

UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI-UNIVATES
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**ESTUDO DE UM MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE
Mycobacterium bovis BASEADO NUMA PRÁTICA DE BIOLOGIA
MOLECULAR COM AMOSTRAS DE LEITE**

Olivia Stülp

Lajeado, novembro de 2017

Olivia Stülp

**ESTUDO DE UM MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE
Mycobacterium bovis BASEADA NUMA PRÁTICA DE BIOLOGIA
MOLECULAR COM AMOSTRAS DE LEITE**

Projeto de pesquisa apresentado ao Curso de Biomedicina, da Universidade do Vale do Taquari UNIVATES, como parte dos requisitos para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Ms. Welton Everson Lüdtke

Lajeado, novembro de 2017

Estudo de um método de diagnóstico de *Mycobacterium bovis* baseada numa prática de biologia molecular com amostras de leite

Study of a diagnostic method of *Mycobacterium bovis* based on molecular biology practice with milk samples

Estudo do *Mycobacterium bovis* no leite

Olívia STÜLP. Graduanda em Biomedicina ¹

Welton Everson LÜDTKE. Mestre em genética e toxicologia aplicada. Professor dos cursos de Farmácia e Biomedicina ²

^{1,2} Universidade do Vale do Taquari (Univates)

¹ Autor correspondente: End.: Vila Arroio Bonito, B. Interior, Mato Leitão/RS. Fone: (51) 99758-2828. E-mail: oliviastulp@gmail.com

Estudo de um método de diagnóstico de *Mycobacterium bovis* baseada numa prática de biologia molecular com amostras de leite

Study of a diagnostic method of *Mycobacterium bovis* based on molecular biology practice with milk samples

Resumo: A tuberculose bovina é causada pelo *Mycobacterium bovis* e é considerada uma zoonose distribuída mundialmente sendo a espécie bovina o hospedeiro primário. **Objetivos:** Estudo do método de diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite, confrontando seu resultado com o teste PPD (*Purified Protein Derivative*). **Material e Métodos:** Trata-se de um estudo experimental em 15 amostras de leite bovino *in natura*, oriundas de vacas leiteiras positivas ao teste da tuberculina de produtores de leite dos Vales do Taquari e Rio Pardo/RS. O método de diagnóstico de *M. bovis* utilizado foi a PCR em tempo real. A análise foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor em Eldorado do Sul/RS. **Resultados:** Os resultados demonstraram a negatividade da presença de *M. bovis* em todas as amostras de leite analisadas. **Conclusão:** O presente estudo evidenciou a utilização da biologia molecular como alternativa de diagnóstico de tuberculose bovina, principalmente em amostras de leite. Uma doença que traz prejuízos aos proprietários e descrédito no mercado. Porém, o estudo não demonstrou os achados dos estudos validados na pesquisa do *M. bovis* no leite.

Palavras-chaves: Leite. *Mycobacterium bovis*. PCR, Tuberculose.

Abstract: Bovine tuberculosis is caused by *Mycobacterium bovis* and is considered a zoonosis distributed worldwide and the bovine species is the primary host. **Objectives:** To study methods of diagnosis of *Mycobacterium bovis* in milk samples, comparing their results with the PPD (*Purified Protein Derivative*) test. **Material and Methods:** This is an experimental study in 15 samples of fresh bovine milk from dairy cows positive to the tuberculin test of milk producers of the Taquari and Rio Pardo / RS Valleys. The method of diagnosis of *M. bovis* used was the molecular biology test, real-time PCR. The analysis was carried out at the Laboratory of Molecular Biology of the Desidério Finamor Veterinary Research Institute in Eldorado do Sul / RS. **Results:** The results demonstrated the negativity of the presence of *M. bovis* in all analyzed milk samples. **Conclusion:** The present study evidenced the use of molecular biology as an alternative for the diagnosis of bovine tuberculosis, especially in milk samples. A disease that brings losses to the owners and discredit in the market. However, the study did not demonstrate the findings of studies validated in *M. bovis* research in milk.

Keywords: Milk. *Mycobacterium bovis*, PCR. Tuberculosis.

Introdução

Em 1882, o médico e microbiologista alemão Robert Koch descobriu o agente causador da tuberculose (TB), uma doença infecciosa transmitida pelo ar e causada por organismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (1). As bactérias determinantes da TB são pertencentes à ordem *Actinomycetales*, da família *Mycobacteriaceae*, do gênero *Mycobacterium*. A definição do gênero é derivada do latim *fungus bacterium*, pois o *M. tuberculosis* se comporta com características similares às dos fungos quando cultivado em meio líquido. O *Mycobacterium bovis* faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e consiste em micobactérias causadoras da tuberculose em humanos, animais silvestres e domésticos (2,3).

A tuberculose bovina é causada pelo *Mycobacterium bovis* e é considerada uma zoonose distribuída mundialmente, com um desenvolvimento crônico, sendo o boi apontado como hospedeiro primário (4). O animal infectado é a principal fonte de contaminação, visto que este microrganismo é excretado e lançado ao meio ambiente, a partir do escarro, fezes, por meio do leite, urina, por corrimentos vaginais e uterinos, ou por corrimentos de linfonodos periféricos acessíveis (5).

A doença se manifesta, na maioria das vezes, no rebanho leiteiro, principalmente naqueles que vivem num sistema de confinamento, à medida que a idade do rebanho aumenta. Já em gado de corte, animais que são criados no pasto, os prejuízos e riscos são menores por serem abatidos mais cedo, logo, a exposição é menor (4,6).

Pelo fato de o leite possuir abundante composição nutricional, ele fica vulnerável ao ataque de microrganismos do meio ambiente, do próprio animal, dos humanos e dos materiais usados na ordenha (7). Pode-se, assim, estabelecer três formas de

contaminação microbiana do leite cru: pela parte interna da teta do animal; externamente, pelo seu ubre e teto; ou pelos equipamentos usados na ordenha e tanques de resfriamento (8). Desta forma, a ingestão do leite contaminado com *M. bovis* se torna a principal via de transmissão para animais e humanos (2).

Para diagnosticar a TB bovina existem diferentes métodos. O mais rotineiro é o teste que faz uso de tuberculinas sintéticas como antígeno, o *Purified Protein Derivative* (PPD) bovina e o PPD aviária, para gerar a reação cutânea ou não nos animais (7). Contudo, a biologia molecular tem proporcionado o uso da PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*) e o sequenciamento do DNA, tanto para o diagnóstico e a vigilância, quanto na epidemiologia de doenças contagiosas, além de estudos para mapear o genoma da bactéria – onde o DNA genômico utilizado pode ser obtido através do leite ou a partir de outros materiais biológicos. Sendo que amostras de leite geram menos estresse ao animal durante a coleta, e ainda permitem o uso de *pools* de amostras para diagnóstico do rebanho. Além do mais, a PCR também é usada em amostras *post mortem*, e nos produtos de origem animal para medidas sanitárias, tanto para bovinos quanto para consumidores (9,10,11).

Desta forma, considerando que o *M. bovis* pode se espalhar pelo ambiente por meio do leite contaminado, ocorrendo à transmissão à população pelo consumo do mesmo, torna-se necessário estudar métodos de diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite, confrontando seu resultado com o teste PPD (*Purified Protein Derivative*).

Material e Métodos

Trata-se de um estudo experimental, realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), em Eldorado do Sul/RS.

Foram utilizadas amostras de leite bovino *in natura*, oriundas de vacas leiteiras positivas ao teste da tuberculina de produtores de leite dos Vales do Taquari e Rio Pardo/RS, que, por livre e espontânea vontade, dispuseram-se a participar, fornecendo amostras de leite, e que responderam ao questionário aplicado com perguntas referentes à propriedade, manejo e sanidade dos animais.

As amostras foram obtidas através de ordenha manual. Primeiramente foi realizada a antissepsia da glândula mamária e, posteriormente, foram coletados aproximadamente 50ml de leite em tubo Falcon estéril. Estas amostras foram congeladas a -18°C até a preparação das mesmas no laboratório. Foi utilizado um controle positivo com cepas de *M.bovis* e um controle negativo, sem DNA.

No laboratório, as amostras de leite foram descongeladas à temperatura ambiente e identificadas. Após, deu-se início a extração do DNA, seguindo protocolo de fenol-clorofórmio proposto por Romero e Lopez-Goñi, em 1999 (12). Foram pipetados 500µL de leite em um tubo de 1,5ml e adicionado 100 µL de tampão TE 1X e 100µL de SDS 24%. As amostras foram incubadas a 80°C por 10 minutos. Adicionou-se 3,75µL de RNase (20 mg/mL) e as amostras foram incubadas a 55°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 180µL de lisozima (concentração de 0,0036 para cada 180µL de água) e incubadas a 37°C durante uma hora. Após, foram acrescentados 13µL de proteinase K (25mg/ml) e incubadas por duas horas a 55°C. Em seguida, acrescentou-se 350µL de fenol e 350µL de clorofórmio/álcool isoamílico [24:1(vol/vol)], centrifugadas a 14.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e

acrescentou-se 600µL de isopropanol absoluto. As amostras foram misturadas por inversão, a fim de precipitar o DNA, e centrifugadas a 14.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 450µL de etanol 70% para lavar o *pellet*. Após a centrifugação a 14.000 por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado. Após a secagem dos tubos, os *pellets* foram eluídos em 30µL de água ultrapura.

O DNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro de micro volumes (*L-quant, Loccus Biotechnologia, Brasil*), com comprimento de onda de ajuste automático. Para confirmar ausência de inibidores no DNA, os DNA foram submetidas à PCR a fim de amplificar o gene *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase). Para isso, foi preparada uma reação de PCR, na capela de fluxo laminar. Para a reação da PCR com volume total de 25µL, utilizou-se 1,5mM de MgCl₂, tampão de PCR 1x, 0,1mM de cada dNTP, 0,4µM de cada oligonucleotídeo, e 1U de Taq DNA polimerase. Após a adição do DNA na reação, foram submetidas a reação de amplificação em termociclador com uma etapa de 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de 95°C por 30 seg., 60°C por 30 seg. e 72°C por 50 seg., seguido de 1 ciclo final de 5 minutos a 72°C.

As amostras positivas na PCR para *GAPDH*, foram submetidas a PCR específica para *Mycobacterium bovis*; nesta reação foram utilizados os reagentes nas mesmas concentrações da PCR para *GAPDH*. No termociclador, a desnaturação foi a 95°C durante 5 minutos, mais 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 59°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, seguido de extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo (0,01 mg/µL). A eletroforese foi realizada por 30 minutos, em temperatura

ambiente, a 90V com corrente máxima de 400mA. Os resultados foram vistos através de luz ultravioleta e fotografadas por um fotodocumentador.

A PCR em tempo real foi realizada em todas as amostras com oligonucleotídeos *Myc*, como mostra a Tabela 1, para poder diferenciar os complexos *M. tuberculosis* e *M. avium* (13). De modo a complementar, as mesmas foram submetidas a PCR convencional com oligonucleotídeos específicos para *M. bovis*, como descrito por Mayer et al. (14). A reação da PCR em tempo real foi feita num volume total de 12,5µL, contendo 0,4µM de cada oligonucleotídeo, 6,25µL de *SyBR supermix* (Invitrogen, USA), 2µL de DNA e água para completar o volume. A amplificação foi realizada no equipamento *Rotor Gene* (QIAGEN) seguindo as etapas de 50°C por 2 minutos, 95°C durante 2 minutos, acompanhado de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. As leituras de fluorescência foram feitas a cada 0,3°C de aumento da temperatura, iniciando em 60°C e finalizando em 95°C foram realizados para a curva de dissociação.

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizados no trabalho

Alvo	Descrição	Oligonucleotídeos Forward (5' – 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>Myc</i>	Capazes de diferenciar entre os complexos <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. avium</i>	<i>Myc1</i> - GAGTAGGTCATGGCTCCT CC	178 (MTC)	Gómez-Laguna J, Carrasco L, Ramis G, Quereda JJ, Gómez S, Pallarés FJ
<i>Myc</i>	Capazes de diferenciar entre os complexos <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. avium</i>	<i>Myc3</i> - CATGCACCGAATTAGAACGT	257 (MAC)	Gómez-Laguna J, Carrasco L, Ramis G, Quereda JJ, Gómez S, Pallarés FJ

Resultados

Foram analisadas um total de 15 amostras de leite de bovinos positivos ao teste da tuberculina, oriundo de propriedades leiteiras dos Vales do Taquari e Rio Pardo/RS.

Em relação ao questionário aplicado com perguntas inerentes à propriedade e manejo, tratam-se de propriedades pequenas, variando entre 5 a 8 hectares, seguido de um número reduzido de animais: até 10; conseqüentemente, uma produção leiteira diária de até 150 litros. Quanto às questões de higiene, tanto dos trabalhadores quanto dos animais, a limpeza é diária. O teste da tuberculina, realizado anualmente, é mais um fator que se encontra adequado. Quando resulta em positivo, os bovinos são descartados e a entrada de novos animais é sempre acompanhada pelo teste.

Posteriormente, foi realizada a PCR a fim de amplificar o gene *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase). Os resultados obtidos confirmaram a presença do gene *GAPDH* em 13 das 15 amostras analisadas. Nas amostras 14 e 15, as bandas nem aparecem em relação as amostras 3 até 13. Enquanto que as amostras 1 e 2 do presente estudo, estavam negativas, como mostra a Figura 1.

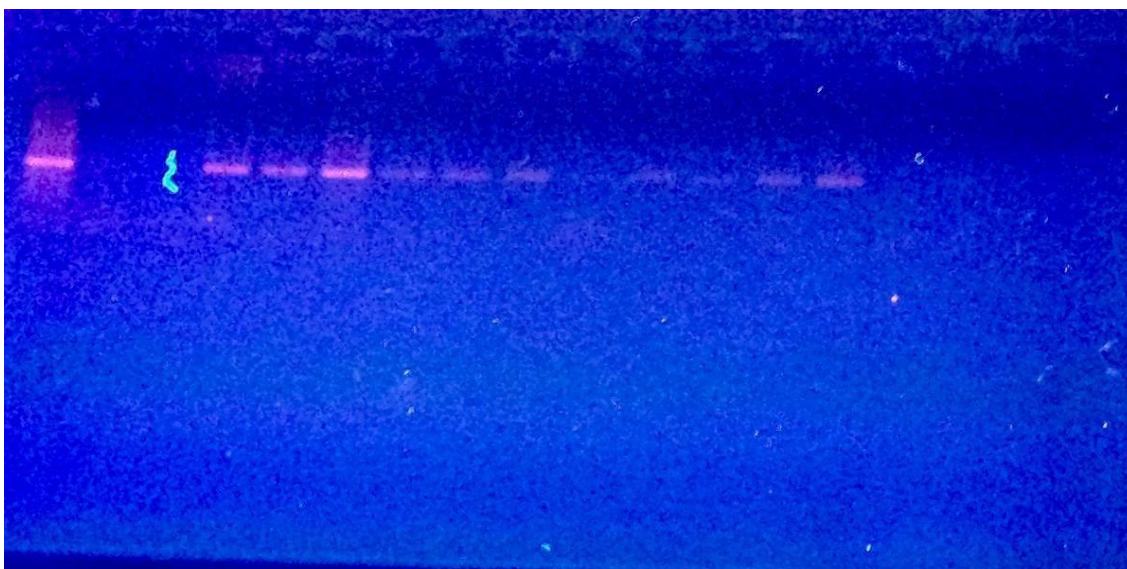


Figura 1. Resultados da PCR a fim de amplificar o gene *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase)

Em seguida, foi realizada a PCR em tempo real nas amostras positivas, com oligonucleotídeos *Myc* para diferenciar os complexos *M. tuberculosis* e *M. avium* que demonstraram negatividade em relação aos controles positivos de *M. bovis* e *M. avium*, como mostra a Figura 2.

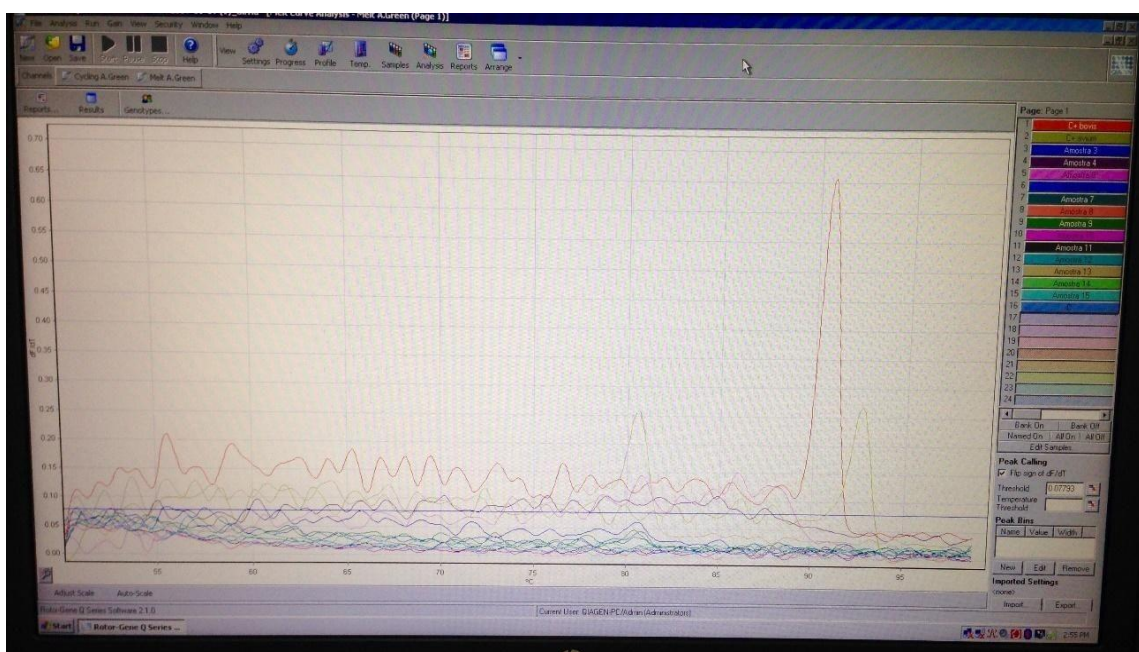
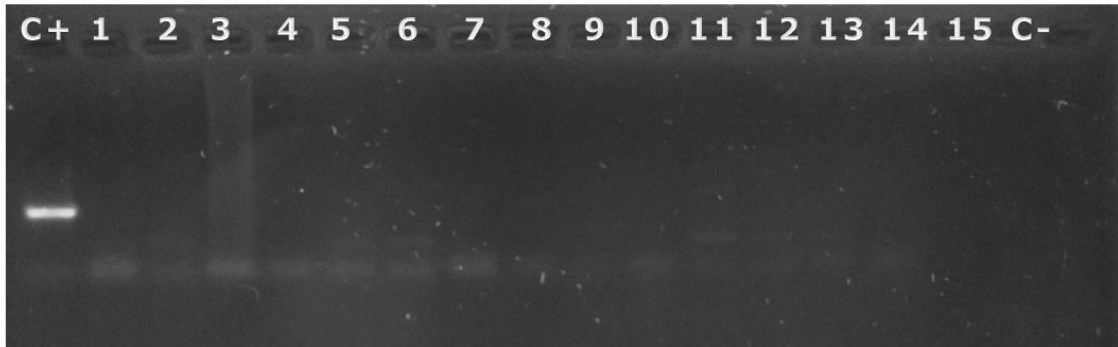


Figura 2. Resultados da PCR em tempo real com oligonucleotídeos *Myc* para diferenciar os complexos *M. tuberculosis* e *M. avium*

E por fim, a negatividade em todas as amostras analisadas também foi confirmada quando o isolado teve resultado negativo na PCR convencional para *M.*



bovis, como mostra a Figura 3 [a seguir].

Figura 3. Resultados da PCR convencional com oligonucleotídeos específicos para *M. bovis*

DISCUSSÃO

Os bovinos produtores de leite, quando infectados por *M.bovis*, geram prejuízo econômico aos produtores leiteiros, devido à queda no ganho de peso e a diminuição na produção de leite. Se diagnosticado positivo pelo teste da tuberculina, o bovino deverá ser descartado, além do mais, essas propriedades onde a doença é constada, perdem a credibilidade no mercado (15). Essa repercussão pode ser percebida nas propriedades pesquisadas neste estudo, por se tratarem de estabelecimentos pequenos, as

consequências serão imediatas. A condenação da carcaça no abatedouro, perda do bovino com valor zootécnico, e a renda da família, ou parte dela, que deixará de entrar todo mês. E como mencionado, a propriedade perderá o prestígio.

A sensibilidade ao PCR está ligada ao tipo de material que o DNA será extraído, pois amostras como o leite, normalmente, apresentam sensibilidade baixa ao teste molecular. Fatores podem influenciar, como as soluções empregadas na PCR, a lise da parede celular e também o baixo número de bacilos presentes na amostra relacionado a diferença no tempo de eliminação do bacilo pelos bovinos. O nível de desprendimento se eleva durante as primeiras quatro semanas após a exposição ao *M. bovis*; passado este tempo, começa a diminuir (16,17). Podendo ser uma hipótese da negatividade da presença do bacilo na PCR.

Pesquisadores também realizaram o método da PCR, em outras amostras, como linfonodos, secreções nasais e leite, os resultados não foram totalmente compatíveis com o teste negativo da intradermoreação. Em 52% das amostras, a PCR detectou falsos negativos do PPD (17). Outros estudos compararam as duas técnicas usando somente o leite como material de análise e também demonstraram uma maior eficiência na PCR (18). No protocolo de fenol-clorofórmio (19) para o leite, o mesmo utilizado neste trabalho, é viável para o diagnóstico pela facilidade, custo acessível e tempo de realização dos testes. O que contradiz a afirmação do autor acima, que o leite apresenta baixa sensibilidade à PCR.

Estudo realizado em 2008 (20) também mostrou que é possível identificar micobactérias do complexo *M. tuberculosis* presentes no leite, a partir da extração do DNA do leite contaminado, seguida pela identificação molecular pela PCR e análise de

restrição do fragmento amplificado (PRA) para identificar o *M.bovis*, auxiliando na identificação do bacilo em alimentos suspeitos de estarem contaminados, como o leite.

Sendo a tuberculose bovina uma doença, que pode levar a eliminação desta bactéria através do leite e no ambiente, podendo contaminar outros animais e pessoas, a busca de novos métodos de diagnóstico desta infecção é de extrema importância. Neste sentido, a utilização de métodos de biologia molecular pode ser uma alternativa para diagnóstico de infecções por *M.bovis* em animais produtores de leite, ao contrário de outros trabalhos validados para pesquisa de *M.bovis* no leite, o presente estudo não apresentou correlação entre o teste da tuberculina e a PCR. Todas as 15 amostras demonstraram negatividade ao *M.bovis* nos métodos moleculares. Vários fatores podem ter influenciado no resultado negativo do teste molecular das amostras, como os relacionados com o próprio animal como a assepsia da glândula mamária, tempo de infecção e incubação da bactéria. No leite, a maneira de coletar a amostra, tempo de armazenamento e transporte até o laboratório. Bem como o número baixo de amostras e a técnica de extração e determinação do DNA.

Conclusão

Este estudo demonstrou que a PCR não foi favorável para diagnóstico de tuberculose bovina, principalmente em amostras de leite. Uma doença que traz prejuízos aos proprietários e descrédito no mercado. Porém, o presente trabalho não demonstrou os achados dos estudos validados na pesquisa do *M. bovis* no leite. Estes resultados de bovinos negativos na PCR e positivos na PPD, podem estar relacionados com fatores

pertinente ao animal, ao bacilo, a técnica e as amostras, reforçando a continuidade de futuros estudos nesta área.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Ms. Welton Everson Lüdtke, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos muitos ensinamentos, incentivos e amizade. À Dra. Fabiana Quoos Mayer e sua doutoranda Ms. Anna Luiza Gisler Maciel pelo apoio, oportunidade, ajuda e pela cedência do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), em Eldorado do Sul/RS.

Referências

1. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report. [Internet]. 20th ed. Genebra: World Health Organization; 2015. [cited 2017 Nov 18]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf
2. Alzamora FF. Diagnóstico bacteriológico e molecular da tuberculose bovina a partir de lesões de bovinos abatidos no Estado da Bahia. [tese] Salvador: Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia; 2013. 99 p.
3. Costa ACF. Tuberculose bovina: diagnóstico anatomo-histopatológico, bacteriológico e molecular em animais abatidos na Região Metropolitana de Salvador. [Dissertação]. Salvador: Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia; 2008.
4. Abrahão RMCM. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. *Archives of Veterinary Science*. 1999; 4(1): 5-15.
5. Blood DC, Radostits OM. Clínica Veterinária. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1989.

6. Costa LBA. Tuberculose Bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia. [Dissertação]. Ondina: Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia; 2012.
7. Abrahão RMC, Nogueira PA, Malucelli MIC. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. *Archives of Veterinary Science*. 2005; 10(2): 1-17.
8. Brito JRF, Brito MAVP, Verneque RS. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. *Ciência Rural*. 2000; 30(5): 847-50.
9. Caldart ET, Chiappetta CM, Lopes EF, Ravazzolo AP. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2011; 39(1): 945.
10. Diedrich C, Pozzobon A, Kich DM, Agostini C, Bustamante FIC, Souza CFV. Detecção de *S. aureus* em amostras de leite cru. *Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr.* 2013; 24(3): 291-6.
11. Fuverki RBN, Murakami OS, Biondo AW, Barros Filho IR. Uso da PCR para detecção e identificação de microbactérias a partir de amostras clínicas de bovinos. *Archives of Veterinary Science*. 2008; 13(1): 73-7.
12. Romero C, Lopez-Goñi I. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of *Brucella* spp. by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 8(65): 3735-37.
13. Gómez-Laguna J, Carrasco L, Ramis G, Quereda JJ, Gómez S, Pallarés FJ. Use of real-time and classic polymerase chain reaction assays for the diagnosis of porcine tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of veterinary*

diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. 2010; 22(1): 123–27.

14. Mayer FQ, Cerva C, Driemeier D, Da Cruz CE, Loiko MR, Coppola MDeM, et al. *Mycobacterium bovis* infection in a collared peccary (*Tayassu tajacu*): insights on tuberculosis wild reservoirs. *Vet Microbiol.* 2012; 7;160(3-4):549-51.
15. Brasil. Ministério da Agricultura. Departamento de Defesa Animal (DDA). Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Brasília: Ministério da Agricultura; 2006.
16. Cornejo BJ, Sahagún-Ruiz A, Suárez-Güemes F, Thornton CG, Ficht TA, Adams LG. Comparison of C₁₈-Carboxypropylbetaine and Glass Bead DNA Extraction Methods for Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Milk Samples and Analysis of Samples by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998; 64(8):.3099-101.
17. Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36(4): 1050-55.
18. Kao RR, Gravenor MB, Charleston B, Hope JC, Martin M, Howard CJ. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of the Royal Society Interface*. 2007; 4(14): 545-51.
19. Jordão JCM, Lopes FCM, Pinto MRA, Roxo E, Leite CQF. Development of a PCR assay for the direct detection of *Mycobacterium bovis* in milk. *Alim. Nutr.* 2005; 16(1): 51-5.
20. Figueiredo EES, et al. Detecção do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* no Leite pela Reação em Cadeia da Polimerase seguida de Análise de Restrição do Fragmento Amplificado (PRA). *Cien Animal Bras.* 2008; 9(4): 1023-33.