

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE
LEITE BOVINO PROVENIENTES DE TANQUES DE
EXPANSÃO INDIVIDUAIS E COLETIVOS DE
PROPRIEDADES RURAIS E DO COMÉRCIO INFORMAL
NA REGIÃO SUDESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

MARÍLIA MASELLO JUNQUEIRA FRANCO

Botucatu, SP
novembro/2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE
LEITE BOVINO PROVENIENTES DE TANQUES DE
EXPANSÃO INDIVIDUAIS E COLETIVOS DE
PROPRIEDADES RURAIS E DO COMÉRCIO INFORMAL
NA REGIÃO SUDESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

MARÍLIA MASELLO JUNQUEIRA FRANCO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Paes
Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Franco, Marília Masello Junqueira.

Ocorrência de micobactérias em amostras de leite bovino provenientes de tanques de expansão individuais e coletivos de propriedades rurais e do comércio informal na região sudeste do estado de São Paulo / Marília Masello Junqueira Franco. – Botucatu, 2012

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2012

Orientador: Antonio Carlos Paes

Co-orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502000

1. Leite – Bacteriologia. 2. Micobactérias – Pesquisa. 3. Leite – Qualidade. 4. Segurança alimentar. 5. Reação em cadeia pela polimerase. 6. Tuberculose em bovino – Prevenção.

Palavras chave: leite bovino; tanque de expansão; *Mycobacterium* sp.; tuberculose

Marília Masello Junqueira Franco

OCORRÊNCIA DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO
PROVENIENTES DE TANQUES DE EXPANSÃO INDIVIDUAIS E COLETIVOS DE
PROPRIEDADES RURAIS E DO COMÉRCIO INFORMAL NA REGIÃO SUDESTE DO
ESTADO DE SÃO PAULO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Carlos Paes

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Adj. Christian Hirsch

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal de Lavras – Lavras/MG

Prof. Tit. Hélio Langoni

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

M.V. Dra. Amanda Keller Siqueira

Membro Suplente

Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes

Instituto de Biociências da Universidade de Campinas

Defesa: 30 de novembro de 2012. Local: FMVZ/UNESP – *Campus* de Botucatu/SP.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas oportunidades oferecidas, por sempre guiar e orientar meu caminho, com saúde para viver plenamente.

Aos meus pais, que são os maiores exemplos de caráter, honestidade e amor incondicional que tenho na vida. Amo vocês meus queridos! Aos meus irmãos, Mariana e Fernando, meus eternos companheiros. Em especial ao Fer, com certeza um dos melhores professores que tenho e, felizmente, terei por toda a vida. Aos meus primos e tios queridos, que fortalecem o alicerce da nossa família, e só reforçam o sentimento de amor entre nós.

Ao meu orientador e amigo, prof. Dr. Antônio Carlos Paes, por sempre estar à disposição para ajudar e transmitir seus conhecimentos. Obrigada por acreditar na minha capacidade, pela oportunidade de ser sua orientada de residência e mestrado. Agradeço também ao meu estimado co-orientador, prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, pelo seu empenho e dedicação no meu mestrado e por toda a ajuda cotidiana. Tive muita sorte de poder contar com dois excelentes docentes ao meu lado nesta etapa.

Aos professores que ministraram as disciplinas que cursei durante o mestrado, os quais forneceram base teórica para minha evolução profissional. Prof. Tit. Hélio Langoni, prof. Adj. Alexander Welker Biondo, prof. Dr. Antônio Carlos Paes, prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr. e prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto, muito obrigada!

Agradeço a todos os colaboradores do projeto, que foram fundamentais para sua concretização. Rodrigo Garcia Motta, companheiro desde os tempos da residência, muito pró-ativo na etapa de colheita das amostras. Adolfo Carlos Barreto Santos e Marcelo Miyata, pós-graduandos extremamente competentes e amigos que me ensinaram muito, sempre solícitos e dedicados. A profa. Tit. Clarice Queico Fujimura Leite, muito atenciosa, pela oportunidade do trabalho em conjunto. Ao prof. Ass. José Carlos de Figueiredo Pantoja, por mostrar-se sempre disposto a contribuir e ensinar, além de transmitir sua experiência. Ao técnico e grande amigo Fernando José Paganini Listoni, que me ensinou técnicas bacteriológicas de trabalho com *Mycobacterium*, entre outros conhecimentos, referência na construção da minha vida profissional.

Aos professores componentes da banca examinadora da dissertação: Prof. Dr. Antônio Carlos Paes, Prof. Adj. Christian Hirsch, Prof. Tit. Hélio Langoni, Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues e Dra. Amanda Keller Siqueira. São exemplos profissionais que tenho imensa admiração.

A todos os professores, funcionários e residentes do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu. A boa convivência com vocês torna o cotidiano de trabalho mais leve e agradável.

Aos meus colegas de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu. Em diversas áreas do conhecimento, além de nos complementarmos profissionalmente, também vamos descobrindo afinidades pessoais e amizades ao longo da trajetória de estudos. Obrigada pela convivência nesses anos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado, indispensável para minha manutenção em Botucatu e dedicação às atividades de pesquisa. Agradeço também a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro à execução do projeto.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os amigos que estiveram ao meu lado nesta fase e nas anteriores. Considero-me abençoada por ter conhecido e permanecido com o carinho de pessoas muito especiais ao longo dos anos. Meu irmão de alma e coração, Rafael Lobo Borgue, a certeza de uma amizade eterna, que independe de distância e tempo. As companheiras de graduação Sarah Bicudo Oliveira e Marina Mendonça de Miranda, nosso trio é inesquecível e insubstituível, por onde quer a vida nos leve a afinidade não se perde. Camila Moraes Raymundo e seu lado espiritualizado e centrado que sempre me fez bem. Leonardo Delatorre Kairalla, Emanuelle Guidugli Sabino, Lívia Pinheiro Chagas da Cunha, Maurício Oliveira Salán, e outros tantos companheiros que Lavras me trouxe.

Aos amigos que Botucatu me deu nesses cinco anos. Claudenice Batista de Barros, amiga-irmã, companheira e meio mãe, você sabe que as palavras não são necessárias pra agradecer. Leila Sabrina Ullmann, minha amiga conselheira e corajosa, a saudade só reforça os votos de amizade. Selene Daniela Babboni, alegre e divertida e com um ombro amigo sempre pronto pra entrar em ação. Victor José Vieira Rossetto, pela amizade carinhosa e cuidadosa. Amanda Keller Siqueira, meu orgulho, minha amiga linda, madura e admirável. Larissa Anuska Zeni Condas, com seu

coração imenso e jeitinho feliz, saudade das nossas risadas. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, o contador de histórias divertidas de carisma contagiante. Gustavo Henrique Batista Lara, com seu jeito responsável e trabalhador em figura de menino alegre e divertido.

Incluindo também Simone Henriques Mangia, Anna Paula Vitirito Martinho, Isabella Belletti Mutt Perotti, Rodrigo Costa da Silva, Rafaela Mastrangelo Rissetti (minha residente afilhada), Geraldo de Nardi Jr., Mirela Verdugo, Thiago Braga Izidoro, Fábio André Pinheiro Araújo, Felipe Gazza Romão, Marina Gea, Camila Appolinário Harary. Todos vocês, cada uma a seu modo, entraram na minha vida e deixaram coisas positivas.

Uma das partes que considerei mais difíceis nesta dissertação foi escrever os agradecimentos... São muitas pessoas pelas quais sinto gratidão e que infelizmente não poderei agradecer a todas especificamente aqui. Saibam que vocês são muito importantes. Muito obrigada!

“Sou um pouco de todos que conheci, um pouco dos lugares que fui, um pouco das saudades que deixei e sou muito das coisas que gostei.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

Com meu carinho e sinceridade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. Classificação e propriedades gerais das micobactérias.....	13
2.1.1. Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2.1.2. Complexo <i>Mycobacterium avium</i>	18
2.1.3. Demais micobactérias não tuberculosas.....	20
2.2. Micobacterioses e a pandemia da Aids.....	21
2.3. Produção e comercialização do leite no Brasil.....	22
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
4. DISCUSSÃO GERAL	60
5. CONCLUSÕES GERAIS	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

FRANCO, M. M. J. Ocorrência de micobactérias em amostras de leite bovino provenientes de tanques de expansão individuais e coletivos de propriedades rurais e do comércio informal na região sudeste do estado de São Paulo. Botucatu, 2012. 81p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo.

RESUMO

O leite constitui importante fonte de nutrientes para a alimentação humana. No entanto, também pode servir como veículo para disseminação de micro-organismos patogênicos. A tuberculose e as micobacterioses estão entre as infecções mais debilitantes que acometem humanos e os animais, com evolução crônica e progressiva, tendo recrudescido sua incidência em vários países. Espécies de *Mycobacterium* sp. tem alta capacidade de sobrevivência em leite e seus subprodutos. O presente estudo investigou a ocorrência de micobactérias em amostras de leite bovino cru, de rebanhos do sudeste do estado de São Paulo, utilizando cultivo microbiológico nos meios de Lowenstein-Jensen e Stonebrink, seguido de tipificação molecular pelo teste de reação em cadeia pela polimerase com o uso de enzimas de restrição. Foram processadas 300 amostras, 100 de tanques de expansão individuais, 100 de tanques coletivos e 100 obtidas no comércio informal da região amostrada. Obteve-se isolamento de 15 diferentes espécies de *Mycobacterium*, a saber: *M. bovis*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, *M. duvalli*, *M. haemophilum*, *M. immunogenum*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. novocastrense*, *M. parafortuitum*, *M. smegmatis*, *M. terrae* e *M. vaccae*. Os isolamentos ocorreram nas seguintes proporções: 9% das amostras de tanques individuais, 7% das amostras de tanques coletivos e 8% das amostras de leite informal. Não houve associação estatística entre a ocorrência de micobactérias com os fatores epidemiológicos considerados nas propriedades amostradas. Considerando o impacto das micobacterioses na saúde pública e animal, particularmente a tuberculose bovina, a prevenção da exposição da população ao risco destas infecções torna-se fundamental. A investigação da presença de micobactérias em leite pode contribuir na melhoria da segurança alimentar inerente ao produto.

Palavras-chave: leite bovino, tanque de expansão, *Mycobacterium* sp., tuberculose.

FRANCO, M. M. J. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from individual and collective bulk tanks of farms and from informal trade from the southeast region of Sao Paulo state. Botucatu, 2012. 81p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo.

ABSTRACT

Milk represents an important source of nutrients for humans. However, it can also serve as a dissemination vehicle for pathogenic microorganisms. Tuberculosis and micobacteriosis are among the most debilitating diseases that affect humans and animals, being chronic and progressive, re-emerging its incidence in many countries. *Mycobacterium* sp. has high survivability in milk and its byproducts. The main objective of the study was to investigate the occurrence of mycobacteria in bovine raw milk samples from farms along southeast region of Sao Paulo state, using microbiological culture on Lowenstein-Jensen and Stonebrink media followed by molecular typification with polymerase chain reaction tests using restriction enzymes. Three hundred milk samples were processed, 100 from individual bulk tanks, 100 from collective bulk tanks and 100 obtained in informal trading of sampled region. Fifteen different isolates of *Mycobacterium* species were obtained: *M. bovis*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, *M. duvalli*, *M. haemophilum*, *M. immunogenum*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. novocastrense*, *M. parafortuitum*, *M. smegmatis*, *M. terrae* and *M. vaccae*. Isolations occurred on following proportions: 9% of the individual bulk tanks samples, 7% of the collective bulk tanks samples and 8% of the informal trade milk samples. There was no statistical association between the occurrence of mycobacteria on samples with the epidemiological factors considered on sampled farms. Considering the impact of mycobacteriosis on public and animal health, especially bovine tuberculosis, is from main importance the prevention of public exposure to risk of these diseases. Investigative approaches of the presence of mycobacteria in raw milk may contribute to improvement of food security inherent in the product.

Key words: bovine milk, bulk tank, *Mycobacterium* sp., tuberculosis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O leite constitui fonte essencial de proteínas, açúcares, lipídeos e outros nutrientes para a alimentação humana. No entanto, estes elementos também podem servir veículo para disseminação de micro-organismos patogênicos. O tradicional consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, elaborados de maneira artesanal a partir de leite sem tratamento térmico representa sério risco em saúde pública (DI PINTO et al., 2006). Estima-se que mais de 90% de todos os casos de doenças relacionadas ao consumo de laticínios sejam de origem bacteriana, das quais já são reconhecidas no mínimo 21 diferentes infecções (CHYE et al., 2004).

Nas últimas três décadas, aproximadamente 75% das doenças infecciosas emergentes em humanos são zoonoses. O aumento da interdependência dos humanos com os animais e seus subprodutos é apontado como o fator de risco mais crítico para o bem-estar e saúde humana em relação a doenças infecciosas (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2008).

As infecções pelo gênero *Mycobacterium* estão entre as mais debilitantes que acometem humanos e os animais, caracterizadas por evolução crônica e progressiva (QUINN et al., 2005). Dentre estas afecções, inclui-se uma das mais antigas doenças que se conhece, a tuberculose (BALIAN et al., 2002), que está entre as principais zoonoses transmitidas pelo leite bovino (BERNARD et al., 2005). Espécies do gênero *Mycobacterium*, como *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), tem elevada capacidade de sobrevivência em leite. Bacilos viáveis são encontrados por mais de 14 dias no iogurte e no queijo cremoso produzidos a partir do leite não pasteurizado, e por mais de 100 dias na manteiga (DE LA RUA-DOMENECH, 2006). A presença desse grupo de bactérias patogênicas ou oportunistas no leite emergiu como problema de saúde pública, especialmente entre os indivíduos que ainda consomem leite cru (CHYE et al., 2004).

Devido a estes aspectos e às exigências do comércio internacional, diversos países implementaram programas nacionais de controle e erradicação da tuberculose bovina (BOLAND et al., 2010). No Brasil, a tuberculose bovina ainda representa um dos principais problemas em saúde animal, os dados de

notificações oficiais indicam prevalência média nacional de 1,3%, no período de 1989 a 1998. A instituição do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) objetivou a diminuição do impacto negativo da enfermidade na saúde animal e pública (BRASIL, 2006). Até o momento o MAPA não divulgou dados epidemiológicos mais recentes sobre a doença, ou os efeitos da primeira década de atuação do PNCEBT sobre a ocorrência da tuberculose nos rebanhos bovinos.

Tradicionalmente, o leite não é utilizado como espécime de diagnóstico da tuberculose bovina, embora seja a principal via de transmissão da tuberculose por *M. bovis* aos humanos (THOEN et al., 2006). O PNCEBT contempla o uso de leite apenas para o diagnóstico da brucelose bovina, pelo teste do anel em leite, inclusive podendo ser desempenhado a partir do leite de rebanho, utilizando tanques resfriadores (BRASIL, 2006).

Além dos prejuízos para a saúde animal e dos reflexos em saúde pública representados pelas micobactérias de multiplicação lenta, que incluem *M. tuberculosis*, *M. bovis* e o complexo *M. avium*, tem sido observado também aumento da ocorrência de doenças associadas às micobactérias de multiplicação rápida, tanto em indivíduos imunocomprometidos, quanto em imunocompetentes (YARES et al., 1997).

Estudos pontuais em outros países tem investigado a ocorrência de micobactérias em amostras de leite bovino. No entanto, raramente nestes estudos tem-se realizado simultaneamente o cultivo micobacteriano em paralelo às provas moleculares. O presente projeto de pesquisa investigou a ocorrência de micobactérias em amostras de leite bovino cru, de rebanhos do sudeste do estado de São Paulo, utilizando cultivo microbiológico nos meios de Lowenstein-Jensen e Stonebrink, seguido de tipificação molecular por teste de restrição enzimática aplicado em produtos de reação em cadeia pela polimerase.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação e propriedades gerais das micobactérias

Micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em forma de bastão, aeróbios, não-formadores de esporos e imóveis, com tamanho variável entre as espécies, apresentando a álcool-ácido resistência como a característica mais importante do gênero (QUINN et al., 2005; BRASIL, 2005b). Estão posicionadas taxonomicamente na ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae (BRASIL, 2005b), onde figuram exclusivamente o gênero *Mycobacterium* (LEÃO et al., 2004).

A classificação das micobactérias teve início em 1896, quando os pesquisadores Lehmann e Neumann propuseram o gênero *Mycobacterium* (LEÃO et al., 2004), o qual é constituído até o momento por 165 espécies, incluindo subespécies, dentre patogênicas e saprófitas (DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN, 2011). As micobactérias podem ser divididas em três grupos com base na significância clínica das infecções (LEÃO et al., 2004; VAEREWIJCK, 2006).

O primeiro grupo compreende patógenos obrigatórios de humanos e animais, o denominado Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, “*M. canetti*”, *M. bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*), também *M. leprae* e *M. lepraemurium* (VAEREWIJCK, 2006). O segundo grupo envolve micobactérias que são potencialmente patogênicas para humanos e animais, como os micro-organismos do Complexo *M. avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. intracellulare*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. chimaera*, *M. colombiense*) [BEN SALAH et al., 2008]. O terceiro grupo consiste de espécies saprófitas não patogênicas ou ocasionalmente patogênicas (VAEREWIJCK, 2006).

As bactérias do segundo e do terceiro grupo são comumente referidas como micobactérias “atípicas”, “anônimas”, “ambientais patogênicas facultativas”, “ambientais potencialmente patogênicas” ou “não-tuberculosas”. A maioria destas espécies tem sido isoladas de diversos ambientes terrestres e

aquáticos, e podem causar doenças sob determinadas circunstâncias, como lesões cutâneas, afecções pulmonares, disfunções imunológicas e doenças crônicas (VAEREWIJK, 2006).

Todavia, a taxonomia e a classificação das espécies de *Mycobacterium* tem se tornado complexas. As relações de identidade desses micro-organismos tem sido redefinidas pela determinação do sequenciamento de DNA (WASHINGTON et al., 2006). O sequenciamento completo de genomas bacterianos já se encontra disponível para diversas espécies e linhagens de patógenos, contribuindo de maneira significativa na investigação da diversidade bacteriana, evolução de seus fatores de virulência e patogênese, além do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (FITZGERALD & MUSSER, 2001).

Durante muitos anos apenas *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. leprae* foram reconhecidos como patógenos de humanos, até que Pinner, em 1935, designou o termo “micro-organismos álcool-ácido resistentes atípicos” aos isolados que se assemelhavam ao *M. tuberculosis*. Desde então vem surgindo na literatura uma série de relatos de infecções humanas e animais por patógenos micobacterianos. Tais descrições motivaram a seleção de testes bioquímicos, técnicas e estratégias de classificação para as micobactérias (LEÃO et al., 2004).

Os critérios mínimos para a inclusão de bactérias no gênero *Mycobacterium* são: resistência ao álcool-ácido, presença de ácidos micólicos contendo 60-90 átomos de carbono (os quais podem ser pirolisados em ácidos graxos e ésteres metílicos de 22 a 26 carbonos), e a proporção genômica guanina + citosina (G – C) de 61 a 71 mol% (com exceção de *M. leprae*, que possui 54 a 57 mol%) [ROMÁN, 1990; LEÃO et al., 2004].

A organização da parede celular micobacteriana é extremamente singular, na qual o peptidoglicano contém ácido N-glicolilmurânico, em substituição ao ácido N-acetilmurânico, encontrado na maioria das bactérias. Uma característica ainda mais peculiar é o fato de cerca de 60% da parede celular se constituir de raros ácidos graxos de cadeia longa, com 60 a 90 átomos de carbono, denominados ácidos micólicos. Outro fator importante é o gradiente de fluidez na parede celular, que aparenta ter orientação contrária à de

bactérias Gram-negativas, com regiões externas mais fluidas que as internas. Possuem, ainda, proteínas de membranas formadoras de canais catiônicos seletivos, chamadas porinas, que controlam ou retardam a difusão de pequenas moléculas hidrofílicas, conferindo baixa permeabilidade a solutos hidrofílicos (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005). Embora sejam citoquimicamente Gram-positivas, as micobactérias não se coram pelo método de Gram, devido a esta espessa composição da parede celular (QUINN et al. 1994), que pode representar 40% do peso seco das bactérias (BRASIL, 2005b).

Tais características tornam as micobactérias hidrófobas e resistentes às condições adversas do meio ambiente e aos produtos químicos (QUINN et al. 2005), principalmente frente aos desinfetantes ácidos ou alcalinos. São, inclusive, menos afetadas pelo pH exigido para elaboração dos diversos tipos de queijos se comparada a outros lactopatógenos (DE LA RUA-DOMENECH, 2006).

Para o isolamento *in vitro*, as espécies do gênero *Mycobacterium* são altamente exigentes no que se refere aos nutrientes, quando comparadas com outras bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e outras enterobactérias (BALIAN et al., 2002). *Mycobacterium* sp. requer meios de cultivo ricos e específicos, alguns à base de ovo, além de processos de descontaminação prévia dos espécimes, utilizando ácidos ou álcalis (QUINN et al., 2005). A temperatura ótima de multiplicação para a maioria das micobactérias de interesse humano e animal é de 35-37°C (BRASIL, 2005b).

O tempo necessário para a multiplicação dos micro-organismos do gênero *Mycobacterium* também é longo em comparação com outras bactérias, podendo atingir 60 a 90 dias em algumas espécies. Tal fato se deve à presença de apenas um (nas espécies de crescimento lento) ou dois (nas espécies de crescimento rápido, com exceção de *M. chelonae* e *M. abscessus*) cistrons no 16S rRNA (ao passo que *Escherichia coli* possui sete). Está relacionado também a impermeabilidade da parede celular rica em lipídeos, e à alta demanda energética para a síntese dos ácidos micólicos. Embora o número restrito de cistrons no 16S rRNA limite a velocidade da multiplicação

micobacteriana, esta condição facilita a aquisição de mutações para resistência aos antimicrobianos de atuação ribossomal (PRIMM et al., 2004).

A virulência do gênero *Mycobacterium* relaciona-se a sua capacidade de sobreviver e multiplicar-se dentro de macrófagos do hospedeiro (QUINN et al., 2005). Um dos fatores predisponentes que contribuem para a patogenicidade do bacilo reside na estrutura complexa de parede celular, que além de permitir que o micro-organismo mantenha-se viável dentro de macrófagos (os quais geralmente destroem os patógenos fagocitados), facilita também a agregação das células bacterianas, dificultando o cultivo e a realização de contagens. (GRANGE, 1990; THOEN & STEELE, 1995; TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

A confirmação do diagnóstico clínico das infecções por micobactérias e a identificação laboratorial do micro-organismo envolve a detecção de BAAR em esfregaços, isolamento e identificação de espécie (OSOBA, 2004). Tradicionalmente, a velocidade de multiplicação, a morfologia das colônias e testes bioquímicos tem sido usados na diferenciação das micobactérias (YIM & HOLLAND, 2004).

Considerando os riscos biológicos de manipulação e tempo exigido nos métodos convencionais (geralmente duas a três semanas), e principalmente pelo aumento no número de casos de tuberculose em decorrência da pandemia de Aids, houve interesse crescente no desenvolvimento de técnicas rápidas de identificação de micobactérias (OSOBA, 2004). De fato, a necessidade de métodos para estudo da biologia de *Mycobacterium* sp. e consequente melhoria no diagnóstico, terapêutica e medidas de prevenção das infecções associadas ainda constitui uma prioridade (PARISH & BROWN, 2008).

Em curto prazo, os métodos convencionais continuarão sendo utilizados. Entretanto, estão sendo introduzidas técnicas moleculares rápidas para identificação e testes de sensibilidade aos antimicrobianos de espécies de *Mycobacterium* isoladas de amostras biológicas. A tendência predominante nas pesquisas básicas e aplicadas sobre micobacteriologia na literatura atual está concentrada nas potenciais aplicações laboratoriais das provas moleculares (WASHINGTON et al., 2006).

Técnicas moleculares para *Mycobacterium* sp. tem sido desenvolvidas desde as duas últimas décadas, com objetivo de agilizar a instituição de tratamentos, diminuição do tempo de detecção da resistência aos antimicrobianos e determinação de medidas apropriadas para o controle das infecções (OSOBA, 2004).

Dentre elas, destaca-se a reação em cadeia pela polimerase ('Polimerase Chain Reaction' – PCR) em associação ao uso de enzimas de restrição ('PCR-restriction enzyme pattern analysis' - PRA). A PRA baseia-se na amplificação e digestão enzimática de um fragmento do gene *hsp65*, região altamente conservada que codifica uma proteína de choque térmico de 65-kDa, a qual possui epítomos únicos, bem como epítomos comuns à diversas espécies de *Mycobacterium* sp. A análise do perfil de restrição enzimática do *hsp65* é válida na classificação das espécies ambientais de micobactérias, embora não diferencie os isolados do Complexo *M. tuberculosis* (TELENTI et al., 1993).

Entre as técnicas de identificação molecular do Complexo *M. tuberculosis*, pode ser desempenhada a amplificação de fragmentos do elemento de inserção 6110 (IS6110), ou pela digestão enzimática do fragmento amplificado do gene *gyrB* (LEÃO et al., 2004).

O sequenciamento de fragmentos específicos do 16S rRNA também constitui ferramenta válida na determinação de espécies de micobactérias, muito embora envolva técnicas mais caras (ROGALL et al., 1990).

A recomendação atual consiste no uso de uma combinação de ensaios fenotípicos e moleculares para a identificação rápida de micobactérias, particularmente para a identificação de *M. tuberculosis* (WASHINGTON et al., 2006).

2.1.1 Complexo *M. tuberculosis*

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* destacam-se as espécies que compõem o Complexo *M. tuberculosis* ('*M. tuberculosis* Complex' - MTBC), causadoras da tuberculose nos humanos e/ou animais. Tal complexo é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, principal agente da

tuberculose humana, *M. bovis*, principal agente da tuberculose bovina, *M. africanum*, agente da tuberculose humana encontrado mais frequentemente na África, *M. microti* que causa tuberculose em roedores. Posteriormente, foram incluídos neste complexo *M. bovis* subsp. *caprae*, causador de tuberculose em caprinos, bovinos, ovinos, cães, gatos, suínos, texugos, pássaros e primatas não humanos e, além disso, responsável por 31% dos casos de tuberculose humana relacionados ao *M. bovis* (MURRAY et al., 2007) e *M. pinnipedii*, que causa tuberculose em leões marinhos e ocasionalmente em humanos (COUSINS et al., 2003).

M. canetti, uma variante de *M. tuberculosis*, ainda não foi oficialmente reconhecido como uma espécie do Complexo (EUZÉBY, 2012). Pesquisas identificaram em *M. canetti* organização genômica única, incluindo diferença no número de cópias do elemento de inserção 1081 (IS1081), quase nenhuma deleção gênica ao longo do genoma, além da presença de 26 sequências espaçadoras exclusivas (ausentes em todas as outras espécies do MTBC). Possui, ainda, diversos polimorfismos em determinados genes-referência (BROSCH et al., 2002).

As espécies do MTBC são geneticamente muito similares e apresentam 99,9% de homologia, possuindo a sequência 16S rRNA idêntica. No entanto, apresentam diferenças fenotípicas, epidemiológicas e de patogenicidade (SREEVATSAN et al., 1997; COUSINS et al., 2003). A análise de 26 genes estruturais em mais de 800 isolados do MTBC revelou nível extremamente restrito de variação de nucleotídeos homólogos, indicando desmembramento evolucionário recente das espécies (SREEVATSAN et al., 1997; WIRTH et al., 2008; DJELOUADJI et al., 2011).

2.1.2 Complexo *M. avium*

O Complexo *M. avium* ('*M. avium* Complex' - MAC) compreende micobactérias de crescimento lento, responsáveis por infecções oportunistas e de potencial zoonótico (ACHA & SZYFRES, 2003). Encontra-se amplamente distribuído na água, no solo, na poeira, em animais e aves domésticas. Animais

silvestres também podem servir como reservatórios de MAC para humanos e animais de produção (LARA et al., 2011). As espécies são muito heterogêneas, com variações substanciais na virulência (McGARVEY & BERMUDEZ, 2002).

Atualmente, o MAC é compreendido por *M. intracellulare*, causador de doença pulmonar em humanos, as subespécies de *M. avium*: *M. avium* subsp. *avium*, associada à tuberculose aviária, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, responsável por quadros de enterite granulomatosa crônica em bovinos, ovinos, caprinos e outros ruminantes, *M. avium* subsp. *silvaticum*, ligado à enterite granulomatosa crônica em aves, e *M. avium* subsp. *hominissuis*, que pode causar abscessos pulmonares em humanos. *M. hominissuis* possui elevada heterogenicidade, a partir de onde se considera a emergência de *M. silvaticum* e *M. paratuberculosis* como dois clones especializados independentes. Recentemente foram incluídas *M. chimaera*, também causadora de doença pulmonar nos humanos e *M. colombiense*, relacionada à bacteremia e linfadenopatia humana (BEN SALAH et al., 2008).

Para os humanos, esse grupo de micobactérias foi considerado de baixa patogenicidade, raramente causando doença. Entretanto, a pandemia da Aids demonstrou a patogenicidade desses micro-organismos em indivíduos com depleção da imunidade das células T. Atualmente, nesses pacientes apenas o *M. tuberculosis* é isolado com maior frequência que o MAC (WASHINGTON et al., 2006). De fato, 40% dos pacientes HIV-positivos apresentam coinfeção com micobactérias pertencentes ao MAC, principalmente *M. avium* subsp. *avium* tipos 1 e 2 (ACHA & SZYFRES, 2003). Embora os indivíduos HIV-positivos possam se infectar tanto pela via respiratória quanto pela oral, a segunda ocorre com maior frequência (McGARVEY & BERMUDEZ, 2002).

As espécies de MAC, em especial *M. avium* e *M. intracellulare*, podem causar, além de infecções pulmonares, infecções disseminadas em pacientes com quadros de leucemia ou doença renal crônica, principalmente entre os que se encontram sob tratamento hemodialítico (McGARVEY & BERMUDEZ, 2002).

2.1.3 Demais micobactérias não tuberculosas

As micobactérias ambientais, ou não tuberculosas ('Non Tuberculous Mycobacteria' - NTM), encontram-se disseminadas na natureza e, antagonicamente às espécies do Complexo *M. tuberculosis*, apresentam patogenicidade variável (HADAD et al., 2005). São encontradas predominantemente no solo, podendo também habitar água doce ou marinha. Podem ser encontradas como saprófitas, comensais ou simbiontes. A gama de possíveis hospedeiros é ampla, abrangendo, além dos humanos e animais, plantas e protozoários (PRIMM et al., 2004). Humanos e animais são constantemente expostos, por inalação ou ingestão, havendo consequente colonização temporária ou permanente do trato respiratório ou digestório (LEÃO et al., 2004).

A capacidade das NTM em produzir doença está claramente descrita, e sua importância vem aumentando progressivamente, com isolamentos de diferentes espécies nos laboratórios de micobacteriologia. As NTM presentes no ambiente podem colonizar um hospedeiro e determinar ou não manifestação de infecção ou doença. O estabelecimento de um divisor entre infecção e doença é difícil, frente à dificuldade de diferenciação da presença de micobactérias em amostras clínicas como agentes etiológicos ou contaminantes (HADAD et al., 2005).

As NTM possuem impacto significativo na morbimortalidade em humanos e podem gerar perdas econômicas na agropecuária (PRIMM et al., 2004). As manifestações associadas às infecções variam desde doença crônica localizada até quadros disseminados, potencialmente fatais (McGARVEY & BERMUDEZ, 2002).

O tempo de isolamento é variável, considerando-se crescimento rápido para as espécies que geram colônias macroscopicamente visíveis em menos de sete dias e crescimento lento para as que demandam tempo maior. Esse aspecto se deve à ampla variação no tempo de geração (2 a 48 horas) entre as espécies. Com base na sequência 16S rRNA, as espécies de crescimento rápido e as de crescimento lento poderiam ser distinguidas em dois gêneros. A variabilidade também é expressiva no que se refere à morfologia das colônias,

perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e desinfetantes, carreamento de plasmídeos e virulência (PRIMM et al., 2004).

Dentre os sistemas ecológicos onde NTM podem ser encontradas, destacam-se os sistemas de distribuição e tubulações de água, devido à resistência inata desses micro-organismos aos desinfetantes clorados. Os processos convencionais de tratamento da água, baseados em cloração e ozonização, resultaram em mudança considerável na população bacteriana nestes locais, favorecendo os actinomicetos de maneira geral, entre eles *Mycobacterium* sp. (FALKINHAM III et al., 2001). Mesmo as micobactérias menos resistentes, como *M. aurum*, apresentam tolerância ao cloro 100 vezes maior que *Escherichia coli* (LeDANTEC et al., 2002).

Em adição, algumas espécies de NTM possuem capacidade de formação de biofilme, que facilita a sobrevivência nos ductos hídricos, mesmo sob crescimento lento (PRIMM et al., 2004). A baixa concentração de nutrientes microbiológicos em água tratada também não interfere na persistência ambiental das NTM. A literatura refere manutenção da viabilidade, com diminuição apenas de um log na curva de crescimento, após 1,4 anos em água deionizada estéril (ARCHULETA et al., 2002).

2.2 Micobacterioses e a pandemia da Aids

O avanço no número de pessoas infectadas pelo vírus da Aids (HIV) no mundo predispõe o aumento de doenças reconhecidas como emergentes e re-emergentes – notadamente causadas por agentes oportunistas – como as micobacterioses. Em muitas regiões do mundo, a tuberculose constitui a principal causa de morte em indivíduos portadores do HIV (WASHINGTON et al., 2006). Na fase aguda da infecção pelo HIV-1, os pacientes acometidos por *M. tuberculosis* sofrem aumentos marcantes nas taxas de viremia plasmática, a qual retorna aos níveis basais após o sucesso do tratamento antimicobacteriano (McGARVEY & BERMUDEZ, 2002).

As NTM também possuem papel importante na interface entre micobactérias e a infecção pelo vírus da Aids. O cenário das infecções por

NTM mudou consideravelmente com o avanço da pandemia da Aids. Houve aumento significativo no número de casos e transição de doença predominantemente respiratória para infecções disseminadas. Nos Estados Unidos e Europa, entre 25 a 50% dos portadores do HIV apresentam coinfeção com NTM. Tais evidências motivaram investigações sobre possíveis fontes e rotas de infecção por estas bactérias (FALKINHAM III, 1996).

Estima-se que 34 milhões de pessoas convivam atualmente com a Aids em todo o mundo. No ano de 2010, a doença determinou 1,8 milhão de óbitos, com 2,7 milhões de casos novos. Na América Latina e Caribe, ao redor de 1,6 milhões de indivíduos são soropositivos - dos quais 76.000 evoluíram para óbito - com estimativa de 110.000 novos casos/ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

No Brasil, desde o início da epidemia da Aids, em 1980, até junho de 2011, o país acumula 608.230 casos registrados de Aids (condição em que a doença já se manifestou). Somente em 2010, foram notificados 34.218 casos da doença no país, com taxa de incidência de 17,9/100 mil habitantes (BRASIL, 2011).

O Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica registrou, entre 2000 a 2010, que a taxa de incidência caiu na região sudeste de 24,5 para 17,6/100 mil habitantes. Em contrapartida, cresceu nas outras regiões, aumentando de 27,1 para 28,8 no sul; 7,0 para 20,6 no norte; 13,9 para 15,7 no centro-oeste; e de 7,1 para 12,6 no nordeste. Vale lembrar que a região sudeste figura como a região mais prevalente da doença no Brasil (56% da prevalência nacional) [BRASIL, 2011b]. Nota-se, de forma preocupante, a tendência de progressão da Aids no Brasil, apesar dos esforços do Ministério da Saúde em conter a doença (BRASIL, 2005a).

2.3 Produção e comercialização do leite no Brasil

A produção de leite bovino no Brasil possui duas realidades contrastantes. De um lado têm-se uma minoria de produtores especializados, com grande potencial produtivo. Do outro, encontram-se a maioria dos

produtores do país, com exploração tipo familiar, com pouca tecnificação, pequeno volume de leite produzido, comercialização deficiente e qualidade pouco controlada (NERO et al., 2004). Esse cenário segue tendência mundial nos países em desenvolvimento. Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), os pequenos produtores são responsáveis pela vasta maioria da produção leiteira nestes territórios, onde a expectativa de aumento na demanda é de 25% até 2025 (BENNETT, 2008).

A instabilidade do mercado de leite no Brasil força os pequenos produtores a procurar alternativas para o comércio de sua produção, o que inclui a venda, sem fiscalização sanitária, de leite cru ou “leite informal”, para indivíduos que dão preferência a esse tipo de leite (NERO et al., 2004). Em escala global, mais de 80% do leite consumido nos países em desenvolvimento (em média 200 bilhões de litros/ano), é comercializado informalmente pelos produtores, sem nenhum controle sanitário e/ou tratamento térmico do produto (BENNETT, 2008).

Embora haja perspectiva de aumento na formalização do comércio do leite e seus derivados, este processo deverá ocorrer de forma lenta e gradual, expondo os consumidores a sérios riscos sanitários ainda por muitos anos. A Associação Brasileira dos Produtores de Leite do Brasil (Leite Brasil), mediante análise de dados dos levantamentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), concluiu que no período entre 2000 a 2010, a produção total de leite no país alcançou crescimento de 55%, subindo para 21 bilhões de litros/ano. Desse total, o produto comercializado informalmente correspondeu a 26% (ALMÉRI, 2011).

Paralelamente, inquéritos nacionais confirmam a preferência da população pelo leite sem tratamento térmico. Em 1999, uma empresa de consultoria brasileira conduziu uma pesquisa entre 1154 indivíduos habitantes de áreas rurais em quatro regiões produtoras de leite do país, visando obter informações sobre os motivos da preferência por leite cru em substituição ao leite pasteurizado. Do total de entrevistados, 61% alegaram que o leite cru é “mais forte”, “mais nutritivo”, “mais natural”, “mais gorduroso” e “mais confiável, pela ausência produtos químicos ou água adicional”. Outros 24% informaram que compram o produto devido ao preço mais acessível. A facilidade de acesso

ao produto também foi citada como fator determinante para a aquisição do leite informal (NERO et al., 2004).

O consumo do leite que não recebeu inspeção sanitária ou tratamento térmico expõe a população ao risco de contato com espécies de *Mycobacterium* sp., havendo registros claros da ocorrência destes micro-organismos no produto (HOLSINGER et al., 1997). Roosevelt et al., 1965, recuperaram micobactérias oportunistas em mais de 55% das amostras coletas em plataformas de ordenha. Hosty e McDurmont, 1975, referem isolamento de *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens* e *M. fortuitum* em 68,8% de 51 amostras de leite cru.

Appuswami et al. (1980) obtiveram micobactérias em 4.3% dentre 209 amostras de leite coletadas em fazendas e no comércio indiano. Já Guindi et al. (1982) obtiveram, a partir de 543 amostras de tanques de resfriamento, 16 isolamentos de *M. bovis* e oito de *M. tuberculosis*. Outro estudo identificou micobactérias saprófitas em 13% de 285 amostras de leite (SANCHEZ e ROSELL, 1983). Kazwala et al. (1998) referem 3,9% de positividade em isolamentos de micobactéria a partir de 805 amostras de leite, dos quais dois isolados de *M. bovis*, além de *M. terrae*, *M. fortuitum*, *M. flavescens*, *M. gordonae* e *M. smegmatis*.

Na Coréia, Jeon et al. (2010) se propuseram a investigar o diagnóstico de tuberculose a partir de amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão, utilizando Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima (ELISA) com MPB70, considerado um dos antígenos principais de *M. bovis*. Os autores observaram soropositividade de 4,5%. Porém, neste experimento não foi aventado isolamento ou caracterização molecular do micro-organismo.

O Brasil detém o maior rebanho comercial de bovinos do mundo. Desta forma é imprescindível disponibilizar no mercado produtos de origem animal de qualidade e baixo risco sanitário para consumidores internos e externos cada vez mais exigentes (BRASIL, 2001). Partindo desta premissa, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) iniciou na década de 1990 uma discussão envolvendo diversas esferas do setor leiteiro, buscando alternativas para melhorar a qualidade do leite produzido no país (BRASIL, 2002).

Em 2002 foi publicada a Instrução Normativa (IN) número 51, revogada pela IN62 em dezembro de 2011. Dentre outras exigências, a IN62 regulamenta a conservação, coleta e transporte de leite cru refrigerado. Preconiza, ainda, que o leite deverá ser refrigerado e atingir a temperatura de 4°C (tanques de expansão) ou 7°C (tanques de imersão), nas propriedades de origem, num período não superior a três horas após o término da ordenha. Também há a permissão de tanques resfriadores coletivos, para atender a demanda dos pequenos produtores (BRASIL, 2011a). Ademais, a IN62 exige que os produtores de leite do Brasil estejam alinhados com as prerrogativas do PNCEBT, o qual determina os métodos de diagnóstico e eutanásia de bovinos e bubalinos acometidos pela tuberculose, visando reduzir a prevalência da doença no país (BRASIL, 2006).

Desta forma, a pesquisa de micobactérias em leite oriundos de tanques de expansão desponta como procedimento importante na vigilância epidemiológica da doença no país. Considerando o impacto da tuberculose e das micobacterioses como infecções transmitidas pelo leite, a exigência do controle da tuberculose pela IN62 do MAPA, a alta demanda e os riscos do consumo do leite informal no Brasil; o presente estudo objetivou nova perspectiva de diagnóstico micobacteriano: o uso de leite coletivo bovino para avaliação do risco de contato com estes micro-organismos.

Artigo Científico

3. Artigo científico

O artigo está de acordo com as normas da revista "*BMC Veterinary Research*"

BMC Veterinary Research instructions for authors

Research articles

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from BioMed Central customer support team. See 'About this journal' for information about policies and the refereeing process. We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our page.

Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on meta-analyses of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in 'About this journal'.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)
- DeVice Independent format (DVI)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile. If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format. If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file.

Publishing Datasets

Through a special arrangement with LabArchives, LLC, authors submitting manuscripts to BMC Veterinary Research can obtain a complimentary subscription to LabArchives with an allotment of 100MB of storage. LabArchives is an Electronic Laboratory Notebook which will enable scientists to share and publish data files in situ; you can then link your paper to these data. Data files linked to published articles are assigned digital object identifiers (DOIs) and will remain available in perpetuity. Use of LabArchives or similar data publishing services does not replace preexisting data deposition requirements, such as for nucleic acid sequences, protein sequences and atomic coordinates.

Instructions on assigning DOIs to datasets, so they can be permanently linked to publications, can be found on the LabArchives website. Use of LabArchives' software has no influence on the editorial decision to accept or reject a manuscript.

Authors linking datasets to their publications should include an Availability of supporting data section in their manuscript and cite the dataset in their reference list.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given below.

Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Veterinary Research* should be divided into the following sections (in this order):

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Background
- Results and discussion
- Conclusions
- Methods (can also be placed after Background)
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Authors' information
- Acknowledgements
- Endnotes
- References
- Illustrations and figures (if any)
- Tables and captions
- Preparing additional files

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), DNA Data Bank of Japan (DDBJ), GenBank at the NCBI (GenBank), Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR) and the Swiss-Prot Protein Database (Swiss-Prot).

You can download a template (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article.

For reporting standards please see the information in the About section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

Methods

The methods section should include the design of the study, the type of materials involved, a clear description of all comparisons, and the type of analysis used, to enable replication.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see 'About this journal'.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in 'About this journal'.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible. Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- BibTeX
- EndNote style file
- Reference Manager
- Zotero

Examples of the *BMC Veterinary Research* reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the *BMC Veterinary Research* reference style:

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs**. *Nat Genet* 1996,**13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction**. *Proteins* 1999,**43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide**. *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]**. *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms**. In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates**. In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology**. In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]

Link / URL with author(s)

Neylon C: Open Research Computation: an ordinary journal with extraordinary aims. [http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open_research_computation_an_ordinary]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): Genome data from sweet and grain sorghum (Sorghum bicolor). *GigaScience*.<http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our figure preparation guidelines for detailed instructions on maximising the quality of your figures.

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used.

Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image).

Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a portrait page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *BMC Veterinary Research* does not restrict the length and quantity of data included in an article, there may still be occasions where an author wishes to provide data sets, tables, movie files, or other information as additional files. Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *BMC Veterinary Research* requires that all supplementary data are included as additional files rather than as a link to your own website. These files can be uploaded using the 'Additional Material files' button in the manuscript submission tool.

The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files will be linked to the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the article. They will be made available in exactly the same form as originally provided by the authors.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text, immediately following the tables (if any):

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the three-letter file extension (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation: PDF (Adobe Acrobat)
- Animations: SWF (Shockwave Flash)
- Movies: MOV (QuickTime), MPG (MPEG)
- Tabular data: XLS, XLSX (Excel Spreadsheet), CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *BMC Veterinary Research* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is also no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be numbered in the order in which they are referred to in the text. Authors should include all relevant supporting data with each article.

BMC Veterinary Research will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Language editing

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends Edanz. BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact Edanz directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on Writing titles and abstracts for scientific articles.

Tim Albert has produced for BioMed Central a list of tips for writing a scientific manuscript. American Scientist also provides a list of resources for science writing.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *BMC Veterinary Research* reference format.
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**
- Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics, and authors are required to use approved gene symbols, names, and formatting. Protein products should be in plain type.

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

Artigo a ser enviado para a revista “*BMC Veterinary Research*”

Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil.

Marília Masello Junqueira Franco^{1*} (e-mail: marilia_gu@uol.com.br)

Antonio Carlos Paes¹ (e-mail: paesacmi@fmvz.unesp.br)

Márcio Garcia Ribeiro¹ (e-mail: mgribeiro@fmvz.unesp.br)

José Carlos de Figueiredo Pantoja¹ (e-mail: pantoja@fmvz.unesp.br)

Adolfo Carlos Barreto Santos² (e-mail: adolfo.barreto@terra.com.br)

Marcelo Miyata² (e-mail: marcelo_miyatabr@yahoo.com.br)

Clarice Queico Fujimura Leite² (e-mail: leitecqf@fcar.unesp.br)

Rodrigo Garcia Motta¹ (e-mail: farturavetufpr@hotmail.com)

Fernando José Paganini Listoni¹ (e-mail: fernando.listoni@fmvz.unesp.br)

¹ Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Univ Estadual Paulista, Box 560, 18618-970, Botucatu, State of Sao Paulo, Brazil

² Laboratory of Micobacteriology, School of Pharmacy Sciences, UNESP – Univ Estadual Paulista, 14800-901, Araraquara, State of Sao Paulo, Brazil

*Corresponding author: Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP – Univ Estadual Paulista, Box 560, 18618-970, Botucatu, State of Sao Paulo, Brazil. E-mail: marilia_gu@uol.com.br

Abstract

Background

Mycobacterium spp. is one of the most important species of zoonotic pathogens that can be transmitted from cattle to humans. The presence of these opportunistic, pathogenic bacteria in bovine milk has emerged as a public-health concern, especially among individuals who consume raw milk and related dairy products. To address this concern, the Brazilian control and eradication program, focusing on bovine tuberculosis, was established in 2001. However, bovine tuberculosis continues to afflict approximately 1,3% of the cattle in Brazil. In the present study, 300 samples of milk from bovine herds, obtained from both individual and collective bulk tanks and informal points of sale, were cultured on Löwenstein-Jensen and Stonebrink media. Polymerase chain reaction (PCR)-based tests and restriction-enzyme pattern analysis were then performed on the colonies exhibiting phenotypes suggestive of *Mycobacterium* spp., which were characterized as acid-fast bacilli.

Results

Of the 300 bovine milk samples that were processed, 24 were positively identified as *Mycobacterium* spp. Molecular identification detected 15 unique mycobacterial species: *Mycobacterium bovis*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, *M. duvalii*, *M. haemophilum*, *M. immunogenum*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. novocastrense*, *M. parafortuitum*, *M. smegmatis*, *M. terrae* and *M. vaccae*. The isolation of bacteria from the various locations occurred in the following proportions: 9% of the individual bulk-tank samples, 7% of the collective bulk-tank samples and 8% of the informal-trade samples. No statistically significant difference was observed between the presence of *Mycobacterium* spp. in the three types of samples collected, the milk production profiles, the presence of veterinary assistance and the reported concerns about bovine tuberculosis prevention in the herds.

Conclusion

The microbiological cultures associated with PCR-based identification tests are useful tools for the investigation of the presence of *Mycobacterium* spp. in milk samples. Using these methods, we found that the Brazilian population may be regularly exposed to mycobacteria by consuming

raw bovine milk and related dairy products. This finding reinforces the necessity of further studies on the presence of *Mycobacterium* spp. in milk and milk-based products.

Keywords

Mycobacterium spp., bovine, raw milk, bulk tanks, public health, Brazil

Background

Milk is an important source of proteins, sugars, lipids and other nutrients for humans. However, these nutrients can also serve as substrates for pathogenic microorganisms. The traditional consumption of homemade dairy products, and especially cheeses, that are composed of non-heat-treated milk poses a serious risk to public health [1]. It is estimated that more than 90% of all of the cases of illness related to the consumption of dairy products are of bacterial etiology, and at least 21 different diseases of this type have been identified [2].

Over the last three decades, approximately 75% of emerging infectious diseases in humans have been zoonoses. The increasing interdependence of humans on animals and animal products has been determined to be the most critical risk factor for such infectious diseases [3]. Mycobacterial infections are among the most debilitating conditions affecting humans and animals because these infections are both chronic and progressive [4]. Among such infections, tuberculosis is one of the main zoonotic diseases transmitted by bovine milk [5].

Microorganisms of the *Mycobacterium* genus, such as *Mycobacterium bovis*, are highly able to survive in bovine milk and other dairy products. These microbes can be found in the form of viable bacilli in cream cheese and yogurt produced from raw milk for over 14 days and in butter for over 100 days [6]. Recently, the presence of these opportunistic, pathogenic bacteria in milk has emerged as a public-health concern, especially among individuals who consume raw milk and related dairy products [2].

Considering these health concerns and international trade requirements, many countries have implemented national programs for the control and eradication of bovine tuberculosis [7]. In Brazil, the National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis

(‘Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose’ - PNCEBT) was established in 2001, with the aim of reducing the incidence of tuberculosis in bovine and bubaline herds [8]. Brazilian legislative measures now require the regulation of the storage, collection and transport of refrigerated raw milk [9]. The country has also established a National Program of Milk Quality to increase the quality of milk production. Despite this program, however, small farmers are still selling unpasteurized milk that has not undergone sanitary inspection to individuals who prefer this type of dairy product. National surveys have confirmed the habit of consumption of milk without any heat treatment [10], and there are no validated laboratory methods that allow the certification of such untreated milk or dairy products as “free of viable mycobacteria” [6].

The aim of the current study was to investigate the occurrence of mycobacteria in bovine raw-milk samples, obtained from both individual and collective bulk tanks and informal trade in the southeast region of Sao Paulo, Brazil, using microbiological cultures and polymerase chain reaction (PCR)-based testing. The specific objectives of this study included the comparison of the presence of mycobacteria in various sample types, the use of bovine milk samples from herds to evaluate the risk of human contact with these bacteria and the use of PCR and restriction-enzyme pattern analysis (PRA) to identify the *Mycobacterium* spp.

Methods

Enrolled farms

This study included small- and medium-sized farms in the southeast region of Sao Paulo state, a major milk-producing area of Brazil, inserted into the largest national consumer market. The farms, which were randomly chosen, used either automatic or manual milking systems and possessed between two and 200 lactating animals. The herds were composed of the Holstein, Jersey or Girolando breeds or of crossbreeds with the ability to produce milk and exhibited a median milk production of 12 liters per day.

Epidemiological data on the herds were obtained using a questionnaire administered to farmers and milk-sellers that requested information on the following: the city where the farm was

located, the type of milking system, the daily total volume milked (in liters), the mean volume milked (in liters), the number of lactating animals, the breeds of the lactating animals, the presence or absence of veterinary assistance and whether there were concerns about tuberculosis prevention in the herd. In the case of collective bulk tanks, which are used by more than one farmer to deliver milk, the number of delivering producers per bulk tank was also ascertained.

Sample collection

One hundred samples were collected directly from the individual bulk tanks, and 100 were collected from the collective bulk tanks. One hundred samples were also collected at informal points of sale in the same region. In this case, milk was bought directly from informal sellers. This sample collection included 25 different cities in the southeast region of Sao Paulo, Brazil.

A total volume of 100 milliliters was collected per sample, and each of the 300 samples was placed in a sterilized collection flask at the time of collection. The samples were immediately stored on ice in isothermal boxes (4 to 8 degrees Celsius) until their arrival at the Laboratory of Infectious Diseases of Animals at the School of Veterinary Medicine and Animal Science of Sao Paulo State University (UNESP).

Mycobacterial cultures

To avoid contamination or biological risk, the samples were processed in a class II biological safety cabinet that had been cleaned with 10 percent sodium hypochlorite and 70 percent alcohol, followed by exposure to ultraviolet light for 30 minutes, with the air circulation system turned on. An 8-milliliter aliquot of each sample was then transferred into a screw-top centrifuge tube for high-speed centrifugation (10.000 rotations per minute for 20 minutes). During this process, the cells and fat from the samples were concentrated, and the remaining serum was removed. The Petroff decontamination method, using 4% sodium hidroxide and 4% sulfuric acid [11], was performed on the mixture of fat and protein sediment derived from each sample to be used for mycobacterial culture.

The cultures were maintained on Löwenstein-Jensen and Stonebrink media, incubated aerobically at 37 degrees Celsius for 90 days and examined weekly. Any colonies exhibiting phenotypes suggestive of mycobacteria were stained using the Ziehl-Neelsen method and maintained on the same media at room temperature and hidden from light until PRA was performed.

PCR-based species identification

For the PCR-based species identification using PRA, DNA extraction was performed by thermolysis. A loopful (10 microliters) of mycobacteria was suspended in 300 microliters of Tris-EDTA buffer (pH 8.0) in DNase/RNase-free microcentrifuge tubes, boiled for 10 minutes and frozen (-20 degrees Celsius) for 10 minutes. These boiling and freezing processes were repeated three times. To separate the DNA, the microtubes were centrifuged (12.000 rotations per minute for 5 minutes). Three microliters of the supernatant containing the DNA, 25 picomoles of each primer and 34 microliters of PCR Master Mix (2X)[™] (Fermentas[™], Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) were then combined for PCR. This reaction amplified a 439-bp fragment within the *hsp65* gene using the primers Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') and Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') [12].

The PCR protocol consisted of a denaturation step at 95 degrees Celsius for 10 minutes, followed by 45 cycles at 94 degrees Celsius for 1 minute, 60 degrees Celsius for 1 minute and 72 degrees Celsius for 1 minute and a final extension step at 72 degrees Celsius for 10 minutes (PTC-100 Thermal Cycler, MJ Research[™], Basel, Switzerland). The electrophoresis of 3 microliters of the PCR product was then performed on an agarose gel (1 percent) using a 100-bp molecular-weight marker (Invitrogen[™], Carlsbad, United States of America) to confirm the amplification of the 441-bp fragment. Ten to 15 microliters of the amplified product was digested with the BstEII and HaeIII restriction enzymes according to the manufacturer's instructions (Fermentas[™]). The resulting restriction fragments were separated by electrophoresis on an agarose gel (4 percent) using 25- and 50-bp molecular-weight markers (Invitrogen[™]). The fragment sizes were estimated using Alpha Ease-Alpha Innotech software (version 6.0) [Alpha Innotech[™], San Leandro, United States of America] and analyzed using internet Praside [13].

The amplification of the *hsp65* gene cannot differentiate between *M. tuberculosis* complex (MTBC) species due to these species' close genetic relationship. Therefore, isolates belonging to the MTBC have been analyzed by amplifying a 1020-bp fragment of the *gyrB* gene using PRA [14]. In this case, 3 microliters of mycobacterial DNA was added to 44 microliters of PCR Master Mix (2X)[™], and subjected to PCR using 10 picomoles of each of the primers MTUBf (5'–TCGGACGCGTATGCGATATC–3') and MTUBr (5'–ACATACAGTTCGGACTTGCG–3'). The PCR protocol consisted of an initial denaturation step for 10 minutes at 95 degrees Celsius; 35 amplification cycles, each consisting of 1 minute at 94 degrees Celsius, 1 minute at 65 degrees Celsius and 1,5 minutes at 72 degrees Celsius; and a final extension step of 10 minutes at 72 degrees Celsius. Electrophoresis on an agarose gel (1 percent) confirmed the amplification of the fragment. The amplicon was further digested using the restriction enzymes RsaI, TaqI and SacII according to the manufacturer's instructions (Fermentas[™]). The restriction digests were separated on an agarose gel (2 percent) using 50- and 100-bp DNA molecular-weight markers (Invitrogen[™]). The separated fragments of the *gyrB* gene were analyzed using Alpha Ease-Alpha Innotech software (version 6.0) [Alpha Innotech[™]] and compared with the patterns that were described by Chimara et al. [14].

Data analysis

For the data analysis, continuous variables were categorized based on their median values. The total volume milked per day was classified as high (>330 liters) or low (<330 liters), and the mean volume milked per day was classified as high (>12 liters) or low (<12 liters). The number of lactating animals in each herd was categorized as many (>11 cows) or few (<11 cows). Similarly, the number of farmers delivering milk to each collective bulk tank was separated into two categories: many (>14 farmers) or few (<14 farmers).

Summary statistics were calculated to describe the characteristics of the farms enrolled in the study. Chi-squared or Fisher's exact tests were used to identify the farm-related factors that were associated with the isolation of *Mycobacterium* spp. A logistic regression was then used to estimate the adjusted associations in a multivariable model, and backward variable selection

was used to select a possible final model. The data were analyzed using R software (version 2.15.1) [15].

Results and discussion

Information regarding the daily total volume milked (in liters), the mean volume milked (in liters), the number of lactating animals, the breeds of the lactating animals, the presence of veterinary assistance and whether concerns existed about the prevention of tuberculosis in the herd was obtained for 228 of the 300 samples that were collected. This information was not collected for all of the samples because the informal milk sellers were not always aware of each product's origin. The number of farmers who delivered milk to each collective bulk tank was also considered. The descriptive analyses of these data are summarized in table 1. The sampled population was highly heterogeneous, with enrolled herds ranging from two to 200 lactating animals and the total volume milked per day ranging from 15 to 3000 liters. Additionally, for the collective bulk tanks, the number of contributing farmers ranged from two to 33, with a mean of 14.52.

Of the 300 samples that were processed, 24 tested positive for *Mycobacterium* spp. Molecular methods identified 15 distinct species among the isolates, as shown in table 2. One isolate belonged to the MTBC (*M. bovis* subsp. *bovis*), and the other isolates included the environmental nontuberculous mycobacteria (NTM) *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, *M. duvalii*, *M. haemophilum*, *M. immunogenum*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. novocastrense*, *M. parafortuitum*, *M. smegmatis*, *M. terrae* and *M. vaccae*. The species that was most frequently isolated was *M. gordonae* type 9, and the second most frequent was *M. haemophilum* type 1.

Nine percent of the samples from the individual bulk tanks yielded *Mycobacterium* spp.-positive cultures, whereas 7 percent of the samples from the collective bulk tanks and 8 percent of the informal-trade samples resulted in positive cultures (table 3). No statistically significant difference was observed between the number of samples that tested positive by mycobacterial culture and the epidemiological factors that were considered. These factors included the types

of samples collected, the presence or absence of veterinary assistance on the farm, the concerns about tuberculosis prevention in the herd, the total volume milked per day, the mean volume milked per day, the number of lactating animals and the number of farmers delivering milk to each collective bulk tank, as shown in table 3.

The screening tests of milk samples has been used to limit the spread of infectious diseases [16,17], including certain diseases caused by mycobacteria, such as paratuberculosis [18]. As the use of bulk-tank milk samples for screening is less labor-intensive and more cost-effective than individual-tank sampling [19], this approach represents an important development in dairy research.

Previous studies have addressed the identification of mycobacteria in milk samples collected from both individual and collective bulk tanks. In one study, opportunistic mycobacteria were recovered from more than 55% of the samples collected from milking platforms [20]. In another study, in 1975, the presence of *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens* and *M. fortuitum* was reported in 68.8% of 51 raw-milk samples [21]. Years later, researchers isolated mycobacteria from 4.3% of 209 milk samples collected from Indian farmers and traders [22]. In yet another study, saprophytic mycobacteria were identified in 13% of 285 milk samples [23]. Species from the MTBC have also been isolated from milk; in one case, 16 isolates of *M. bovis* and 8 isolates of *M. tuberculosis* were obtained from 543 milk samples collected from bulk tanks [24]. Additionally, a study conducted in Korea demonstrated that 4.5% of the collected milk samples tested positive for *M. bovis*. However, neither molecular characterization nor microbiological cultures of the samples were included by the researchers [19]. These data agree with the results obtained in the present study, in which both saprophytic and pathogenic mycobacteria were identified in bovine milk samples.

Species from the genus *Mycobacterium* are recognized as major pathogens transmitted between the environment, wildlife, livestock and humans. *M. bovis* represents a serious problem in the international trade of animals and animal products, resulting in great economic losses to livestock [25]. Zoonotic tuberculosis in man is attributed mainly to *M. bovis* and occasionally to

M. tuberculosis, and this disease is mainly transmitted through milk. Therefore, certain habits, such as the consumption of raw bovine milk, may predispose individuals to these infections [26]. Although *M. bovis* does not multiply in milk or does so very slowly, the large number of mycobacteria that are secreted into the milk of one animal with tuberculous mastitis is generally sufficient to render the homogenized milk from 100 lactating cows [6]. Given such risks and the fact that Brazil has the largest commercial cattle herd in the world, it is essential to ensure the high quality and low health risk of animal products destined for customers, who are increasingly exigent [8].

The ability of NTM to trigger disease is clearly documented in the literature, and concern about NTM is increasing, with isolates of different species now being researched in reference laboratories. Potentially pathogenic NTM that are present in the environment can be transmitted to humans or animals and can cause the onset of infection or disease [27]. Humans and animals are constantly exposed to NTM via inhalation or ingestion, resulting in the temporary or permanent colonization of the respiratory or digestive tract [28].

M. gordonae is extremely common in the environment and has been found predominantly in water. Although *M. gordonae* is considered to be a nonpathogenic bacterial species, infections have been reported in both immunocompromised and healthy patients [29]. Similarly, *M. flavescens* and *M. lentiflavum* have been frequently identified in clinical specimens, even without direct relation to disease. Nevertheless, studies refer *M. flavescens* in association with respiratory, skin and spread infections in humans, and *M. lentiflavum* causing fatal spread infections [30]. These data highlight the need for more research on these species [29, 31].

The habitat of *M. mucogenicum* remains unclear. Evidence suggests that this species exhibits a ubiquitous distribution and that water is the main route of transmission. *M. mucogenicum* has been isolated from municipal water distribution systems, in which this microorganism can form biofilms and also infect amoebae and protozoa [28, 32]. The high resistance of this species to chlorinated disinfectants and temperature extremes is notable, as these are major factors in the ecology of *M. mucogenicum* [32]. Although clinical isolates of this species are rare, these

isolates have been associated with a wide spectrum of infections in both immunocompromised and healthy patients [30, 32].

Since the last decade, the isolation of *M. vaccae* from environmental sources (such as soil and ponds) as well as animals (such as udder and skin lesions in cattle) has been reported [30]. *M. vaccae* is considered to be a nonpathogenic type of NTM and was recently ranked as a bacterium that is beneficial to the central nervous system. More specifically, in 2010, the American Society for Microbiology reported growth stimulation in certain neuronal types and consequently increased serotonin levels and decreased anxiety in mice exposed to *M. vaccae* [33]. Similarly, *M. parafortuitum* is not considered to be a pathogenic species of NTM. Phenotypically, *M. parafortuitum* resembles *M. fortuitum*, but certain biochemical differences between the two species motivated the classification of *M. fortuitum* as a novel species in 1966 [34].

M. fortuitum has been recovered from tap water, water distribution systems and various types of soil. In humans, *M. fortuitum* is associated with skin lesions but rarely causes pulmonary lesions or spread infections [30]. This mycobacterial species is the most common type of mastitis-associated NTM and was reported to be the etiological agent in 17 cases of mastitis in cattle [35]. The bacterium has also been isolated from raw-milk samples collected from bulk tanks [36], and in Brazil, *M. fortuitum* has been isolated from milk samples from cows with a positive reaction to the tuberculin test [37]. The occurrence of chronic and fibrosing mastitis, which is associated with *Mycobacterium* spp., is typically due to the excessive intramammary use of oily or antimicrobial drugs for mastitis treatment or is secondary to severe cases of clinical mastitis, as these bacteria act as opportunistic pathogens [35, 38].

M. smegmatis also has been recovered from cattle with mastitis [39]. As the majority of the NTM, *M. smegmatis* is frequently found in water and soil [30]. Although this species may be associated with posttraumatic soft-tissue infections, *M. smegmatis* has not been described in disseminated infections, even in immunocompromised patients [30, 40].

M. immunogenum is a newly described species belonging to the *M. chelonae*-*M. abscessus* group. This species mainly causes hypersensitivity pneumonitis secondary to aerosol inhalation. *M. immunogenum* is also associated with disseminated skin infections, septic arthritis, keratitis and nosocomial infections [41, 42] and can form biofilms on environmental surfaces, such as pipes or equipment, resulting in a three- to 100-fold increase in disinfectant resistance [42].

M. haemophilum and *M. duvalii* are species associated with infection in immunocompromised patients or patients with human immunodeficiency virus (HIV) [30, 43]. In contrast, *M. intracellulare* is an etiological agent of disease in healthy patients [30] that has been found in various treated and untreated water sources, demonstrating the bacterium's ability to survive in water for extended periods [44]. This species typically causes pulmonary disease, followed by lung damage or reduced lung function, or cervical lymphadenitis, and occasionally affects children [30]. In contrast, *M. novocastrense*, first described in 1997, is rarely reported in humans, although there is evidence of this bacterium's involvement in certain diseases [45].

M. terrae is often recovered from samples of soil, water and vegetables. Initially, this species was considered to be nonpathogenic, but several reports have associated this mycobacteria with cases of tenosynovitis and joint and pulmonary infections. Although *M. terrae* is rarely associated with disseminated infection, this species exhibits relatively high resistance to antimicrobial therapy [30, 46].

The current study is the first report of the presence of *M. duvalii*, *M. haemophilum*, *M. immunogenum*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum* and *M. novocastrense* in bovine raw-milk samples. The contamination of raw milk by mycobacteria is apparently inevitable, even under sanitary conditions, due to the ubiquitous nature of these microorganisms. Only the heat treatment of raw milk using commercial pasteurization protocols ensures the adequate destruction of mycobacterial contaminants. Thus, the transmission of viable mycobacteria to humans through heat-treated bovine milk is unlikely, whereas the consumption of raw bovine milk and related dairy products represents a public-health risk [38].

The increasing number of individuals worldwide who are infected with HIV in the world predisposes the increase in the number of cases of diseases that have been recognized as emerging and re-emerging, which are mainly those diseases caused by opportunistic agents, such as *Mycobacterium* spp. For example, in many regions of the world, tuberculosis is a major cause of death in HIV-infected individuals [47]. Such mycobacterial infections in HIV patients are frequently disseminated, although the transmission route of the bacteria remains controversial. As infection can occur in the lungs and/or gastrointestinal tract of HIV patients, a wide range of mycobacterial sources and modes of transmission must be investigated [48]. In particular, unpasteurized, mycobacteria-contaminated milk poses a serious risk to HIV patients.

The ecology and physiology of mycobacteria are complex and differ between MTBC and NTM. In recent years, the intersection of human, animal and mycobacterial ecology has exposed humans and animals to mycobacteria and has impacted mycobacterial ecology [48]. Research on the possible association between mycobacteria and the epidemiological factors preceding mycobacterial infection will be necessary to reduce the risk of exposure and infection.

Conclusions

Microbiological cultures and PCR-based identification tests are useful tools for the investigation of the presence of *Mycobacterium* spp. in milk samples. Our data indicate that the Brazilian population may be exposed to mycobacteria through the consumption of raw bovine milk and related dairy products, reinforcing the necessity of further studies on the presence of *Mycobacterium* spp. in milk and milk-based products.

List of abbreviations

HIV – human immunodeficiency virus

M. – *Mycobacterium*

MTBC - *Mycobacterium tuberculosis* complex

PCR – polimerase chain reaction

PNCEBT - 'Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose'

PRA - restriction enzyme pattern analysis polymerase chain reaction

UNESP – Sao Paulo State University

NTM - environmental nontuberculous mycobacteria

FAPESP – 'Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo'

CNPq – 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico'

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Author's contributions

MMJF: Conducted the mycobacterial culture-based procedures and the molecular identification of the species. Participated in the statistical analysis of the data. Drafted the manuscript. Read and approved the final manuscript.

ACP: Conceived of and designed the study. Helped to draft the manuscript. Generally supervised the research group. Read and approved the final manuscript.

MGR: Conceived of and designed the study. Helped to draft the manuscript. Generally supervised the research group. Read and approved the final manuscript.

CQFL: Participated in the molecular identification of the species. Generally supervised the research group. Read and approved the final manuscript.

JCFP: Performed the statistical analysis of the data. Read and approved the final manuscript.

RGM: Acquired the samples and data on the population characteristics. Read and approved the final manuscript.

ACBS: Participated in the molecular identification of the species. Read and approved the final manuscript.

MM: Participated in the molecular identification of the species. Read and approved the final manuscript.

FJPL: Participated in the mycobacterial culture-based procedures. Read and approved the final manuscript.

Author's information

MMJF: M.V. M.Sc., School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University.

ACP: M.V. M.Sc. Ph.D., Professor at School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University.

MGR: M.V. M.Sc. Ph.D., Professor at School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University.

CQFL: Pharmaceutist, M.Sc. Ph.D., Professor at School of Pharmacy Sciences, Sao Paulo State University.

JCFP: M.V. M.Sc. Ph.D., Professor at School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University.

RGM: M.V. M.Sc., School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University.

ACBS: M.V. M.Sc. Ph.D., School of Pharmacy Sciences, Sao Paulo State University.

MM: Biologist M.Sc. Ph.D., School of Pharmacy Sciences, Sao Paulo State University.

FJPL: Laboratory Technician, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University.

Acknowledgements

To 'Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Sao Paulo–FAPESP' (process number 2010/18209–5) and to 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq' (process number 146975/2010-3) for the financial support.

References

- [1] Di Pinto A, Ciccarese G, Forte TV, Bijo B, Shehu F, Tantillo G: **Detection of mycobacterium tuberculosis complex in milk using polimerase chain reaction (PCR).** *Food Control* 2006,17:776-780.

- [2] Chye FY, Abdullah A, Ayob MK: **Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia.** *Food Microbiol* 2004,21:535–541.
- [3] American Veterinary Medical Association: *One health: A new Professional Imperative. One Health Initiative Task Force: Final Report. One Health World – World Health Through Collaboration*; 2008.
- [4] Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC: *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed Press, 2005.
- [5] Bernard F, Vincent C, Matthieu L, David R, James D: **Tuberculosis and brucellosis prevalence survey on dairy cattle in Mbarara Milk basin (Uganda).** *Prev Vet Med* 2005,67:267-281.
- [6] 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* 2006,86:77-109.
- [7] Boland F, Kelly GE, Good M, More SJ: **Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland.** *Prev Vet Med* 2010,93:153-161.
- [8] Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply: *Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001.*
- [9] Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply: *Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011.*
- [10] Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Netto DP, Pinto JPAN, Andrade NJ, Silva WP, Franco BDGM: **Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues.** *Braz J Microbiol* 2004,35(3):211-215.
- [11] Balian SC, Pinheiro SR, Guerra JL, Morais ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS: **Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias.** *Arq Inst Biológico* 2002,69(2):11-14.

- [12] Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Botrger EC, Bodmer T: **Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis.** *J Clin Microbiol* 1993,31:175-178.
- [13] **Prasite, Identification of Mycobacteria** [<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>]
- [14] Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC: ***Mycobacterium tuberculosis* Complex Differentiation Using *gyrB* Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004,99(7):745-748.
- [15] **R Development Core Team (2011).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [<http://www.R-project.org>]
- [16] Byrne WJ, McCormack R, Ball HJ, Brice N, Baker SE, Ayling RD, Nicholas AJ: **Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis.** *Vet Rec* 2000,146(13):368-369.
- [17] Sergeant ES, Nielsen SS, Toft N: **Evaluation of test-strategies for estimatingt probability of low prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds.** *Prev Vet Med* 2008,85:92-106.
- [18] Lombard JE, Byrem TM, Wagner BA, Mccluskey BJ: **Comparison of milk and serum enzyme-linked imunossorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in dairy cattle.** *J Vet Diagn Invest* 2006,18:448-458.
- [19] Jeon B-Y, Kim SC, Je S, Kwak J, Cho JE, Woo JT, Seo S, Shim HS, Park BO, Lee SS, Cho, SN: **Evaluation of enzyme-linked imunossorbent assay using milk samples as a potential screening test of bovine tuberculosis of dairy cows in Korea.** *Res Vet Sci* 2010,88(3):390-393.
- [20] Roosevelt JJ, Jenkins DE, Hsu KHK: **Raw milk as a source of mycobacteria.** *Can J Microbiol* 1965,12(10):979-984.

- [21] Hosty TS, MacDurmont CI: **Isolation of acid-fast organisms from milk and oysters.** *Health Lab Sci* 1975,12(1):16-19.
- [22] Appuswamy S, Batish VK, Parkashi OM, Ranganathan B: **Prevalence of mycobacteria in raw milk sampled in Karnal, India.** *J of Food Prot* 1980,43(4):778-781.
- [23] Sanchez I, Rosell R: **Principales fuentes de infeccion de micobacterias atipicas en unidades bovinas.** *Rev Cubana Cien Vet* 1983,14(1):29-33.
- [24] Guindi SM, Ahmed OL, Awad WM, El-Saban MS, Saban MA: **Incidence of bovine and human tubercle bacilli in milk and milk products.** *Agriculture Res Rev* 1980,58(1):75-84.
- [25] Briet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA: **Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC).** *Vet Res* 2004,36:411-436.
- [26] Kleeberg HH: **Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health.** *Rev Sci Tech* 1984,3:11-76.
- [27] Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo: *Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento.* 2005.
- [28] Primm TP, Lucero CA, Falkinham III JO: **Health impacts of environmental mycobacteria.** *Clin Microbiol Rev* 2004,17(1):98-106.
- [29] Weinberger M, Berg SL, Feuerstein IM, Pizzo PA, Witebsky FG: **Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case and critical review of the literature.** *Clin Infect Dis* 1992,14(6):1229-1239.
- [30] Leão SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS, Portaels F: *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*, 2004.
- [31] Suffys P, Rocha AS, Brandão A, Vanderborght B, Mijs W, Jannes G, Mello FCQ, Pedro HSP, Fonseca LS, Oliveira RS, Leão SC, Saad MHF: **Detection of mixed infections with *Mycobacterium lentiflavum* and *Mycobacterium avium* by molecular genotyping methods.** *J Med Microbiol* 2006,55:127–131.

- [32] Adékambi T. ***Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review.** *Clin Microbiol Infect* 2009,15(10):911-918.
- [33] **Can bacteria make you smarter?** [<http://www.sciencedaily.com>]
- [34] Gangadharam PRJ, Jenkins PA: *Mycobacteria: Basic aspects*. New York: Chapman & Hall. 1998.
- [35] Wetzstein M, Greenfield J: **Mastitis caused by a *Mycobacterium* sp.** *Can Vet J* 1992,33,(9):826.
- [36] Dunn BL, Hodgson DJ: **“Atypical” mycobacteria in milk.** *J Appl Bacteriol* 1982,52(3):373-376.
- [37] Pardo RB, Langoni H, Mendonça LJP, Chi KD: Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2001,38(6):284-287.
- [38] Holsinger VH, Rajkowski KT, Stabel JR: **Milk pasteurization and safety: a brief history and update.** *Sci Tech Rev* 1997,12(2):441-451.
- [39] Richardson A: **Bovine mastitis associated with *Mycobacterium smegmatis* and an untypable *Mycobacterium*.** *Vet Rec* 1970,86:497-498.
- [40] Bohsali A, Abdalla H, Velmurugan K, Briken V: **The non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and *M. fortuitum* induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway.** *BMC Microbiol* 2010,10:237.
- [41] Sampaio JLM, Nassar Jr. D, De Freitas D, Höfling-Lima AN, Miyashiro K, Alberto FL, Leão SC: **An Outbreak of Keratitis Caused by *Mycobacterium immunogenum*.** *J Clin Microbiol* 2006,44(9):3201-3207.
- [42] Falkinham III JO: **Effects of Biocides and Other Metal Removal Fluid Constituents on *Mycobacterium immunogenum*.** *Appl Environ Microbiol* 2009,75(7):2057–2061.

- [43] Singh S, Krishnamoorthy G, Shahdad S, Kaur M, Singh B, Sharma P: **Nontuberculous infections in Indian AIDS patients detected by a novel set of ESAT-6 polimerase chain reaction primers.** *Jpn J Infect Dis* 2007,60:14-18.
- [44] Tuffley RE, Holbeche JD: **Isolation of the *Mycobacterium avium-M. intracellulare-M. scrofulaceum* Complex from tank water in Queensland, Australia.** *Appl Environ Microbiol* 1980,39(1):48-53.
- [45] Shojaei H, Hashemi A, Heidarieh P, Naser AD: ***Mycobacterium novocastrense*–associated pulmonary and wound infections [letter].** *Emerg Infect Dis* 2011,17(3):550-551.
- [46] Smith S, Lindholm-Levy, P, Huitt GA, Heifets LB, Cook JL: ***Mycobacterium terrae*: Case Reports, Literature Review, and In Vitro Antibiotic Susceptibility Testing.** *Clin Infect Dis* 2000, 30(3):444-453.
- [47] Washington W, Stephen A, William J, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G: *Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.
- [48] Falkinham JO: **Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria.** *Clin Microbiol Rev* 1996, 9:177-215.

Tables and captions

Table 1. Population characteristics of 228 enrolled farms on southeast region of Sao Paulo state, Brazil

	Mean	SD	Median	Min	Max
Total volume milked/day (litres)	443.95	397.15	330	15	3000
Mean volume milked/day (litres)	25.31	25.05	12	2	125
Lactating animals	23.53	27.73	11	2	200
Farmers/collective bulk tank	14.52	7.62	14	2	33

SD = Standard Deviation

Min = Minimum value

Max = Maximum value

Table 2. *Mycobacterium* spp. isolated from 300 bovine raw milk samples on Sao Paulo state, Brazil

	Individual bulk tanks	Collective bulk tanks	Informal trade
<i>M. bovis</i> subsp <i>bovis</i>	01/100	-	-
<i>M. duvalii</i> type 1	-	01/100	-
<i>M. flavescens</i> type 1	-	01/100	-
<i>M. fortuitum</i> type 1	01/100	-	-
<i>M. gordonae</i> type 1	01/100	-	-
<i>M. gordonae</i> type 2	01/100	-	-
<i>M. gordonae</i> type 9	03/100	-	01/100
<i>M. haemophilum</i> type 1	-	01/100	02/100
<i>M. immunogenum</i> type 1	-	-	02/100
<i>M. intracellulare</i> type 1	01/100	-	-
<i>M. lentiflavum</i> type 2	-	-	01/100
<i>M. mucogenicum</i> type 2	01/100	-	-
<i>M. novocastrense</i> type 1	-	02/100	-
<i>M. parafortuitum</i> type 1	-	01/100	-
<i>M. smegmatis</i> type 1	-	01/100	-
<i>M. terrae</i> type 3	-	-	01/100
<i>M. vaccae</i> type 1	-	-	01/100

Table 3. Univariate analysis of risk factors for the isolation of *Mycobacterium* spp

Risk Factors	Isolation of <i>Mycobacterium</i> spp			P-value*
	n	%	Total	
Milk sample origin				0,87
Individual bulk tank	9	9	100	
Collective bulk tank	7	7	100	
Informal trade	8	8	100	
Veterinary Assistance				0,36
Individual bulk tank	55	55	100	
Collective bulk tank	35	35	100	
Informal trade	3	11	28	
Concerns on bovine tuberculosis prevention				0,24
Individual bulk tank	42	42	100	
Collective bulk tank	32	32	100	
Informal trade	4	14	28	
Total volume milked/day				0,18
High	113	49	228	
Low	115	50	228	
Mean volume milked/day				0,43
High	114	50	228	
Low	114	50	228	
Lactating animals				0,87
Many	116	51	228	
Few	112	49	228	
Farmers/collective bulk tank				0,86
Many	54	54	100	
Few	46	46	100	

*Pearson's Chi-squared test, association with *Mycobacterium* spp. isolation

Discussão Geral

4. DISCUSSÃO GERAL

Diferentes testes diagnósticos utilizando amostras de leite tem sido utilizados visando o controle de doenças infecciosas (BYRNE et al., 2000; SERGEANT et al., 2008), incluindo infecções por *Mycobacterium* sp., como a paratuberculose (LOMBARD et al., 2006). No Brasil, o teste do anel em leite é um exemplo típico e oficial desta abordagem diagnóstica, destinado à brucelose bovina, inclusive podendo ser executado a partir do leite de rebanho, diretamente dos tanques resfriadores (BRASIL, 2001). A triagem de doenças infecciosas com uso de leite dos tanques de expansão é menos laboriosa e apresenta melhor custo-benefício se comparada aos testes individuais (JEON et al., 2010).

Até o presente momento não existem métodos laboratoriais validados que permitam a certificação de laticínios sem tratamento térmico como “livres de micobactérias viáveis” (DE LA RUA-DOMENECH, 2006). No entanto, estudos pontuais tem abordado a determinação de micobactérias em amostras de leite.

A contaminação do leite cru por micobactérias aparentemente é inevitável, mesmo com boas práticas sanitárias, devido ao caráter ubiquitário destes micro-organismos. O tratamento térmico do leite cru usando os protocolos comerciais de pasteurização garante destruição adequada de micobactérias contaminantes. A transmissão de micobactérias viáveis aos humanos através do leite submetido à inativação térmica de micro-organismos é improvável. É o consumo do leite cru, bem como seus derivados, que representa risco sanitário (HOLSINGER et al., 1997).

Estudos em vários países têm enaltecido a preocupação com a presença de micobactérias em amostras de leite bovino, bem como a viabilidade do cultivo microbiológico como método diagnóstico, tanto em amostras individuais quanto em tanques de expansão (HOLSINGER et al., 1997). Os achados da literatura referem presença de micobactérias patogênicas e/ou saprófitas em leite, envolvendo tanto amostras individuais quanto o leite de rebanho (ROOSEVELT et al., 1965; HOSTY e McDURMONT,

1975; APPUSWAMI et al., 1980; GUINDI et al., 1982; SANCHEZ e ROSELL, 1983; KAZWALA et al., 1998; JEON et al., 2010).

Nos tanques de expansão e leite informal amostrados no presente estudo, obteve-se isolamento micobacteriano em 24 (8%) das 300 amostras processadas, representados por 15 espécies do gênero *Mycobacterium*.

Dentre os isolamentos obtidos, um pertenceu ao MTBC (*M. bovis* subsp *bovis*), obtido a partir de amostra de tanque de expansão individual. Segundo De La Rua-Domenech (2006), *M. bovis* praticamente não se multiplica no leite, ou o faz de maneira extremamente lenta. Em contrapartida, o grande número de micobactérias eliminadas pelo leite de uma única fêmea com mastite tuberculosa é geralmente suficiente para tornar infectante o leite homogeneizado de 100 vacas lactantes. Tal fato ilustra o risco sanitário representado pela ingestão de leite e seus subprodutos sem tratamento térmico ou sem inspeção sanitária, reconhecidos como fatores predisponentes para o estabelecimento da tuberculose por *M. bovis* (COSIVI et al. 1998).

Os demais isolados pertencem ao grupo das NTM (*M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. flavescens*, *M. duvalli*, *M. haemophilum*, *M. immunogenum*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. novocastrense*, *M. parafortuitum*, *M. smegmatis*, *M. terrae* e *M. vaccae*). A espécie mais frequentemente encontrada foi *M. gordonae*, em seus tipos 1, 2 e 9.

M. gordonae é extremamente comum no ambiente, encontrada predominantemente na água. Embora seja considerada não patogênica, casos de infecção em humanos tem sido reportados, tanto em pacientes imunocomprometidos quanto saudáveis, alertando para a necessidade de mais pesquisas envolvendo a espécie (WEINBERGER et al., 1992). De maneira similar, *M. flavescens* tem sido encontrada com certa frequência em espécimes clínicos, mesmo sem relação direta com condição de doença. Em contraste, relatos referem *M. flavescens* em associação com infecções respiratórias, cutâneas e disseminadas em humanos (LEÃO et al., 2004).

Paralelamente, *M. lentiflavum* tem sido objeto de estudo em diversos espécimes clínicos, incluindo esputo, casos de doença pulmonar crônica e infecções disseminadas (LEÃO et al. 2004). No entanto, a determinação do reservatório ambiental desta espécie de micobactéria ainda não foi claramente

estabelecida, apesar do isolamento em água potável e amostras de solo. Em humanos, *M. lentiflavum* é descrito tanto em infecções disseminadas fatais quanto em situações não associadas à doença, reforçando a necessidade de maiores estudos epidemiológicos e de caracterização molecular (SUFFYS et al., 2006).

O habitat de *M. mucogenicum* também não está claramente determinado. Evidências sugerem distribuição ubíqua e a água como principal via de transmissão. *M. mucogenicum* foi isolado em sistemas municipais de distribuição de água, onde tem a capacidade de formação de biofilme e infecção de amebas e protozoários (PRIMM et al., 2004; ADÉKAMBI, 2009). Destacam-se a alta resistência aos desinfetantes clorados e temperaturas extremas como fatores determinantes na sua ecologia (ADÉKAMBI, 2009). Os isolados clínicos se relacionam com amplo espectro de infecções, tanto em pacientes imunossuprimidos quanto sadios, embora sejam de ocorrência rara (LEÃO et al., 2004; ADÉKAMBI, 2009).

Na última década tem-se relatado o isolamento de *M. vaccae* em fontes ambientais (como solo e lagoas) bem como em animais (úbere e lesões de pele em bovinos) [LEÃO et al., 2004]. É considerada NTM não patogênica, e recentemente foi apontada como bactéria de atuação benéfica no sistema nervoso central. Em 2010, em nota divulgada pela Sociedade Americana de Microbiologia, Matthews e Jenkins referiram estimulação no crescimento de alguns tipos neuronais, com consequente aumento nos níveis de serotonina e decréscimo de ansiedade em camundongos expostos à *M. vaccae* (ASM, 2010).

M. fortuitum já foi recuperada em amostras de água tratada e seus sistemas de distribuição, além de diversos tipos de solo. Em humanos está relacionada a infecções cutâneas, e raramente pulmonares ou disseminadas (LEÃO et al., 2004). Esta espécie é considerada a NTM mais frequentemente associada à mastite, tendo sido identificada como agente causal em surto com 17 casos de mastite bovina (WETZTEIN & GREENFIELD, 1992). Dunn e Hodgson (1982) referiram o isolamento em amostras de leite cru, proveniente de tanques de expansão e transportadores. No Brasil, foi isolada em amostras

de leite em vacas com reação positiva ao teste de tuberculinização (PARDO et al., 2001).

A ocorrência de mastite crônica e fibrosante associada à *Mycobacterium* sp. usualmente está relacionada ao uso intramamário excessivo de preparações oleosas ou antimicrobianas no tratamento intramamário da mastite (WETZTEIN & GREENFIELD, 1992). Podem, também, ocorrer secundariamente a casos severos de mastite clínica, atuando como patógenos oportunistas (HOLSINGER et al., 1997).

Fenotipicamente, *M. parafortuitum* assemelha-se ao *M. fortuitum*. No entanto, algumas variações bioquímicas, motivaram a classificação como nova espécie em 1966 por Tsukamura. Até o momento é considerada uma NTM não patogênica para humanos e animais (GANGADHARAM & JENKINS, 1998).

M. smegmatis, tem sido frequentemente isolada a partir de amostras de solo e água (LEÃO et al., 2004). Já foi isolada no leite de vacas com mastite (RICHARDSON, 1970). Muito embora possa estar associada à infecção pós-traumática de tecidos moles, *M. smegmatis* não tem sido descrita em infecções disseminadas, mesmo em pacientes imunocomprometidos (LEÃO et al., 2004; BOHSALI et al., 2010).

M. immunogenum é uma espécie recentemente descrita, que pertence ao grupo *M. chelonae-M. abscessus*. Causa, principalmente, pneumonite por hipersensibilidade secundária a inalação de aerossóis. É associada também a infecções cutâneas disseminadas, artrite séptica, ceratite e infecções hospitalares (SAMPAIO et al., 2006; FALKINHAM III, 2009). É capaz de formar biofilmes no ambiente (em superfícies ambientais, tubos ou equipamentos), tornando-se 3 a 100 vezes mais resistente aos desinfetantes (FALKINHAM III, 2009).

M. haemophilum, bem como *M. duvalii*, são espécies relacionadas à infecção em humanos imunocomprometidos ou portadores do vírus HIV (LEÃO et al., 2004; SINGH et al., 2007). Em contraste, *M. intracellulare* é agente etiológico de doença em pacientes hígidos (LEÃO et al., 2004). *M. intracellulare* tem sido isolada em diversas fontes de água, tratada ou não, evidenciando a capacidade de sobrevivência em água por longos períodos (TUFFLEY & HOLBECH, 1980). Geralmente causa doença pulmonar, seguida de danos

pré-existent e função pulmonar reduzida ou linfadenite cervical, com acometimento esporádico de crianças (LEÃO et al., 2004). Descrita pela primeira vez em 1997, *M. novocastrense* raramente é relatada em humanos, apesar de haver evidências do envolvimento em quadros clínicos (SHOJAEI et al., 2011).

M. terrae é frequentemente recuperada de amostras de solo, água e vegetais. Inicialmente foi considerada não patogênica, mas atualmente vários relatos referem esta micobactéria em infecções articulares, tenosinovites e acometimento pulmonar. Raramente é associada a casos de infecção disseminada. Apresenta relativa resistência à terapia antimicrobiana (LEÃO et al., 2004; SMITH et al., 2000).

Dentre a literatura consultada, *M. duvalli*, *M. haemophilum*, *M. immunogenum*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum* e *M. novocastrense* são notificadas pela primeira vez no leite cru de vacas. Ademais, o predomínio de NTM nas vacas, dentre a região amostrada, em detrimento do isolamento de *M. bovis* ou *M. avium*, poderia encontrar reflexo no PNCEBT, instituído no Brasil desde 2001, que exige a eutanásia de animais positivos nos testes de tuberculinização, mais sensíveis e específicos para o diagnóstico destas espécies de micobactérias. Por outro lado, a presença quase que exclusiva de NTM no leite de vacas obtido de tanques de expansão e comércio informal, pode indicar um processo de “inversão” do predomínio de infecção por estas espécies de micobactérias, em detrimento das consideradas clássicas, *M. bovis* e *M. avium*.

Em adição, a presença de NTM no leite amostrado na região, pode se constituir em fator de confusão, ou inespecífico no controle oficial no Brasil, em virtude de prováveis reações inespecíficas no alerгодiagnóstico da tuberculose bovina. As causas de reações inespecíficas nos testes de tuberculinização incluem a paratuberculose, infecção ou exposição ao MAC, micobacterioses cutâneas ou exposição às NTM. A exposição às NTM é capaz de causar sensibilização dos bovinos à tuberculina bovina (PPD-B), embora a reatividade seja de curso transitório e rápido (MONAGHAN et al., 1994).

Usualmente as infecções por NTM em humanos não são responsivas ao tratamento convencional anti-tuberculose. Com efeito, são equivocadamente

consideradas como infecções por linhagens multi-resistentes de *M. tuberculosis* nos países em desenvolvimento, com limitações de diagnóstico e de recursos direcionados à saúde. Tradicionalmente, nestes países o diagnóstico da tuberculose ainda é realizado de forma empírica, baseado apenas na avaliação clínico-radiográfica do paciente ou no exame microscópico de escarro. A deficiência de instalações adequadas para o manejo laboratorial de micobactérias em condições adequadas de biossegurança limita ou impede o cultivo micobacteriano ou outras provas diagnósticas mais específicas, resultando em subdiagnóstico dos casos de infecção por NTM em humanos (SINGH et al., 2007). De maneira similar, são escassos os estudos em outros países envolvendo o isolamento bem como a detecção molecular de NTM no leite de bovinos.

A Organização Mundial da Saúde alerta atualmente para a necessidade de ampliação do número e da capacidade dos laboratórios de diagnóstico para a tuberculose e micobacterioses. Em 2010, oito dos 22 países com altos índices de tuberculose (incluindo o Brasil), que juntos correspondem a 80% dos casos de tuberculose em nível global, não atingiram a meta de um centro de microscopia/100.000 habitantes. Combinando a lista destes 22 países com a relação de 27 países com maior número de casos de tuberculose multi-resistente, obtém-se um total de 36 nações, das quais 20 não possuem a capacidade recomendada de um laboratório capacitado para cultivo micobacteriano, tampouco de testes de susceptibilidade aos fármacos/5 milhões de habitantes (WHO, 2011).

A maioria dos estudos investigando a detecção de *Mycobacterium* sp. em leite tem utilizado amostras experimentalmente inoculadas (PÉREZ et al., 2002; DIB et al., 2006; MESSELHÄUSSER et al., 2012), em detrimento do diagnóstico de micro-organismos ambientais ou decorrentes de infecção natural. A alta resistência ambiental do gênero *Mycobacterium* aliada aos aspectos como a geração de doença crônica por parte das espécies patogênicas (com possibilidade de portadores assintomáticos por longos períodos) e a ecologia complexa das espécies ambientas (com sua ampla gama de reservatórios) representam um desafio aos profissionais da área médica (PRIMM et al., 2004; BRIET et al., 2005). Paralelamente, reforçam a

necessidade de estudos relativos à ocorrência, incidência e prevalência destes micro-organismos, bem como sua correlação com aspectos epidemiológicos (ambientais) ou de produção animal.

No presente estudo não houve associação estatística da ocorrência de micobactérias nas amostras de leite com os fatores epidemiológicos considerados, quais sejam: os três perfis diferentes de amostras (tanques individuais, tanques coletivos, leite de comércio informal); presença de assistência veterinária ao rebanho; adoção de medidas preventivas em relação à tuberculose bovina; volume diário total ordenhado; média de produção diária; número de animais em lactação no rebanho e o número de produtores envolvidos no abastecimento de cada tanque coletivo. No entanto, na literatura consultada, não foram encontrados estudos que associassem o isolamento micobacteriano em amostras de leite bovino com fatores epidemiológicos da sua produção.

Os achados do estudo sinalizam a necessidade de novas investigações visando à elucidação das potenciais vias de transmissão de *Mycobacterium* sp em vacas no Brasil, bem como alertam para os riscos em saúde pública, visto que muitas destas micobactérias são potencialmente patogênicas para humanos, e poderiam ser ingeridas em leite cru ou não tratado termicamente dos tanques ou leite informal na região estudada.

Conclusões Gerais

5. CONCLUSÕES GERAIS

Não foi observada associação entre o perfil epidemiológico dos rebanhos amostrados e o isolamento de *Mycobacterium* sp. no leite. O cultivo microbiológico e a técnica de PCR-PRA apresentaram alta concordância de resultados, reforçando a validade do cultivo microbiológico como método padrão, bem como a possibilidade de uso de métodos moleculares no diagnóstico do gênero *Mycobacterium* no leite bovino.

A investigação continuada da presença do gênero *Mycobacterium* no leite pode contribuir na melhoria da segurança alimentar inerente ao produto, bem como fornecer subsídios da presença de rebanhos infectados para o PNCEBT.

A presença de micobactérias patogênicas, potencialmente patogênicas e saprófitas em amostras de leite cru, alerta para a importância dos processos de inativação térmica de micro-organismos na cadeia produtiva de laticínios. Indica também a necessidade de esforços continuados na fiscalização sanitária destes produtos e concretização de políticas públicas que incentivem a formalização do comércio de leite e seus subprodutos no Brasil.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y los Animales. 3ª ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud. 2003. 398p.

ADÉKAMBI, T. *Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, n. 10, p. 911-918. 2009.

ALMÉRI, N. Menos Leite Informal. Disponível em <www.hojeemdia.com.br>. Acesso em: 14 jun. 2012.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. *One health: A new Professional Imperative. One Health Initiative Task Force: Final Report. One Health World – World Health Through Collaboration*. 2008. 76p.

APPUSWAMY, S.; BATISH, V.K.; PARKASHI, O.M.; RANGANATHAN, B. Prevalence of mycobacteria in raw milk sampled in Karnal, India. *Journal of Food Protection*, v. 43, n. 4, p. 778-781, 1980.

ARCHULETA, J.; MULLENS, P.; PRIMM, T.P. The relationship of temperature to desiccation and starvation tolerance of the *Mycobacterium avium* complex. *Archives of Microbiology*. v. 178, p., 311-314. 2002.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Can bacteria make you smarter? Disponível em <<http://www.sciencedaily.com>>. Acesso em: 25 set. 2012.

BALIAN, S.C.; PINHEIRO, S.R.; GUERRA, J.L.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.2, p.11-14. 2002.

BEN SALAH, I.; ADÉKAMBI, T.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology*, v. 154, p. 3715-3723. 2008.

BENNETT, A. Milk & Dairy Products. Disponível em <www.fao.org>. Acesso em: 14 jun. 2012.

BERNARD, F.; VINCENT, C.; MATTHIEU, L.; DAVID, R.; JAMES, D. Tuberculosis and brucellosis prevalence survey on dairy cattle in Mbarara Milk basin (Uganda). *Preventive Veterinary Medicine*, v. 67, p. 267-281. 2005.

BOHSALI, A.; ABDALLA, H.; VELMURUGAN, K.; BRIKEN, V. The non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and *M. fortuitum* induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway. *BMC Microbiology*, v. 10, p. 237. 2010.

BOLAND, F.; KELLY, G.E.; GOOD, M.; MORE, S.J.: Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 93, p. 153-161. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. Institui o Programa Nacional de Erradicação da Brucelose e Tuberculose. Diário Oficial da União, Brasília, p. 5, 11 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico as coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial da União, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dados e Pesquisas em Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. Brasília, 2005a. 47p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga, Manual de Bacteriologia da Tuberculose – 3ª edição. 2005b. 242p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – Manual Técnico. Brasília, 2006. 184p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, p. 6, 29 dez. 2011a. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST/Aids. Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletim Epidemiológico DST/Aids – Versão Preliminar. Brasília, 2011b. Disponível em: <www.aids.gov.br>. Acesso em: 25 abr. 2012.

BRIET, F.; BOSCHIROLI, M.L.; THOREL, M.F.; GUILLOTEAU, L.A. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*, v. 36, p.411-436. 2004.

BROSCH, R.; GORDON, S.V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, LM.; PYM, A.S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. A. New evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, v.99, p.3684-3689. 2002.

BYRNE, W. J.; McCORMACK, R.; BALL, H.J.; BRICE, N.; BAKER, S.E.; AYLING, R.D.; NICHOLAS, R.A.J. Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *The Veterinary Record*, v. 146, p. 368-369. 2000.

CHYE, F.Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M.K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, v. 21, p. 535–541. 2004.

COSIVI, O.; GRANGE, J.M.; DABORN, C.J.; RAVIGLIONE M.C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R.A.; HUCHZERMEYER, H.F.; DE KANTOR, I.; MESLIN, F.X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, p. 59-70. 1998.

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, v.53, p.1305-1314. 2003.

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, p. 77-109. 2006.

DI PINTO, A.; CICCARESE, G; FORTE, T.V.; BIJO, B.; SHEHU, F.; TANTILLO, G. Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex in milk using polimerase chain reaction (PCR). *Food Control*, v. 17, p. 776-780. 2006.

DIB, C.C.; MORAIS, Z.M.; DE SOUZA, G.O.; AMAKU, M.; BENITES, N.R.; PINHEIRO, S.R. Utilização de uma técnica rápida para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite experimentalmente inoculadas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, n.2, p.149-155. 2006.

DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH. Bacterial nomenclature Up to Date. Disponível em: <www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>. Acesso em: 28 abr. 2012.

DJELOUADJI, Z.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M.: Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemic bursts with a degrading genome. *Lancet Infectious Diseases*, v. 11, p. 641-650. 2011.

DUNN, B.L.; HODGSON, D.J. "Atypical" mycobacteria in milk. *Journal of Applied Bacteriology*, v.52, n.3, p.373-376. 1982.

EUZÉBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em: <www.bacterio.cict.fr>. Acesso em: 01 mai. 2012.

FALKINHAM III, J.O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, p. 177-215. 1996.

FALKINHAM III, J.O. Effects of Biocides and Other Metal Removal Fluid Constituents on *Mycobacterium immunogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 7, p. 2057–2061. 2009.

FALKINHAM III, J.O.; NORTON, C.D.; LeCHEVALIER, M.W. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Applied Environmental Microbiology*. v. 67, p. 1225-1231. 2001.

FITZGERALD, J.R.; MUSSER, J. M. Evolutionary genomics of pathogenic bacteria. *TRENDS in Microbiology*, v. 9, n. 11, p. 547-553. 2001.

GANGADHARAM, P.R.J.; JENKINS, P.A. *Mycobacteria: Basic aspects*. 1ª ed. Nova Iorque: Chapman & Hall. 1998. 402p.

GRANGE, J.M.: The mycobacteria. In: PARKER, M.T.; DVERDEN, B.L. (eds.) *Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity – volume 2*. 8ª ed. Philadelphia: B. C. Decker. 1990. 709p.

GUINDI, S.M.; AHMED, O.L.; AWAD, W.M.; EL-SABAN, M.S.; SABAN, M.A. Incidence of bovine and human tubercle bacilli in milk and milk products. *Agriculture Research Review*, v. 58, n. 1, p. 75-84, 1980.

HADAD, D.J.; IDE, J.; FERRAZOLI, L.; SEISCENTO, M.; TELLES, M.A.S.; MARTINS, M.C.; LEITE, O.M.; UEKI, S.Y.M. Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento. Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo. 2005. 29p.

HOLSINGER, V.H.; RAJKOWSKI, K.T.; STABEL, J.R. Milk pasteurization and safety: a brief history and update. *Scientific and Technical Review*, v. 12, n. 2, p.441-451. 1997.

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

JEON, B.-Y.; KIM, S.C.; JE, S.; KWAK, J.; CHO, J.E.; WOO, J.T.; SEO, S.; SHIM, H.S.; PARK, B.O.; LEE, S.S.; CHO, S.N. Evaluation of enzyme-linked imunossorbent assay using milk samples as a potential screening test of bovine tuberculosis of dairy cows in Korea. *Research in Veterinary Science*, v. 88, n. 3, p. 390-393. 2010.

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, n. 4, p. 233-239. 1998.

LARA, G.H.B.; RIBEIRO, M.G.; LEITE, C.Q.F.; PAES, A.C.; GUAZZELLI, A.; DA SILVA, A.V.; SANTOS, A.C.B.; LISTONI, F.J.P. Occurence of *Mycobacterium* spp. and other pathogens in lymph nodes of slaughtered swine and wild boars (*Sus scrofa*). *Research in Veterinary Science*, v. 90, p. 185-188. 2011.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA, G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*. 1ª ed. 2004. 164p.

LeDANTEC, C.; DUGUET, J.P.; MONTIEL, A.; DUMOUTIER, N.; DUBROU, S.; VINCENT, V. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from water distribution systems. *Applied Environmental Microbiology*. v. 68, p. 1025-1032. 2002.

LOMBARD, J.E.; BYREM, T.M.; WAGNER, B.A.; McCLUSKEY, B.J. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 18, p. 448-458. 2006.

McGARVEY, J.; BERMUDEZ, L.E. Pathogenesis of nontuberculous mycobacteria infections. *Clinical Chest Medicine*. v. 23. p. 569-583. 2002.

MESSELHÄUSSER, U.; KÄMPF, P.; HÖRMANSDORFER, S.; WAGNER, B.; SCHALCH, B.; BUSCH, U.; HÖLLER, C.; WALLNER, P.; BARTH, G.; RAMPP, A. Culture and Molecular Method for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk and Dairy Products. *Applied Environmental Microbiology*. v. 78, n. 1, p.295-297. 2012.

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p.111-124. 1994.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; ANDRY, N.L.; PFALLER, M.A. *Manual of Clinical Microbiology*. 9ª Ed. Washington: AFM Press, 2007. v.1, 1267 p.

NERO L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G. M. Hazards

in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 3, p. 211-215. 2004.

OSOBA, A.O. Microbiology of tuberculosis. In: MADKOUR, M. M. (ed.) Tuberculosis. 1^a ed. Berlim: Springer-Verlag. 2004. 928p.

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.

PARISH, T.; BROWN, A.C. Mycobacteria Protocols. 2^a ed. Londres: Humana Press. 2008. 456p.

PÉREZ, 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.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM III, J.O. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 17, n. 1, p.98-106. 2004.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. 1^a ed. Espanha: Wolfe Publishing, 1994. 647p.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

RICHARDSON, A. Bovine mastitis associated with *Mycobacterium smegmatis* and an untypable *Mycobacterium*. *Veterinary Record*, v. 86, p.497-498. 1970.

ROGALL, T.; FLOHR, T.; BÖTTGER, C. Differentiation of mycobacterial species by direct sequencing of amplified DNA. *Journal of General Microbiology*, v. 136, p. 1915-1920. 1990.

ROMÁN, M.C. Microbiología Clínica de las Enfermedades por Micobacterias (Tuberculosis, Lepra y Micobacteriosis). 1ª ed. Córdoba: Universidad de Córdoba, 1990. 233p.

ROOSEVELT, J.J.; JENKINS D.E.; HSU K.H.K. Raw milk as a source of mycobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 12, n. 10, p.979-984. 1965.

SAMPAIO, J.L.M.; NASSAR Jr., D.; DE FREITAS, D.; HÖFLING-LIMA, A.N.; MIYASHIRO, K.; ALBERTO, F.L.; LEÃO, S.C. An Outbreak of Keratitis Caused by *Mycobacterium immunogenum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 9, p. 3201-3207. 2006.

SANCHEZ, I.; ROSELL, R. Principales fuentes de infección de micobacterias atípicas en unidades bovinas. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*. v. 14, n. 1, p.29-33. 1983.

SERGEANT, E.S.; NIELSEN, S.S.; TOFT, N. Evaluation of test-strategies for estimating probability of low prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 85, p. 92-106. 2008.

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

SINGH, S.; KRISHNAMOORTHY, G.; SHAHDAD, S.; KAUR, M.; SINGH, B.; SHARMA, P. Nontuberculous infections in Indian AIDS patients detected by a novel set of ESAT-6 polymerase chain reaction primers. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 60, p. 14-18. 2007.

SMITH, S.; LINDHOLM-LEVY, P.; HUITT, G.A.; HEIFETS, L.B.; COOK, J.L. *Mycobacterium terrae*: Case Reports, Literature Review, and In Vitro Antibiotic Susceptibility Testing. *Clinical Infectious Diseases*, v. 30, n. 3, p.444-453. 2000.

SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K.E.; CONNEL, N.D.; KREISWIRTH, B.N.; WHITTAM, T.S.; MUSSER, J.M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of National Academy of Sciences*, v. 94, p. 9869-9874. 1997.

SUFFYS, P.; ROCHA, A.S.; BRANDÃO, A.; VANDERBORGHT, B.; MIJS, W.; JANNES, G.; MELLO, F.C.Q.; PEDRO, H.S.P.; FONSECA, L.S.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; SAAD, M.H.F. Detection of mixed infections with *Mycobacterium lentiflavum* and *Mycobacterium avium* by molecular genotyping methods. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, p. 127–131. 2006.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTRGER, E.C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 175-178.1993.

THOEN, C.O.; STEELE, J.H. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Ames: Iowa State University Press. 1995. 355p.

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

TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. Micobactérias, p.409-422. In:_____ Microbiologia. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TUFFLEY, R.E.; HOLBECHE, J.D. Isolation of the *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare*-*M. scrofulaceum* Complex from tank water in Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 48-53. 1980.

WASHINGTON, W.; STEPHEN, A., WILLIAM J.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. *Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. 1565p.

WEINBERGER, M.; BERG, S.L; FEUERSTEIN, I.M.; PIZZO, P.A.; WITEBSKY, F.G. Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case and critical review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v. 14, n. 6, p. 1229-1239. 1992.

WETZSTEIN, M.; GREENFIELD, J. Mastitis caused by a *Mycobacterium* sp. *Canadian Veterinary Journal*, v.33, n.9, p.826. 1992.

WIRTH, T.; HILDEBRAND, F.; ALLIX-BÉGUEC, C.; WÖLBELING, F.; KUBICA, T.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; RÜSCH-GERDES, S.; LOCHT, C.; BRISSE, S.; MEYER, A.; SUPPLY, P.; NIEMANN, S.: Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 9, p. 1-10. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The progress report 2011: Global HIV/AIDS response. Geneva: 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control 2011. Geneva: 2011.

VAEREWIJCK, M.J.M.; HUYS, G.; PALOMINO, J.C.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews*, v.29, p. 911–934. 2006.

YARES, M.D.; POZNIAK, A.; UTTLEY, A.H.C.; CLARKE, R.; GRANGE, J.M. Isolation of environmental mycobacteria from clinical specimens in south-east

England: 1973-1993. *International Journal of Tubercle Lung Diseases*, v1, p.75-80, 1997.

YIM, J-J.; HOLLAND, S.M. Nontuberculous Mycobacteria. *In*: MADKOUR, M. M. (ed.) Tuberculosis. 1^a ed. Berlim: Springer-Verlag. 2004. 928p.