realizou-se nova centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos seguida de desprezo do sobrenadante resultante. O sedimento foi, então, lavado com 1000 µL de etanol gelado a 70%, ao que se seguiu nova centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos e novo desprezo do sobrenadante formado. Por fim, o sedimento foi secado a 56°C por 10 minutos e redissolvido em 50 µL de TE (Tris-EDTA) permanecendo estocado a -20°C até o uso. Foram inclusos controles negativos, a cada quatro amostras, e um controle positivo (cepa de referência AN5 de *Mycobacterium bovis*, cedida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas – LZB).

4.4.1.2 PCR TB Multiplex (WILTON; COUSINS, 2007)

Para amplificação do DNA, a partir do produto extraído, realizou-se a técnica de reação PCR TB multiplex descrita por Wilton e Cousins (2007). Para isso, adicionou-se 5 µL de DNA (obtido em 4.4.1.1) a cada tubo que continha o mix da PCR composta de 1 X PCR Buffer, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato – dNTP, 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 1,5 unidades (U) de Taq polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), água deionizada (miliQ) estéril q.s.p. 50 µL e 0,12 µM de cada *primer* discriminado no quadro 1. Neste processo de amplificação foram inclusos controles negativos, a cada 4 amostras para monitorar eventuais contaminações e um controle positivo (cepa de referência AN5 de *Mycobacterium bovis*, cedida pelo LZB).

Quadro 1 - Descrição dos *primers* utilizados na reação de PCR TB multiplex e sequência 5' → 3' de cada um deles

	Primer	Sequência 5' → 3'
1	MYCGEN-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
2	MYCGEN-R	TGCACACAGGCCACAAGGGA
3	MYCAV-R	ACCAGAAGACATGCGTCTTG

4	MYCINT-F	CCTTTAGGCGCATGTCTTTA
5	TB1-F	GAACAATCCGGAGTTGACAA
6	TB1-R	AGCACGCTGTCAATCATGTA

Fonte: Adaptado de Wilton e Cousins (2007).

A solução preparada foi submetida a 94°C/10 minutos, 61°C/2 minutos e 72°C/3 minutos, seguidos de 33 ciclos de 94 °C/30 segundos, 61 °C/2 minutos e 72°C/3 minutos e finalmente 1ciclo de 94 °C/30 minutos, 61 °C/2 minutos e 72 °C/20 minutos.

Em seguida, realizou-se eletroforese para verificar o peso molecular do fragmento amplificado pela técnica de PCR. Para a corrida do gel misturou-se 5 µL dos produtos amplificados a 2 µL do Juice Loading Buffer (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), analisados mediante eletroforese em gel de agarose a 1,5% para a técnica de PCR TB Multiplex e corados com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram fragmento de tamanho compatível com as descrições contidas no trabalho de Wilton e Cousins (2007) e sumarizadas no Quadro 2. Usou-se como referência o DNA *ladder* de 100 pb. Os géis foram fotografados em equipamento de fotodocumentação Syngene Ingenius Gel Documentation System (Syngene, Frederick, USA).

Quadro 2 - Tamanho do produto esperado, em pares de bases (pb), para cada par de primer amplificador utilizado na reação de PCR TB multiplex. Resultado em gênero, complexo ou espécie indicado pela combinação dos pares de *primers*

Banda 1	Primers Amplificadores	Banda 2	Primers Amplificadores	Gênero/Espécie
1030 pb	1 e 2	372 pb	5 e 6	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
1030 pb	1 e 2	180 pb	3 e 1	Complexo <i>M. avium</i>
1030 pb	1 e 2	850 pb	4 e 2	<i>M. intracellulare</i>
1030 pb	1 e 2	-	-	<i>Mycobacterium</i> spp.

Fonte: Adaptado de Wilton e Cousins (2007).

4.4.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA

4.4.2.1 Reação de sequenciamento nucleotídico

As colônias que foram positivas para o gênero *Mycobacterium* na técnica de PCR TB Mutilplex, mas sem identificação dos outros genes pesquisados naquela técnica, foram submetidas à reação de sequenciamento que se iniciou com a purificação dos fragmentos amplificados pela técnica de PCR TB Multiplex, através do uso do reagente ExoSap-IT (USB® Products Affymetrix, Cleveland, USA), na concentração de 2 µL do reagente para 5 µL do produto da PCR. Após a etapa de purificação, os produtos foram submetidos às reações de sequenciamento, utilizando-se o reagente Big-Dye 3.1 (Applied Biosystems®, Carlsbad, USA) e as sequências foram definidas em equipamento ABI-3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems®, Carlsbad, USA), de acordo com instruções do fabricante.

Para cada amostra purificada, foram realizadas duas reações de sequenciamento, sendo que cada uma delas continha 2 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems®, Carlsbad, USA) e 1,5 µL de 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems®, Carlsbad, USA). A esses reagentes, em uma placa, misturou-se 5 pmol/ µL do *primer* senso e em outro 5 pmol/ µL do *primer* antisenso. Foram adicionados, também, 6 µL do DNA alvo para uma reação final de 10 µL. Levou-se as reações ao termociclador Eppendorf® Mastercycler Gradient a 96°C/ 1 minuto, em seguida a 40 ciclos de 96°C/ 15 segundos, 50°C/ 15 segundos e 60°C/ 4 minutos, com rampa de 1°C por segundo em todas as etapas.

A seguir, com o intuito de se removerem os terminadores não incorporados ao DNA, adicionou-se uma solução com 5 µL de EDTA 125 mM e 60 µL de etanol 100% em cada amostra e se incubou tal solução por 30 minutos no escuro. Posteriormente, centrifugou-se em temperatura ambiente a 16000 g/45 minutos, inverteu-se a placa e esta foi centrifugada, novamente, por 1 minuto a 185 g. Seguiu-se a adição de 75 µL de etanol 70% e nova centrifugação em temperatura ambiente a 16000 g/15 minutos. Novamente a placa foi invertida e procedeu-se nova centrifugação por 1 minuto a 185g. Por fim, a placa foi seca em termobloco a 95°C

por 3-5 minutos, e a seguir foi submetida ao sequenciador de nucleotídeos para processamento de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.2.2 Análise das sequências nucleotídicas

De posse dos eletroferogramas, foi feita uma inspeção visual das sequências geradas para cada fita senso e antisenso através do aplicativo FinchTV v. 1.4.0. Posteriormente, foram editadas com o programa Bioedit v.7.0.5 (HALL, 1999) para uma busca por discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas, e em seguida foram alinhadas entre si e com outras homólogas recuperadas do Genbank, utilizando-se o software CLUSTAL W v.2.1 (LARKIN et al., 2007).

Foi definido um bloco consensual de análise para serem feitas as matrizes de identidade de nucleotídeos entre as amostras, mediante o software Bioedit v.7.0.5 (HALL, 1999).

As inferências filogenéticas foram realizadas mediante o uso do programa Mega versão 5 (TAMURA et al., 2011). As árvores geradas a partir das sequências nucleotídicas foram construídas pelo método de *neighbor-joining* através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* para as regiões parciais de 503 e 505 nucleotídeos do gene 16S rRNA das micobactérias, sendo também definidos os valores de “*bootstrap*” a partir de 1000 repetições, cujos valores maiores ou iguais a 50 foram apresentados próximos aos nós.

5 RESULTADOS

Foram coletadas 161 amostras de queijo tipo minas meia cura em 84 feiras (37 provenientes da zona leste, 33 da zona sul, 31 da zona oeste, 31 do centro e 29 da zona norte), o que representa 36% das feiras que comercializavam laticínios no período do estudo, segundo dados da Prefeitura de São Paulo (NICOLOSI, 2012).

Das 161 amostras analisadas, 28 foram perdidas por contaminação, apesar do processo de descontaminação realizado. Das 133 amostras restantes, 22 apresentaram colônias que foram submetidas à identificação molecular. Foram obtidos 37 isolados destas 22 amostras.

5.1 TÉCNICA DE PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Das 37 colônias isoladas, 26 (70,27%) apresentaram banda de 1030 pb na PCR TB Multiplex, sendo, portanto, caracterizadas como *Mycobacterium* spp.

Salienta-se que aproximadamente 12% das amostras (16/133) apresentaram pelo menos uma colônia do gênero *Mycobacterium*. As figuras 2, 3, 4 e 5 mostram algumas das colônias isoladas no presente trabalho.

No entanto, nenhum isolado apresentou bandas de 372, 180 e 850 pb na reação, o que significa que esses isolados não pertencem aos Complexos *M. tuberculosis* ou *M. avium*, como também não eram *M. intracellulare*. A figura 1 mostra uma reação de PCR TB multiplex de *Mycobacterium* spp.

Figura 1 - Reação de PCR TB multiplex para amplificação de DNA de micobactérias isoladas de queijo Minas meia cura em meio Stonebrink-Leslie,

Fonte: MORICONI, P. R., 2013

Legenda: É possível evidenciar bandas de aproximadamente 1030 pb. *Ladder* 100 pb: marcador molecular; 179AB, 202^a, 202B, 179B, 122^a, 122B, 184BB, 184AC, 179AA, 184BA, 182, 184AA, 173, 206B, 184AB, 206A, 178B, 167, 178A, 135 e 20: colônias testadas; N1, N2, N3, N4 e N5: controles negativos e AN5: controle positivo.

5.2 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E INFERÊNCIA FILOGENÉTICA

Dentre os 26 isolados que apresentaram banda de 1030 pb na técnica de PCR TB Multiplex, 8 não puderam ser identificados quanto à espécie, sendo, então, caracterizados apenas como *Mycobacterium* spp. No entanto, o trabalho possibilitou a identificação, até o nível de espécie, de 18 isolados que se subdividiram em 6

espécies: 7 colônias de *Mycobacterium novocastrense*, presentes em 5 amostras; 5 colônias de *Mycobacterium elephantis*, presentes em 3 amostras, e 3 colônias de *Mycobacterium fortuitum*, presentes em 2 amostras e uma colônia de *Mycobacterium sphagni*, *Mycobacterium arupense* e *Mycobacterium confluentis*, cada uma em uma amostra diferente.

As árvores filogenéticas referentes aos fragmentos parciais de nucleotídeos codificadores do gene 16S rRNA (503 e 505 nucleotídeos) das micobactérias detectadas no presente estudo juntamente com sequências representativas de espécies filogeneticamente próximas recuperadas do *Genbank* estão representadas nas figuras 6 e 7. Os números próximos a cada nó representam os valores de “bootstrap” (1000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. O quadro 3 mostra características das amostras de todas as colônias identificadas como micobactérias através da técnica de reação de sequenciamento nucleotídico.

Figura 2 - Colônia de *Mycobacterium fortuitum* isolada em amostra de queijo minas meia cura obtido em feira-livre da região central da cidade de São Paulo - São Paulo - 2013

Fonte: MORICONI, P. R.; 2013

Figura 3 - Colônia de *Mycobacterium novocastrense* isolada em amostra de queijo minas meia cura obtido em feira-livre da região central da cidade de São Paulo - São Paulo - 2013

Fonte: MORICONI, P. R., 2013

Figura 4 - Colônia de *Mycobacterium elephantis* isolada em amostra de queijo minas meia cura obtido em feira-livre da região oeste da cidade de São Paulo - São Paulo - 2013

Fonte: MORICONI, P. R., 2013

Figura 5 - Colônia de *Mycobacterium confluentis* isolada em amostra de queijo minas meia cura obtido em feira-livre da região oeste da cidade de São Paulo - São Paulo - 2013

Fonte: MORICONI, P. R., 2013

Quadro 3 - Amostras positivas para micobactérias através da técnica de sequenciamento nucleotídico. Classificação quanto à região da cidade onde a amostra foi adquirida e à espécie de micobactéria isolada - São Paulo - maio 2012 a maio 2013

Amostra	Número de isolados obtidos	Região de Coleta	Espécie Identificada
20	1	Sul	<i>Mycobacterium spp.</i>
121	1	Norte	<i>Mycobacterium spp.</i>
122	2	Oeste	<i>Mycobacterium spp.</i>
135	1	Norte	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
136	1	Oeste	<i>Mycobacterium confluentis</i>
158	3	Centro	<i>Mycobacterium elephantis</i>
162	1	Oeste	<i>Mycobacterium elephantis</i>
167	2	Centro	<i>Mycobacterium spp.</i> e <i>Mycobacterium novocastrense</i>
170	1	Oeste	<i>Mycobacterium spp.</i>
179	3	Centro	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (2) e <i>Mycobacterium spp.</i> (1)
182	1	Centro	<i>Mycobacterium novocastrense</i>
184	5	Centro	<i>Mycobacterium novocastrense</i> (3) <i>Mycobacterium sphagni</i> (1) <i>Mycobacterium arupense</i> (1)
192	1	Norte	<i>Mycobacterium novocastrense</i>
202	1	Centro	<i>Mycobacterium novocastrense</i>
206	1	Norte	<i>Mycobacterium spp.</i>
207	1	Norte	<i>Mycobacterium elephantis</i>

Figura 6 - Árvore filogenética construída com o método de *neighbor-joining* através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (Software Mega v. 5) para a região parcial (503 nucleotídeos) do gene 16S rRNA das micobactérias.

Fonte: MORICONI, P. R., 2013

Legenda: As amostras apresentam a identificação *accession number*/amostra. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de "bootstrap", tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras deste estudo estão identificadas pela expressão "este estudo"

Figura 7 - Árvore filogenética construída com o método de *neighbor-joining* através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (Software Mega v. 5) para a região parcial (505 nucleotídeos) do gene 16S rRNA das micobactérias identificadas como *Mycobacterium fortuitum*.

Fonte: MORICONI, P. R., 2013

Legenda: As amostras apresentam a identificação *accession number*/amostra. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de “*bootstrap*”, tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras deste estudo estão identificadas pela expressão “este estudo”

6 DISCUSSÃO

O não isolamento de *Mycobacterium bovis* em queijos Minas meia cura não surpreende dado que não há um método específico para pesquisa de *M. bovis* em produtos lácteos que permita a detecção de baixos níveis de micobactérias cujas células podem estar injuriadas, na presença de alta carga de microrganismos competidores e de alterações de pH e atividade de água do processo de fabricação do queijo. Dados da prevalência da tuberculose bovina no país mostram que a doença, embora endêmica, acomete poucos animais e rebanhos (1,3%) (BRASIL, 2002) e, além disso, deve-se considerar que apenas uma parcela desses elimina o agente no leite (CORRÊA; CORRÊA, 1992; ROXO, 1997). A redução da população inicial devido à mistura com leite de animais não tuberculosos e a baixa chance do mesmo aumentar em número por causa do seu natural metabolismo lento aliado à presença de microrganismos competidores e injúria celular também são fatores importantes. Esses aspectos serão discutidos adiante.

Desses fatores, um dos mais importantes no que se refere ao não isolamento de *M. bovis*, por este trabalho, é a falta de metodologia padronizada para a pesquisa do bacilo em amostras de alimentos. Os escassos estudos a respeito do isolamento de *M. bovis* em amostras de leite e seus derivados determinam a ausência de um método padrão para isolamento do bacilo. Assim sendo, na literatura se encontram inúmeras tentativas de descontaminação, isolamento e identificação das micobactérias com base em técnicas bioquímicas e moleculares, visando um diagnóstico efetivo e rápido do agente. No geral, os resultados da investigação de *M. bovis* em amostras de rebanhos diagnosticados ou não com tuberculose apontaram baixa taxa de recuperação desta micobactéria no leite, sendo que o sucesso diagnóstico por técnica de PCR seguida de análise de restrição do fragmento amplificado foi conseguido por Figueiredo (2008) em situação de contaminação proposital de amostras, onde a técnica não dependia de etapa de descontaminação. A tentativa de isolamento de *M. bovis* em queijos (HARRIS et al., 2007) utilizou para descontaminação o método de acetilcisteína-NaOH, que é um método indicado para amostras provenientes de escarro, uma vez que a acetilcisteína é um elemento mucolítico usado para desfazer o muco proveniente do esputo dos pacientes. Isso

reforça a ausência de padronização de metodologia para o isolamento de *M. bovis* em amostras desse alimento, dificultando a recuperação do bacilo nas amostras. A etapa de descontaminação, por sua vez, ao mesmo tempo em que visa auxiliar o isolamento do bacilo em amostras que possuem grande carga de contaminantes, acaba por atrapalhar esse processo, visto que, todo agente descontaminante é responsável por causar injúrias às células micobacterianas, diminuindo, assim, a chance de isolamento do bacilo (CORNER; TRAJSTMAN; LUND, 1995). Desse modo, com base nesses fatos, embora as técnicas de isolamento em amostras lácteas falhem em detectar o agente, técnicas moleculares de pesquisa direta do DNA do agente em produtos lácteos têm mais sucesso em detecção, isso evidencia que o agente está na amostra, mas o não isolamento dele indica que o número é baixo e/ou a célula está injuriada, mais uma vez enfatizando a necessidade do desenvolvimento de técnicas específicas. Isso mostra que o cenário da ocorrência do agente nesses produtos pode mudar se houver o desenvolvimento de técnica que seja mais sensível que a disponível (emprestada das análises de amostras clínicas). Embora se saiba que o cultivo é o método padrão-ouro para se confirmar a infecção por micobactérias, faz-se necessário o aprimoramento do método, que não é padronizado para produto lácteo. O isolamento de *Mycobacterium* spp. representa, ainda na atualidade, um desafio. Zumárraga et al. (2012) e Vialta et al. (2003) apenas conseguiram confirmar a presença de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite e queijo por se utilizarem de técnicas moleculares visto que esses autores obtiveram resultados negativos nos procedimentos de cultura. No entanto, existe também a necessidade de que se entenda qual a significância de um resultado positivo em técnicas moleculares, visto que a detecção de material genético em amostras nem sempre indica que o microrganismo está vivo, ou seja, com potencial patogênico. Desse modo, não se deve considerar o resultado de cada técnica isoladamente, mas sim em conjunto, pontuando-se sempre os benefícios e restrições de cada método. Além disso, é necessário que métodos de enriquecimento seletivo sejam pesquisados e empregados para auxiliar no aumento da taxa de recuperação do bacilo nas amostras de alimentos.

Soma-se a isso a presença de elevado número de microrganismos que compõe a chamada microbiota acompanhante no queijo minas meia cura visto que a fabricação desse produto envolve muita manipulação e, muitas vezes, por pessoas

sem nenhum entendimento de higiene, o que acaba acrescentando microrganismos conhecidos por indicadores (principalmente *Staphylococcus aureus* e coliformes totais e fecais) que por sua vez, atrapalham o processo de isolamento de *M. bovis*. Favaro et al. (2006), pesquisando esses microrganismos em queijos minas meia cura informais vendidos em São Paulo, encontrou aproximadamente 60% dos produtos com contagens acima das permitidas pela legislação brasileira para pelo menos um desses padrões microbiológicos. Além disso, durante a produção desse tipo de produto, utiliza-se o fermento, conhecido como “pingo” o qual é composto de microrganismos dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* originados do dessoramento de queijos produzidos anteriormente (BORELLI et al., 2006), o que contribuiu para aumentar a microbiota acompanhante, prejudicando o desenvolvimento de células de *M. bovis*, se presentes. Durante a maturação, o queijo sofre transformações de ordem bioquímica, como a redução do pH e da atividade de água. Essas transformações aliadas à presença da microbiota competidora presente podem influenciar o desenvolvimento e, portanto, a detecção de microrganismos patogênicos, como o *M. bovis* (BORGES; BRANDÃO; PINHEIRO, 1990; MATA, 2009). Até o momento, não se conhece o real impacto dessas alterações na viabilidade do *M. bovis* (ROWE; DONAGHY, 2008), embora trabalhos tenham obtido isolamento do agente em queijos de longa maturação, ou seja, que sofreram grandes trocas bioquímicas (KASTLI; BINZ, 1949). Além disso, Sung e Collins (2000), pesquisando a viabilidade de *M. avium paratuberculosis* em queijos submetidos a diferentes condições de maturação, referem que a queda de pH foi um fator significativo para a cinética de morte desse agente.

Com relação ao isolamento de micobactérias, este estudo obteve resultados, em parte, semelhantes aos apresentados por Harris et al. (2007) e Kinde et al. (2007). No entanto, o presente trabalho isolou bactérias do gênero *Mycobacterium* spp. em aproximadamente 12% das amostras (16/133) em contraste com o total de 5% obtido pelos pesquisadores (10/197). Outro ponto divergente se refere ao número de amostras perdidas por contaminação: Harris et al. (2007) cita uma perda de apenas 3% enquanto o presente estudo obteve cerca de 17%. Isso pode estar relacionado ao emprego de técnicas diferentes de descontaminação (o presente estudo utilizou-se da técnica de HPC enquanto Harris trabalhou com a acetilcisteína NaOH) ou, mais provavelmente, às características microbiológicas das amostras.

Ademais, as 10 amostras das quais a equipe de Harris isolou o gênero *Mycobacterium* foram recuperadas de diversas variedades de queijo, inclusive de tipos de queijo duro (para ralar), queijos semi-duros e de diversos tipos de queijos macios, enquanto o atual levantamento foi baseado apenas em queijos tipo minas meia cura. Neste trabalho não foi possível o isolamento do *M. bovis* a partir das amostras, entretanto Harris só conseguiu constatação do bacilo em uma amostra de queijo fresco, o que aproxima o significado dos resultados de ambos estudos. O sucesso obtido por esses autores quanto ao isolamento de *M. bovis* pode estar relacionado à maior prevalência da tuberculose (17%) no gado de leite do país de onde as amostras procederam (México) (MILIAN-SUAZO et al., 2000).

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura muitos trabalhos nacionais que visassem recuperar *Mycobacterium bovis* em amostras de queijo através de métodos tradicionais, ou seja, cultura. Vialta (2003) conseguiu identificar tal micobactéria em amostras de leite e queijo apenas através de métodos moleculares, com insucesso na tentativa de cultivo. O trabalho de Pardo et al. (2001) obteve taxa de recuperação de *Mycobacterium* spp. semelhante à deste trabalho (10% de 780 amostras de leite contra 12% de 133 amostras de queijo, em nosso trabalho) através de cultura, diferindo pelo fato de que obtiveram o isolamento de uma colônia de *M. bovis*. Nosso resultado também é semelhante ao obtido por Leite et al. (2003) que, embora pesquisando o bacilo em amostras de leite vendidas no comércio, obteve um isolamento de 18% de *Mycobacterium* spp; uma das amostras de leite cru, no entanto, era positiva para *M. bovis*. Por fim, o trabalho brasileiro mais recente que foi bem sucedido no isolamento de *Mycobacterium bovis*, através de cultura, foi o trabalho de Franco et al. (2013). Os autores obtiveram 8% de amostras de leite positivas no isolamento para micobactérias, sendo que um dos isolados era *M. bovis*. Por outro lado, na Tanzânia, Kazwala et al. (1998) conseguiram um índice de positividade para micobactérias em leite de apenas 3,9% (31 de 805 amostras), obtendo dois isolados de *M. bovis*. Atualmente existem diversas técnicas que se propõem a caracterizar as espécies de micobactérias e cada grupo de pesquisa utiliza as técnicas possíveis dentro de sua realidade. Em contrapartida, muitas das espécies encontradas nesse trabalho são de descrição recente o que torna necessária a utilização de uma técnica de grande capacidade discriminatória, como o sequenciamento, para que os isolados sejam identificados.

Então, com relação às espécies isoladas, pode-se dizer que os achados desse trabalho são consistentes com os achados de outros grupos de pesquisa, uma vez que micobactérias não tuberculosas são encontradas frequentemente em amostras de queijo e leite. Algumas das espécies encontradas neste trabalho foram as mesmas das encontradas em outros trabalhos; porém, os trabalhos diferem em relação a outras espécies. Konuk et al. (2007), trabalhando com 35 amostras de leite cru na Turquia, isolou *M. terrae*, *M. kansassi*, *M. haemophilum* e *M. agri* em 28 delas enquanto que Leite et al. (2003) isolou a espécie *M. fortuitum*, obtendo 6 isolados em 23 amostras de leite, além de *M. marinum*, *M. kansassi* e *M. gordonae*. Kazwala et al. (1998), por sua vez, isolou as espécies de micobactérias não tuberculosas: *M. terrae*, *M. flavescens*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* e *M. gordonae*, em leite cru obtido de bovinos na Tanzânia. Franco et al. (2013), em seu trabalho, além de obter o isolamento de todas essas espécies, em amostras de leite do estado de São Paulo, obteve ainda outras espécies tais como *M. intracellulare* e *M. novocastrense*, ao passo que Pardo et al. (2001) isolou colônias de *M. fortuitum* e *M. avium*, também em amostras de leite cru, no estado de São Paulo. Em queijo, o único trabalho descrito até o momento, obteve isolamento para *M. fortuitum* (em 6 amostras de 10 positivas para micobactérias, sendo 5 em queijos frescos e 1 em queijo semi-duro), para o complexo *M. fortuitum* (1 em queijo tipo Hard grating), *M. moriokaense* (1 em 10) e *M. bovis* (em 1 amostra de queijo fresco) (HARRIS et al., 2007). Desse modo, percebe-se que a maioria dos trabalhos citados apresenta o isolamento de *M. fortuitum*, assim como o presente trabalho, sendo essa uma espécie muito isolada em amostras de leite. Além disso, este trabalho obteve o isolamento de 5 amostras (totalizando 7 colônias) de *Mycobacterium novocastrense*, o que se assemelha ao obtido por Franco et al. (2013), que isolou a mesma espécie em duas amostras de leite cru provenientes de tanques coletivos. Todas as outras espécies encontradas no presente trabalho não foram encontradas por outros autores em seus trabalhos, mas se assemelham pelo fato de serem classificadas como micobactérias outras que não as tuberculosas ou micobactérias atípicas.

Das espécies isoladas no presente trabalho, a classificação de Woods e Washington considera apenas a *Mycobacterium fortuitum* como espécie potencialmente patogênica em ser humano (KONEMAN, 2001). Além dessa, *M. novocastrense*, *M. arupense* e *M. elephantis* também têm sido consideradas

espécies com potencial patogênico ao ser humano. No entanto, até o momento, não existe comprovação científica de que tais espécies, assim como as outras isoladas neste trabalho, causem doenças relacionadas ao trato gastrointestinal.

O complexo *Mycobacterium fortuitum* comumente causa infecções e a incidência delas tem aumentado, sendo a síndrome clínica variável (SUNGKANUPARPH; SATHAPATAYAVONGS; PRACHARKTAM, 2003). Essa espécie tem sido isolada de amostras de água canalizada e de diversos tipos de solo (FRANCO et al., 2013). Dentre as MNT, essa é a espécie mais comumente associada às mastites em bovinos (WETZSTEIN; GEENFIELD, 1992), o que faz com que seja esperado que se encontrem amostras de queijo contendo esse microrganismo. Embora *M. fortuitum* raramente seja incriminado como causa de linfadenite cervical, uma doença que pode ser causada pelo consumo de alimentos contaminados, alguns casos têm sido relatados. Nguyen, Le e Nguyen (2008) reportaram o caso de uma mulher de 60 anos com uma massa do lado direito do pescoço, mas sem qualquer outro sintoma. A paciente era negativa para o teste de HIV, no entanto, seu histórico clínico incluía um câncer de mama em estágio 1, o qual havia sido diagnosticado um ano antes. Após realização de aspirado da massa, com subsequente cultura, os médicos isolaram *M. fortuitum*. Já Butt (1998), dez anos antes, havia isolado a mesma espécie causando linfadenite cervical em dois pacientes, que, no entanto, eram HIV positivos. Um dos casos, o qual apresentava um aumento de tamanho do lado esquerdo do pescoço há um mês, havia extraído um dente e acabado de se mudar da Califórnia. Segundo o autor, até o ano de 1998, a literatura havia reportado cerca de 17 casos de linfadenite cervical causada por essa micobactéria. Vale ressaltar que nenhum dos dois trabalhos indica uma fonte de infecção provável para os casos, e isso, de fato é algo difícil de ser desvendado, visto a natureza ubiquitária dessa espécie. No entanto, é uma espécie não raramente isolada de produtos lácteos, e que foi isolada também no presente trabalho, o que segundo Konuk et al. (2007) faz com que esse tipo de alimento ganhe importância como possível fonte de infecção para pessoas com debilidades imunológicas.

A espécie *M. fortuitum* está entre as espécies de micobactérias que ocorrem com maior frequência na água potável (VAEREWIJK et al., 2005) e é resistente à cloração (WALLACE-JR; BROWN; GRIFFITH, 1998). Um estudo realizado por

Covert et al. (1999), que buscou verificar a ocorrência de MNT em amostras de água ambientais, tais como águas engarrafadas, bebedouros públicos e amostras de gelo, isolou *M. fortuitum* em máquina produtora de gelo localizada num hospital. Tal fato, entretanto, não estava associado a nenhum caso de doença ocorrido no local. Apesar disso, os autores citam que devido a grande disseminação das MNT em indivíduos imunossuprimidos, existe a dúvida a respeito da real porta de entrada dessas micobactérias no organismo desses pacientes. Trabalhos pontuam que em indivíduos HIV positivos e em outros imunossuprimidos, a porta de entrada nem sempre é apenas pulmonar, mas também que infecções podem ocorrer via trato gastrointestinal (HORSBURGH-JR.; SELIK, 1989), o que torna os alimentos possíveis fontes de contaminação. De fato, existe uma necessidade em se verificar se e como a infecção via trato gastrointestinal ocorre e, se ocorrer, qual sítio mais afetado e qual doença clínica o infectado desenvolve. Os trabalhos que pesquisam a existência de micobactérias em amostras de leite e queijos encontram frequentemente essa espécie, o que está de acordo com Koneman (2001) o qual cita que essa espécie está dentre as micobactérias de crescimento rápido mais importantes e mais comumente isoladas. O autor também cita que essas micobactérias são ubíquas do solo e de ambientes aquáticos que contaminam abastecimentos de água o que faz com que não seja surpreendente seu isolamento neste estudo visto que as amostras de queijo adquiridas nas feiras-livres muitas vezes encontravam-se totalmente expostas (sem embalagem) permitindo assim a sua contaminação. Além disso, os feirantes carregam consigo água para lavagem de utensílios e mãos. Apesar de isso não ser realizado com frequência, dependendo da qualidade microbiológica dessa água, ela poderia ser uma fonte de contaminação para os produtos. Outra hipótese refere-se também à qualidade da água aplicada no processo de obtenção do leite e de fabricação do queijo. Considerando que a obtenção de produtos de origem animal requer o uso de muita água, a contaminação das amostras com essa espécie pode ter acontecido num desses momentos. Existe também a possibilidade de ter ocorrido contaminação do leite utilizado na produção do queijo com excretas, visto que essa micobactéria já foi encontrada nas fezes de animais (VIJAY et al., 2007) e que a contaminação por fezes não é algo de ocorrência incomum nas fazendas leiteiras do país. Desse modo, a contaminação dos produtos com *M. fortuitum* pode ter ocorrido em qualquer ponto da cadeia de sua produção, o que vai de acordo com o citado por Martinez-Herrera et al. (2013).

A espécie *Mycobacterium novocastrense* também foi isolada por Franco et al. (2013), em amostras de leite provenientes de tanques coletivos. Trata-se de uma espécie relativamente nova (descrita em 1997), semelhante à *M. marinum*, isolada a 36°C da mão de uma criança que apresentava uma granulação de crescimento lento na pele (SHOJAEI et al., 1997). Atualmente, não versam muitos trabalhos a respeito dessa espécie. Além da primeira descrição, houve apenas mais uma na qual o agente foi encontrado em amostra de escarro de uma mulher com sintomas pulmonares de tuberculose (SHOJAEI et al., 2011). O autor sugere a possibilidade de contaminação exógena da amostra com essa micobactéria; no entanto, deixa claro que devido à existência de sintomas pulmonares é possível que esse agente seja a causa da doença da paciente. Sugere, então, que seja um agente potencialmente patogênico ao humano (N'GUESSAN et al., 2006). No presente trabalho, essa foi a espécie isolada com maior frequência (em 5 amostras, totalizando 7 colônias).

Nenhuma das outras espécies de micobactérias isoladas neste trabalho foram descritas anteriormente em amostras de alimentos. Dentre elas, outra espécie isolada, com relativa frequência, foi *M. elephantis* (isolada em 3 amostras de 19). A primeira descrição dessa espécie foi a partir de um abscesso pulmonar de um elefante adulto o qual morreu de doença respiratória crônica, sendo o isolamento da micobactéria realizado a 37°C (SHOJAEI et al., 2000), as mesmas condições presentes nesse estudo. Essa micobactéria já foi isolada em pessoas residentes no Canadá, de amostras de esputo e de linfonodo axilar, cuja esterilidade do sítio anatômico, segundo os autores, torna essa espécie de potencial patogênico (TURENNE et al., 2002). Apesar de ter sido isolado de pacientes que apresentavam doenças pulmonares, essa espécie nunca foi isolada de sítios relacionados ao trato gastrointestinal. Sua significância clínica deve ser melhor pesquisada, assim como se existe alguma importância sua veiculação através de amostras de alimentos. *Mycobacterium confluentis*, isolada neste trabalho em uma amostra, também é uma espécie de descrição recente (identificada em 1992 por Kirschner et al). Foi isolada do esputo humano, uma única vez (KIRSCHNER et al., 1992) e aparentemente, não possui significância clínica, sendo considerada saprófita (SECANELLA-FANDOS et al., 2011). Percebe-se a necessidade de novos trabalhos científicos que esclareçam principalmente a fonte de onde essa espécie provém.

Neste trabalho, foram ainda isoladas as espécies *M. sphagni* e *M. arupense*. Não existem, até o momento, relatos de ambas em amostras de alimentos. A espécie *M. sphagni*, que foi primeiramente, isolada da vegetação do Norte da Alemanha e da Escandinávia, em 1980 (KAZDA, 1980), já foi também isolada em amostra de água de piscina, na Finlândia (IIVANAINEM et al., 1999). Provavelmente trata-se de uma espécie saprófita sem nenhuma implicação em saúde pública. No entanto, *Mycobacterium arupense* já foi isolada do esputo e dos linfonodos de uma paciente que apresentava febre, hemoptise e dispnéia o que faz crer que possui potencial patogênico (NEONAKIS et al., 2010). Também já foi encontrada em coleções de água (SLANY et al., 2010) e em biofilme existente num sistema de distribuição de água potável da cidade de Guangzhou na China (RUYIN LIU et al., 2012). Segundo os autores, apesar de serem necessários mais estudos a cerca da importância desse fato, a presença de micobactérias que possuem um potencial patogênico em sistemas de distribuição de água requer certa atenção das autoridades, principalmente em áreas que concentram muitos indivíduos imunossuprimidos (RUYIN LIU et al., 2012). Resultado semelhante foi obtido por Lee et al. (2008), na Coreia do Sul.

De modo geral, a maioria dos queijos vendidos nas feiras-livres da cidade de São Paulo, dos quais as amostras foram obtidas para a realização deste estudo, permaneciam, durante o período em que eram comercializados, totalmente expostos, ou seja, não envoltos por embalagem, o que favorecia a contaminação ambiental dessas amostras. Considerando que as micobactérias não tuberculosas são de vida livre e que, sendo ubíquas podem estar em diversos lugares, pode ter havido uma contaminação do queijo pronto durante sua exposição na feira. Outra hipótese é a da contaminação do leite durante o processo de ordenha através do contato desse produto com fontes contaminadas, que podem ser o solo ou água contaminada. Nesse caso, essas micobactérias não tuberculosas foram capazes de resistir à maturação do queijo apresentando-se viáveis durante o término desse período, fato que permitiu seu isolamento. De fato, as micobactérias são microrganismos resistentes ao processo de cura do queijo sendo que existem trabalhos que mostram sua viabilidade mesmo após 120 dias de cura (SPAHR; SCHAFROTH, 2001) ou mais (DONAGHY; TOTTON; ROWE, 2004). Os trabalhos de Harris et al. (2007) e Kinde et al. (2007), além do presente trabalho, reforçam

esse fato visto que mostram, em condições naturais, a habilidade desse gênero em resistir ao período de maturação de queijos o que é comprovado pelo isolamento de diversas espécies de MNT, de queijos semi-duros. Por fim, existe também a possibilidade das micobactérias não tuberculosas serem incorporadas ao produto durante a fabricação dos queijos. As fontes contaminantes, nesse caso, são as mesmas e também é a mesma a habilidade das micobactérias recém incorporadas no processo de resistirem ao período de cura do produto.

Uma das grandes dificuldades nesse trabalho foi ter conhecimento sobre o tipo de leite empregado na fabricação do queijo. O fato das amostras de queijo analisadas não possuírem o selo do SIF, no momento de sua compra, não indica necessariamente que o produto não havia passado por inspeção. Grande parte dos feirantes possui o hábito de retirar a embalagem do produto, não apondo nova identificação no mesmo, o que torna difícil rastrear sua procedência. Isso não está de acordo com o exigido pela legislação vigente das feiras-livres da cidade de São Paulo (SÃO PAULO, 2007), a qual exige que o comerciante transcreva para uma etiqueta dados do rótulo original do produto, permitindo, assim, que seja identificado, mas foi muito observado durante as coletas. Este trabalho chama a atenção para a necessidade de se realizarem outros estudos que busquem isolar *Mycobacterium bovis* em amostras de queijo no Brasil visto que a doença ainda é prevalente no rebanho bovino e que grande parte do queijo produzido no país é fabricada com leite cru, expondo os consumidores ao risco. Soma-se a isso o aumento do interesse no consumo dos queijos artesanais que também são fabricados com leite cru (ROWE; DONAGHY, 2008). É igualmente importante que sejam realizados esforços no sentido de se padronizar uma técnica para o isolamento do bacilo nos produtos.

Além disso, o presente trabalho evidencia uma necessidade crescente em se estudar e procurar entender a importância de micobactérias não tuberculosas em amostras de alimentos, mais especificamente em produtos lácteos, os quais são utilizados, com frequência, na alimentação de crianças cujo sistema imunológico está ainda em formação. É importante que se verifique o que realmente indica a presença desses microrganismos em alimentos (falta de higiene, utilização de água de fonte contaminada), qual a fonte de contaminação de onde eles provêm e qual o significado clínico deles em amostras de alimentos.

7 CONCLUSÃO

Não foi possível o isolamento de colônias de *Mycobacterium bovis* em amostras de queijo minas meia cura obtidos em feiras livres da cidade de São Paulo. A intermitência e irregularidade da excreção dessa espécie no leite associados à atual baixa prevalência da doença nos bovinos de leite, do Brasil, tornam necessária a realização de novos trabalhos, inclusive com amostragens maiores. No entanto, este trabalho constitui-se no primeiro relato de isolamento e caracterização de MNT em amostras de queijos no país, o que sugere a necessidade da realização de novos estudos acerca da significância desses microrganismos em saúde pública e de uma maior conscientização de produtores e comerciantes a cerca do risco envolvido na produção e comercialização de derivados lácteos fabricados com leite cru e em práticas inadequadas de higiene.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.
- BALL, C. O. Short-time pasteurization of Milk. **Industrial Engineering Chemistry**, v. 35, p. 71-84, 1943.
- BELCHIOR, A. P. C. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco d tuberculose bovina em Minas Gerais. 2001. 55 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- BEMER-MELCHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA Typing Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2350- 2351, 1999.
- BESSER, R. E.; PAKIZ, B.; SCHULTE, J. A.; ALVARADO, S.; ZELL, E. R. Risk Factors for positive Mantoux Tuberculin Skin Tests in Children in San Diego, California: Evidence for boosting and possible foodborne transmission. **Pediatrics**, v. 108, n. 2, p. 305-310, 2001.
- BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R.; VIANNA, C. R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. S.; HENEINE, L. G. D.; ROSA, C. A. Identification of Staphylococcus spp. isolated during the ripening processo of a traditional Minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 481-487, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária- Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. Brasília: 2002. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>. Acesso em: 26 maio 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Portaria 146. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos**. 07 de março de 1996. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 09 abr. 2013.
- BUTT, A. A. Cervical adenits due to *Mycobacterium fortuitum* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **American Journal of Medical Sciences**, v. 315, n. 1, p.50- 55, 1998.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Human *tuberculosis* caused by *Mycobacterium bovis*, New York City 2001–2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 54, n. 24, p. 605–608, 2005.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Diagnóstico de laboratório de La tuberculosis animal**. Buenos Aires: CPZ, 1972. 48 p. (Nota Técnica 26).

CHANG, C.; WANG, L.; LIAO, C.; HUANG, S. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3159- 3161, 2002.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Mycobacterial in water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 57, p. 193- 211, 1984.

COLLINS, C. H. The bovine tubercle bacillus. **British Journal of Biomedical Science**, v. 57, n. 3, p. 234-240, 2000.

COLLINS, D. M. Advances in molecular diagnosis for *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 151, n. 1-2, p. 2-7, 2011.

CORNER, L. A.; TRAJSTMAN, A. C.; LUND, K. Determination of the optimum concentration of descontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 43, n. 4, p.129- 133, 1995.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Tuberculose. In:_____. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: Varela, 1992. p. 317-322.

COVERT, T. C.; RODGERS, M. R.; REYES, A. L.; STELMA JR., G. N. Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in Environmental Samples. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2492- 2496, 1999.

CRUZ, F. T.; MENASCHE, R. “Se o leite é cozido, o queijo não é Serrano”: tradição, conhecimento e discurso instituído no controverso debate em torno de queijos feitos de leite cru. In: COLÓQUIO AGRICULTURA FAMILIAR E DESENVOLVIMENTO RURAL, 3., 2011, Porto Alegre. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/pgdr/arquivos/825.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2013.

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

DING, L. W.; LAI, C. C.; LEE, L. N.; HSUEH, P. R. Abdominal Nontuberculous Mycobacterial Infection in a University Hospital in Taiwan from 1997 to 2003. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 105 , n. 5, p. 375- 376,2006.

DORAN, P.; CARSON, J.; COSTELLO, E.; MORE, S. J. An outbreak of tuberculosis affecting cattle and people on an Irish dairy farm, following the consumption of raw milk. **Irish Veterinary Journal**, v. 1, n. 62, p. 390-397, 2009.

DUNDEE, L.; GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 173- 177, 2001, edição 3.

DANKNER, W.; DAVIS, C. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of *tuberculosis* in children residing along the U.S.-Mexico border in the Baja California region. **Pediatrics**, v. 105, n. 6, 2000. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/105/6/e79.full>>. Acesso em: 06 maio 2012.

DONAGHY, L. A.; TOTTON, N. L.; ROWE, M. T. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4899–4905, 2004.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa do Gado de Leite. **Estatísticas do Leite**. Minas Gerais, 2013. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The animal health risks of feeding animals with ready-to-use dairy products without further treatment. **The EFSA Journal**, v. 347, p. 1-21, 2006. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/347.pdf>>. Acesso em: 27 maio 2013.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Mycobacterium*. 2013. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/Mycobacterium.html>>. Acesso em: 25 maio 2013.

FALKINHAM, J. O. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. **The Canadian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 281- 286, 2003.

FIGUEIREDO, E. E. S.; SILVA, M. G.; FONSECA, L. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Detecção do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* no Leite pela Reação em Cadeia da Polimerase seguida de Análise de Restrição do Fragmento Amplificado (PRA). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1023-1033, out./dez. 2008. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewArticle/1381>. Acesso em: 05 maio 2013.

FRANCO, M. M. J.; PAES, A. C.; RIBEIRO, M. G.; PANTOJA, J. C. F.; SANTOS, A. C. B.; MIYATA, M.; LEITE, C. Q. F.; MOTTA, R. G.; LISTONI, F. J. P. Occurrence of mycobacteria in bovine Milk samples from both individual and collective bulk tanks at.

GOLDEN, M. P.; VIKRAM, H. R. Extrapulmonary *Tuberculosis*: An Overview. **American Family Physician**, v. 72, n. 9, p. 1761- 1768, 2005.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 137-151, 1994.

HAJMEER, M. N.; FUNG, D. Y. C. Infections with other bacteria. In: RIEMANN, H. P.; CLIVER, D. O. **Foodborne Infections and Intoxications**. 3. ed. Amsterdam: Academic Press, 2006. p. 354-356.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/nt. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMMER, B. W.; BABEL, F. J. Bacteriology of Cheeses. In:_____. **Dairy bacteriology**. 4. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons Inc., 1957. p. 510- 540.

HANDA, U.; MUNDI, I.; MOHAN, S. Nodal *tuberculosis* revisited: a review. **The journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, n. 1, p. 6-12, 2012.

HARRIS, N. B. Molecular Techniques: Applications in Epidemiology Studies. In: THOEN, C. O.; STEELE, J. H.; GILSDORF, M. J. ***Mycobacterium bovis* infection in animals and humans**. Iowa: Blackwell Publishing, 2006. p. 54-62.

HARRIS, B.; PAYEUR, J.; PAULSON, D.; BRAVO, D.; TREVISIO, S.; CERNEK-HOSKINS, S.; OSORIO, R.; MIKOLON, A.; RAST, R.; KINDE, H.; STUBER, T.; FARRELL, D.; RODRIGUEZ-LAINZ, A.; GINSBERG, M. Recovery of *Mycobacterium bovis* from Soft Fresh Cheese Originating in Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p.1025-1028, 2007.

HAZRA, R.; D. ROBSON, C.; PEREZ-ATAYDE, A. R.; HUSSON, R. N. Lymphadenitis Due to Nontuberculous Mycobacteria in Children: Presentation and Response to Therapy. **Clinical Infectious Disease**, v. 28, p.123- 129, 1999

HORSBURGH-JR., C. R.; SELIK, R. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **The American Review of Respiratory Disease**, v. 139, n. 1, p. 4- 7, 1989.

HOSTY, T. S.; McDURMONT, C. L. Isolation of acid-fast organismos from milk and oysters. **Health Laboratory Science**, v. 12, n. 1, p. 16- 19, 1975.

HOWARD, S. T.; BYRD, T. F. The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1845- 1853, 2000.

IIVANAINEN, E.; NORTHRUE, J.; ARBEIT, R. D.; RISTOLA, M.; KATILA, M. L.; REYN, C. F. V. Isolation of mycobacteria from indoor swimming pools in Finland.

Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandandinavica, v. 107, p. 193- 200, 1999.

JORDÃO JR., C. M.; LOPES, F. C. M.; DAVID, S.; FARACHE FILHO, A.; LEITE, C. Q. F. Detection of nuntuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 26, p. 658- 661, 2009.

JORGE, K. S. G. Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica. 2010. 88 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campo Grande, 2011.

KAHLA, B.; BOSCHIROLI, M. L.; SOUISSI, F.; CHERIF,N.; BENZARTI,M.; BOUKADIDA, J.; HAMMAMI, S. Isolation and molecular characterization of *Mycobacterium bovis* from raw milk in Tunisia. **African Health Sciences** ,v. 11, S2-S5, 2011. Suplemento 1.

KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 907- 914, 1997.

KANTOR, I. N. **Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal**. OPAS/OMS. 1979, 63 p. (Norma Técnica nº11).

KANTOR, I. N.; AMBROGGI, M.; POGGI, S.; MORCILLO, N.; TELLES, M. A. S.; RIBEIRO, M. O.; TORRES, M. C. G.; POLO, C. L.; RIBÓN, W.; GARCÍA, V.; KUFFO, D.; ASECNOS, L.; CAMPOS, M. L. V.; RIVAS, C.;WAARD, J. H. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. **Tuberculosis**, v. 88, p. 358- 365, 2008.

KASTLI, P.; BINZ, M. Die Lebensfähigkeit Von *Mycobacterium tuberculosis* in verschiedenen Kasesorten. **Milchwissenschaft**, v. 4, p. 391- 394, 1949.

KAZDA, J. *Mycobacterium sphagni* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, n. 1, p. 77- 81, 1980

KAZWALA, R. R.; DABORN, C. J.; KUSILUKA, L. J. M.; JIWA, S. F. H.; SHARP, J. M.; KAMBARAGE, D. M. Isolation of *Mycobacterium* species from raw milk of pastoral cattle of the southern highlands of Tanzania. **Tropical Animal Health and Production**, v. 30, p. 233- 239, 1998.

KINDE, H.; MIKOLON, A.; RODRIGUEZ-LAINZ, A.; ADAMS, C.; WALKER, R. L.; CERNEK-HOSKINS, S.; TREVISO, S.; GINSBERG, M.; RAST, R.; HARRIS, B.; PAYEUR, J. B.; WATERMAN, S.; ARDANS, A. Recovery of Salmonella, Listeria monocytogenes and *Mycobacterium bovis* from Cheese entering the United States. **Journal of Food Protection**, v. 70, n.1, p.47-52, 2007.

KIRSCHNER, P.; TESKE, A.; SCHRODER, K. H.; KROPPESTEDT, R. M.; WOLTERS, J.; BOTTGER, E. C. *Mycobacterium confluentis* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 2, p. 257- 262, 1992.

KLEEBERG, H. H. Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health. **Review of Science and Technology, Office International des Epizooties**, v. 3, p. 11-32, 1984.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN-JR, W. C. Micobactérias. In: _____. **Diagnostico microbiologico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. p. 903-932.

KONUĞ, M.; KORCAN, E.; DULGERBAKI, S.; ALTINDIS, M. Isolation and Identification os Mycobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 343-347, 2007.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTIN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of Methods based on different molecular epidemiological markers fot typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory powe and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2607-2619, 1999.

LAKE, R.; GILBERT, S.; WONG, T. L.; CRESSEY, P. Risk profile: *Mycobacterium bovis* in milk. Nova Zelândia, Christchurch: Institute of Environmental Science and Research Limited, 2009. Disponível em: <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Risk_Profile_Mycobacterium-Science_Research.pdf>. Acesso em: 27 maio 2013.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P. **Risk profile: *Mycobacerim bovis*** in milk. Christchurch: Institute of Environmental, Science and Research Ltd. 2002.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE , I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LEE, E. S.; LEE, M. Y.; HAN, S. H.; KA, J. O. Occurrence and molecular differentiation of Environmental Mycobacteria in surface waters. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 1207- 1215, 2008.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LÉVY-FRÉBAULT, V. V.; PORTAELS, F. Proposed minimal standards for the Genus *Mycobacterium* and for description of New Slowly Growing *Mycobacterium* Species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 2, p. 315- 323, 1992.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo de minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, p. 266-272, 2009.

LoBLUE, P. A.; BETANCOURT, W.; PETER, C.; MOSER, K. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v. 7, n. 2, p.180-185, 2003.

MARTINEZ-HERRERA, D. I.; PARDIO-SEDAS, V. T.; VILLAGÓMEZ-CORTES, J. A.; ORNELAS-CRUZ, J. V.; VILLANUEVA-VALÊNCIA, M.; MORALES-ALVAREZ, F.; ROMERO-SALAS, D.; PARISSI-CRIVELLI, A.; FLORES-CASTRO, R. Identification of *Mycobacterium bovis* in Fresh Cheeses Expended at Markets in the Veracruz-Boca Del Río Metropolitan Area, México. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 96- 103, 2013.

MEDIEL, M. J.; RODRIGUEZ, V.; CODINA, G.; MARTIN-CASABONA, N. Isolation of mycobacteria from frozen fish destined for human consumption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3637- 3638, 2000.

MILIAN-SUAZO, S.; SALMAN, D.; RAMIREZ, C.; PAYEUR, J. B.; RHYAN, J. C.; SANTILLAN, M. Identification of *tuberculosis* in cattle slaughtered in Mexico. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 1, p. 86-89, 2000.

NEONAKIS, I. K.; GITTI, Z.; KONTOS, F.; BARITAKI, S.; PETINAKI, E.; BARITAKI, M.; LIAKOU, V.; ZERVA, L.; SPANDIDOS, D. A. *Mycobacterium arupense* pulmonary infection: Antibiotic resistance and restriction fragment length polymorphism analysis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 173- 176, 2010.

N'GUESSAN, K.; VINCENT, V.; NAHOUA, G.; KAMATE, M.; DOSSO, M. *Mycobacterium novocastrense* isolée des expectorations : contamination or infection respiratoire non tuberculeuse ?. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 36, p. 180, 2006. Supplement, 3.

NGUYEN, H.; LE, C.; NGUYEN, H. An Unusual Case of a Cervical Mass Due to Nontuberculous *Mycobacterium Fortuitum* Infection. **The Permanente Journal**, v. 12, n. 4, p. 49- 51, 2008.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Diseases**, v. 76, p. 1-46, 1995, suplemento 1.

PARDO, R.B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P.; CHI, K. D. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to *tuberculosis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p.284-287, 2001.

PEREZ, A.; RENIERO, A.; FORTEIS, A.; MEREGALLI, S.; LÓPEZ, B.; RITACCO, V. Study of *Mycobacterium bovis* in milk using bacteriological methods and the polymerase chain reaction. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 34, n. 1, p.45–51, 2002.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PERSING, D. H. Polymerase Chain Reaction: Trenches to benches. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 7, 1991.

PHILBERT, R. F.; KIM, A. K.; CHUNG, D. P. Cervical *tuberculosis* (scrofula): a case report. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 94- 107, 2004.

PHYFFER, G. E.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE JR., R. W. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation and Staining Procedures. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. Herndon: ASM Press, 2003. 532-533.

RICKMAN, T. W.; MOYER, N. P. Increased sensitivity of acid fast smears. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 618-620, 1980.

RIDAURA-SANZ, C.; LÓPEZ-CORELLA, E. D.; LOPEZ-RIDAURA, R. Intestinal/Peritoneal *Tuberculosis* in Children: An analysis of autopsy cases. *Tuberculosis Research and Treatment*. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539372/>>. Acesso em: 3 jun. 2013.

ROCHA, V. C. F. ; DE FIGUEIREDO, S. C. ; ELIAS, A. O. ; LEO, D. A. S. ; FERREIRA NETO, J.S. . *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.

ROSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 25, p. 39-67, 2001.

ROWE, M. T.; DONAGHY, J. *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human *tuberculosis* in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 4, 2008.

ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 1, n. 18, p. 101-108, 1997.

RUYIN L.; ZHISHENG, Y.; HONGXUN, Z.; YANG, M.; SHI, B.; LIU, X. Diversity of bacteria and mycobacteria in biofilms of two urban drinking water distribution systems. **The Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, p 261- 270, 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Biochemistry**, v. 74, n. 12, p. 5463- 5467, 1997.

SÃO PAULO. Prefeitura do Município de São Paulo. **Decreto nº 48.172. 2007. Dispõe sobre o funcionamento das feiras livres no Município de São Paulo.** São Paulo: 6 março 2007. Disponível em: <<http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/subprefeituras/abastecimento/legislacao/index.php?p=14015>>. Acesso em: 04 maio 2011.

SECANELLA-FANDOS, S.; LUQUIN, M.; TRUJILLO, M. P.; JULIAN, E. Revised mycolic acid pattern of *Mycobacterium* *confluentis* using thin-layer chromatography. **Journal of Chromatographic B**, v. 879, issue 26, p. 2821- 2826, 2011.

SEPKOWITZ, K.; RAFFALLI, J; RILEY, L. et al. Tuberculosis in the AIDS era. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 180-199, 1995.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food-and beverage-associated microorganisms: A review. **Journal of Microbiology Methods**, v. 69, p. 1-22, 2007.

SHAO, H.; YANG, Z.; DENG, W.; CHEN, J.; TANG, S.; WEN, L. *Tuberculosis* versus lymphoma in the abdominal lymph nodes: A comparative study using contrast-enhanced MRI. **European Journal of Radiology**, v. 81, p. 2513- 2517, 2012.

SHOJAEI, H.; GOODFELLOW, M.; MAGEE, J. G.; FREEMAN, R.; GOULD, F. K.; BRIGNALL, C. G. *Mycobacterium* *novocastrense* sp. nov., a Rapidly Growing Photochromogenic *Mycobacterium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1205- 1207, 1997.

SHOJAEI, H.; MAGEE, J. G.; FREEMAN, R.; YATES, M.; HORADAGODA, N. U.; GOODFELLOW, M. *Mycobacterium* *elephantis* sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic *Mycobacterium* isolated from an elephant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1817- 1820, 2000.

SHOJAEI, H.; HASHEMI, A.; HEIDARIEH, P.; NASER A. D. *Mycobacterium* *novocastrense*-associated pulmonary and wound infections. **Emerging Infectious Disease**, v. 17, n. 3, p. 550- 551, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. Técnicas básicas de detecção da presença/ausência de microrganismos. In: _____ **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** São Paulo: Ed. Varela, p. 83-93, 2010.

SINHA, R.N. *Mycobacterium bovis*. In: IDF/FIL. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. **International Dairy Federation**, Bruxelas: 1994, p. 141-166.

SLANY, M.; SVOBODOVA, J.; ETTLOVA, A.; SLANA, L.; MRLIK, V.; PAVLIK, I. *Mycobacterium arupense* among the isolates of non-tuberculous mycobacteria from human, animal and environmental samples. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 8, p. 369- 376, 2010.

SMITHWICK, R. W.; STRATIGOS, C. B.; DAVID, H. L. Use of Cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 411- 413, 1975.

SOBRAL, L. F.; DUARTE, R. S.; VIEIRA, G. B. O.; DA SILVA, M. G.; BOECHAT, N.; FONSECA, L. S. Identificação de *Mycobacterium bovis* em cepas micobacterianas isoladas de espécimes clínicos humanos em um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, n. 5, p. 664- 668, 2011.

SOINI, H.; MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of Mycobacteria. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 809–814, 2001.

SPAHR, U.; SCHAFFROFTH, K. Fate of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4199- 4205, 2001.

STARIKOFF, K. R. Inativação de *Mycobacterium bovis* durante a cura de queijo: definição de protocolo de estudo. 2011. 63 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

STEELE, J. H.; RANNEY, A. F. Animal *tuberculosis*. **American Review of Tuberculosis**, v. 77, n. 6, p. 908-922, 1958.

SUNGGANUPARPH, S.; SATHAPATAYAVONGS, B.; PRACHARKTAM, R. Infections with rapidly growing mycobacteria: report of 20 cases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 198- 205, 2003.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p.2731-2739, 2011

THOEN, C. O.; LoBLUE, P. A.; ENARSON, D. A.; KANEENE, J. B.; DE KANTOR, I. N. *Tuberculosis*: a re-emerging disease in animals and humans. **Veterinaria Italiana**, v. 45, n. 1, p. 135- 181, 2009.

THOEN, C. O.; BARLETTA, R. G. Pathogenes is of *Mycobacterium bovis*. In: THOEN, C. O.; STEELE, J. H.; GILSDORF, M. J. ***Mycobacterium bovis* Infections in Animals and Humans**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005, p. 18-29.

THOEN, C.; LoBLUE, P.; KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2-4, p. 339-345, 2006.

THOEN, C. O.; BARLETTA, R. G. Pathogenes is of *Mycobacterium bovis*. In: THOEN, C. O.; STEELE, J. H.; GILSDORF, M. J. ***Mycobacterium bovis* Infections in Animals and Humans**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. p. 18-29.

TORTOLI, E. Clinical Features of Infections Caused by New Nontuberculous Mycobacteria, Part I*. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 26, n. 12, p. 89- 96, 2004.

TURENNE, G.; CHEDORE, P.; WOLFE, J.; JAMIESON, F.; MAY, K.; KABANI, A. Phenotypic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of *Mycobacterium elephantis* from Human Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1230- 1236, 2002.

VAEREWIJCK, M. J. M.; HUYS, G.; PALOMINO, J. C.; SWINGS, J. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. **Federation of European Microbiology Societies- Microbiology Reviews**, v. 29, p. 911- 934, 2005.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W.; DE HAAS, P. E.; SOLL, D. R.; VAN EMBDEN, J. D. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of *tuberculosis*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2578- 2586, 1991.

VANHOENACKER, F. M.; DE BACKER, A. I.; OP DE BECK, B.; MAES, M.; VAN ALTENA, R.; VAN BECKEOORT, D.; KERSEMANS, P.; DE SCHEPPER, A. M. Imaging of gastrointestinal and abdominal *tuberculosis*. **European Radiology**, v. 14, E- 103- 115, suplemento 3, 2004.

VIALTA, A.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; VIEIRA, M. C.; GRAEL, E. T.; BARBIERI, M. K.; SOUZA, F. K. H.; ALMEIDA, A. R.; POMPEIA, J. C. A.; MARTINI, M.; LEAL, C. M.; LIMA, Z. M. B.; PRADO, M. V.; SCARCELLI, E.; ROXO, E.; BALDASSI, L.; TEIXEIRA, A. C.; PAULIN, L. M.; GENOVEZ, M. E. Caracterização microbiológica, microscópica e físico-química de produtos lácticos clandestinos apreendidos no estado de São Paulo. **Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos**, v. 3, n. 6, p. 212-216, 2003. Disponível em: < ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/revp03_vol3n6.pdf >. Acesso em: 25 jun. 2013.

VIJAY, C. J. H. A.; MORITA, Y.; DHAKAL, M.; BESNET, B.; SATO, T.; NAGAI, A.; KATO, M.; KOZAWA, K.; YAMAMOTO, S.; KIMURA, H. Isolation of *Mycobacterium* spp. From milking Buffaloes and Cattle in Nepal. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 8, p. 819- 825, 2007.

WAGNER, D.; YOUNG, L. S. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. **Infection**, v. 31, n. 5, p. 257-270, 2003.

WALLACE-JR, R. J.; BROWN, B. A.; GRIFFITH, D. E. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 52, p. 453- 490, 1998.

WETZSTEIN, M.; GREENFIELD, J. Mastitis caused by a *Mycobacterium* sp. **Canadian Veterinary Journal**, v. 33, n. 12, p. 826, 1992.

WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and Identification of Multiple Mycobacterial Pathogens by DNA Amplification in a Single Tube. **Genome Research**, v. 1, n. 4, p. 269- 273, 2007.

YODER, S.; ARGUETA, C.; HOLTZMAN, A.; AROSON, T.; BERLIN, O. G. W.; TOMASEK, P.; GLOVER, N.; FROMAN, S.; STELMA JR, G. PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 65, 2650–2653, 1999.

YOUNG, J.; O' CONNOR, M. E. Risk factors associated with latent *tuberculosis* infection in Mexican American children. **Pediatrics**, v. 115, n. 6, p. e647- e653, 2005.

ZAMANI, S.; AFLAKI, M.; FOOLADI, A. A. I.; SAROKHALIL, D. D.; BAMERI, Z.; KHAZAEI, S.; NASIRI, M. J.; FEIZABADI, M. M. MIRU-VNTR analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates from three provinces of Iran. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 45, p. 124- 130, 2013.

ZANINI, M. S. Identificação de *Mycobacterium bovis* em leite através da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. 1998. 52 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, – 1998.

ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; ROTH, F.; KAZWALA, R. Economics of Bovine *Tuberculosis*. In: THOEN, C. O.; STEELE, J. H.; GILSDORF, M. J. ***Mycobacterium bovis* Infections in Animals and Humans**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. p. 68-83.

ZUMÁRRAGA, M. J.; SOUTULLO, A.; GARCÍA, M. I.; MARINI, R.; ADBALA, A.; TARABLA, H.; ECHAIDE, S.; LÓPEZ, M.; ZERVINI, E.; CANAL, A.; CATALDI, A. A. Detection of *Mycobacterium bovis*-Infected Dairy Herds Using PCR in Bulk Tank Milk Samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 2, p.132-137, 2012.