

# ANÁLISE DA PRESENÇA DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO *IN NATURA* NA REGIÃO DO VALE DO TAQUARI, RS

Débora Mara Kich<sup>1</sup>, Caroline Schwertner Kreling<sup>2</sup>, Adriane Pozzobon<sup>3</sup>

**Resumo:** A região do Vale do Taquari é um importante polo de produção leiteira no Rio Grande do Sul. O leite e seus derivados são frequentemente contaminados por uma série de patógenos, entre estes, o *Mycobacterium bovis*, considerado o principal agente causador da tuberculose bovina. O presente estudo teve como objetivo analisar a presença de *Mycobacterium bovis* através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de leite bovino *in natura*, oriundas de produtores da região do Vale do Taquari, RS. Nos meses de julho a dezembro, as amostras de leite bovino *in natura* de oito produtores de médio porte foram submetidas à extração de DNA e, em seguida, foi realizada a PCR para a detecção do fragmento de 500 pb (pares de bases) correspondente ao DNA de *M. bovis*. Considerando o método de extração de DNA empregado, nenhuma das amostras foi positiva para a presença de *M. bovis* no período avaliado. Os resultados indicam que a técnica de PCR pode ser utilizada para detectar *M. bovis* em amostras de leite complementando os métodos tradicionais.

**Palavras-chave:** Leite. *Mycobacterium bovis*. PCR.

## INTRODUÇÃO

O leite bovino constitui um dos alimentos básicos da nutrição humana. Está presente na alimentação de indivíduos de todas as idades e classes sociais, principalmente, na dieta de crianças e idosos (NICOLAU et al., 2004). De acordo com VILELA et al. (2002), além da importância nutricional, a atividade leiteira tem grande importância econômica e social, principalmente na geração de empregos e de renda para a população. Os empregos gerados por esta atividade superam importantes setores como o automobilismo, a construção civil, o têxtil e o setor siderúrgico.

O Brasil é o sexto maior produtor de leite, tendo produzido, em 2007 mais de 24 bilhões de litros, o que demonstra a importância desta atividade para o país (GUIMARÃES, 2006). A região do Vale do Taquari é reconhecida como um grande polo da indústria leiteira no estado do Rio Grande do Sul (RS). Essa região apresenta um grande número de pequenos e médios produtores da indústria de laticínios, parte deles abastecedores das indústrias de grande porte encontradas na região e no estado. A microrregião Lajeado-Estrela se destaca no Rio Grande do Sul como uma das maiores produtoras de leite, ocupando a 18ª posição no *ranking* nacional, dentre as 57 microrregiões que produziram em 2007 mais de 130 milhões de litros de leite (EMBRAPA, 2011).

---

1 Acadêmica de Biomedicina, Instituição: Centro Universitário UNIVATES, RS, Brasil, email: debora\_22@ibest.com.br

2 Acadêmica de Biomedicina, Instituição: Centro Universitário UNIVATES, RS, Brasil, email: carol\_csk@hotmail.com

3 Bióloga, Doutorado em Fisiologia Humana pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professor Adjunto do Centro Universitário UNIVATES, RS, Brasil, email: pozzobon@univates.br

A riqueza nutricional do leite faz com que ele seja suscetível ao ataque de vários micro-organismos. Dessa forma, a contaminação microbiana do leite cru pode ser influenciada pela saúde da glândula mamária, pelo ambiente em que a vaca fica alojada, pela higiene durante a ordenha e pelos procedimentos realizados para a limpeza dos equipamentos de ordenha (SANTOS e FONSECA, 2001). Além disso, fatores como a temperatura e o tempo de armazenamento do leite estão diretamente relacionados com a multiplicação de micro-organismos presentes no leite (FONSECA, 1998).

A qualidade do produto final está diretamente relacionada com a presença de uma elevada carga de micro-organismos no leite ao chegar à indústria beneficiadora, pois as bactérias ali presentes podem afetar a qualidade do leite e de seus derivados, através da degradação de gorduras, de proteínas ou de carboidratos e pela produção de substâncias capazes de alterar as propriedades físico-químicas, importantes na sua manutenção (COUSIN, 1982; MA et al., 2000).

A legislação brasileira exige que o leite e seus derivados, antes de serem destinados ao consumo humano, passem pela fiscalização sanitária determinada pelo governo. O produto, *in natura*, deve passar pelo processo de pasteurização, visando à redução ou eliminação de possíveis micro-organismos patogênicos. Quando as regras de produção, embalagem, transporte e armazenamento não são respeitadas, o alimento pode se tornar um veículo de transmissão de patógenos aos consumidores. No Brasil, a Instrução Normativa nº 51, de 2002, estabelece os requisitos mínimos para a produção, identidade e qualidade do leite, que devem ser cumpridos a fim de garantir a manutenção de valores nutricionais adequados no alimento, bem como a manutenção de índices sanitários corretos (BRASIL, 2002).

Diversos estudos comprovam a presença de vários tipos de micro-organismos patogênicos em amostras de leite, Pardo et al. (2001) isolaram *Mycobacterium spp.* em 10% das amostras de leite de vacas suspeitas ou positivas para tuberculose ao teste de Stormont. No estudo realizado por Moura et al. (1993), foram isolados *Listeria spp.*, em 12,7% das amostras de leite cru e 0,9% das amostras de leite pasteurizado. Além disso, Ahmadi et al. (2010) identificaram a presença de *Staphylococcus aureus* nas amostras de leite cru coletadas de bovinos. Além desses estudos, foi demonstrada a presença de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus spp* em amostras de leite provenientes de pequenas propriedades no Estado de São Paulo. Este estudo também mostrou elevados níveis de resíduos antimicrobianos nas amostras, caracterizando a falta de controle e medidas adequadas para a produção do leite (RIBEIRO et al., 2009).

Um importante patógeno envolvido na contaminação de alimentos como o leite, é o *Mycobacterium bovis*, que pode ser transmitido ao homem através do consumo de leite e seus derivados não-pasteurizados provenientes de vacas tuberculosas e/ou através da inalação do bacilo (FIGUEIREDO et al., 2008).

A tuberculose bovina é uma zoonose causada pelo micro-organismo *Mycobacterium bovis*, cujo hospedeiro primário é o boi, mas outros mamíferos, incluindo o homem, são susceptíveis a este micro-organismo (ABRAHÃO, 1999). A doença é provocada por um bacilo que pertence ao gênero *Mycobacterium*, do qual fazem parte cerca de 70 espécies. As espécies causadoras da tuberculose clássica foram agrupadas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* da qual fazem parte: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canettii* e *M.caprae* (ARANAZ et al., 2003).

O bacilo *M. bovis* pode sobreviver fora de um hospedeiro animal, no meio ambiente, em condições favoráveis, por mais de dois anos (DUFFIELD e YOUNG, 1985), sendo resistente a diversos desinfetantes químicos, com exceção de agentes desnaturantes de proteínas como o fenol, formol, cresol e álcool.

A tuberculose apresenta elevada incidência em abatedouros e em trabalhadores rurais. Estima-se, que na América latina, cerca de 2% da tuberculose humana pulmonar e 8% de

toda tuberculose humana não pulmonar seja causada pelo *M. bovis* (COSIVI et al., 1998). Não é possível distinguir a tuberculose humana causada pelo *M. bovis* da causada pelo *M. tuberculosis*. A contaminação é comum em crianças e adolescentes pelo consumo de leite contaminado, sendo que no Brasil, cerca de 40% do leite produzido é clandestino e consumido tanto *in natura* quanto na forma de derivados como queijos e iogurtes (ABRAHÃO, 1999). A contaminação do rebanho leva a perdas econômicas, ocorrendo redução de 10 a 20% da produção de leite e ganho de peso, infertilidade e condenação de carcaças nos frigoríficos. O programa instaurado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento intitulado: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) reduziu a notificação de casos de tuberculose bovina no país (BRASIL, 2006).

Atualmente, vários métodos diagnósticos para o controle da tuberculose estão disponíveis, portanto, os resultados laboratoriais obtidos deverão sempre ser avaliados em conjunto com os achados clínicos (RUGGIERO et al., 2007). O diagnóstico *in vivo* da tuberculose bovina é realizado pelo exame clínico e o teste tuberculínico (PPD). Após a morte, é diagnosticada pelos exames histopatológicos e bacteriológicos. Cerca 30% das vacas em lactação, que se apresentam positivas ao teste da tuberculina eliminam o bacilo no leite, no entanto apenas 4% desses animais eliminam o bacilo em quantidade suficiente para ser avaliada através de cultura bacteriológica (HAMAMA, 1995). Também foi demonstrado que vacas com infecção clínica e subclínica podem excretar de  $5 \times 10^2$  a  $10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC) de *M. bovis* por mililitro de leite (HAMAMA, 1995; ZANINI et al., 1998). Além disso, bacilos exógenos provenientes de equipamentos de ordenha sujos e mal lavados podem contaminar o leite (ABRAHÃO, 2005).

Devido à grande importância desta patologia e a dificuldade de se obter um diagnóstico rápido e preciso, alguns estudos (FEKETE et al., 1992; MATAR et al., 1996; GALLIEN et al., 1998; ROMERO e LOPEZ-GONI, 1999; JORDÃO-JÚNIOR et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2008, ZUMARRAGA et al., 2012) mostram o uso de técnicas moleculares para a detecção deste e de outros micro-organismos. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na reprodução, *in vitro*, do processo de duplicação do DNA (ácido desoxirribonucléico), ou seja, através da duplicação se obtém quantidades consideráveis do DNA de interesse, sendo possível a sua identificação (WATSON et al., 2006).

Assim como outros métodos moleculares, a PCR apresenta características favoráveis para o diagnóstico rápido da tuberculose, pois reduzem o tempo para o diagnóstico de meses para alguns dias, além de apresentarem alta especificidade e sensibilidade, sendo capaz de detectar quantidades muito pequenas de bacilos vivos ou mortos na amostra (ABRAHÃO, 1999; BEIGE et al., 1995). Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo analisar a presença de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite bovino *in natura* oriundas da região do Vale do Taquari, RS.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A análise foi realizada nos meses de julho a dezembro, sendo as amostras de leite bovino *in natura* obtidas de oito produtores de médio porte da Região do Vale do Taquari, RS. A extração de DNA a partir do leite *in natura* foi feita com o Kit Comercial Chemagic (Chemagen®), conforme as instruções do fabricante, realizando-se, inicialmente, lavagens conforme o protocolo descrito por AHMADI et al. (2010). As lavagens têm a finalidade de remover as substâncias do leite, como gorduras e proteínas, que poderiam interferir no processo de amplificação pela PCR. Após o isolamento, o DNA bacteriano foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise por PCR.

A PCR foi feita utilizando a Supermix (Invitrogen®) com os seguintes *primers* específicos para a amplificação do fragmento de 500 pb (pares de bases), correspondente ao DNA de *M. bovis* (TABELA 1).

Tabela 1: sequência dos *primers* escolhidos para o estudo.

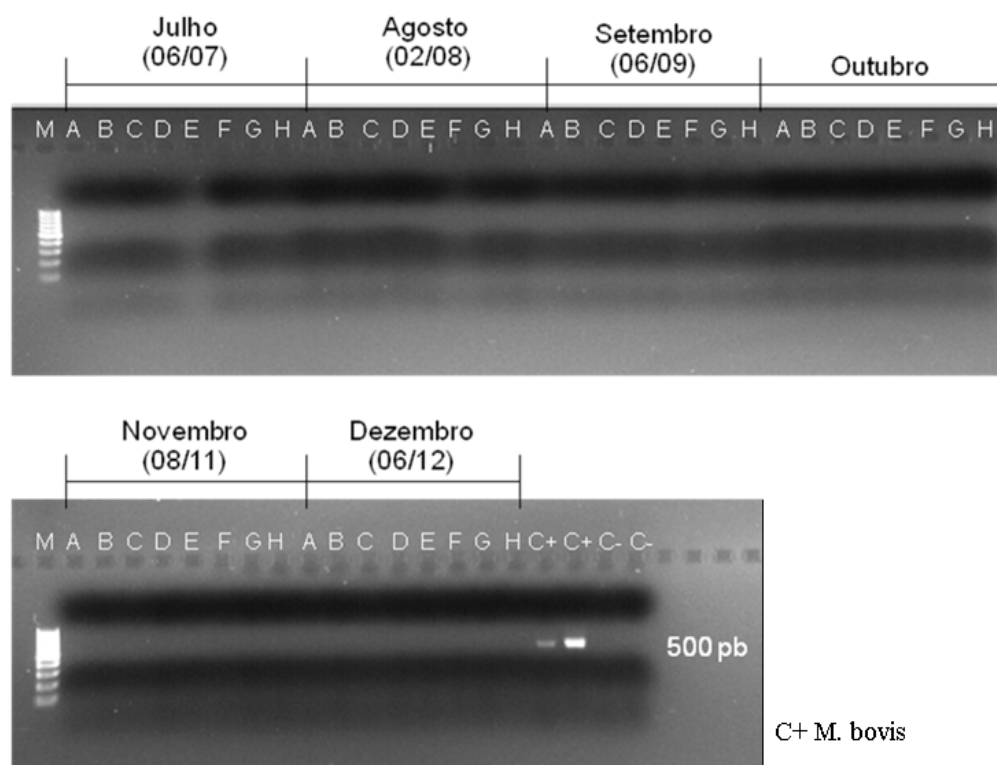
| Micro-organismo | Primers   | Fragmento amplificado | Referência                  |
|-----------------|---|-----------------------|-----------------------------|
| <i>M. bovis</i> | sense 5' TGCTCCGCTGATGCAAGTGC 3'<br>antisense 5'CGTCCGCTGACCTCAAGAAG 3' | 500 pb                | JORDÃO JÚNIOR et al., 2005. |

As ampliações foram realizadas utilizando termociclador automático TECHNE-TC512 nas seguintes condições: 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, 64°C por 60 segundos, e 72°C por 60 segundos foram precedidos por um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos e seguidos por um passo de extensão final de 72°C por 10 minutos. Para visualização do fragmento de 500 pb de *M. bovis*, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5 % . Para controle positivo, utilizou-se DNA bacteriano de *M. bovis* pronto para PCR, cedido pelo Instituto Biológico de São Paulo, SP. O controle negativo foi feito com condições iguais às demais amostras, exceto por conter água ao invés de DNA.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados deste estudo mostram que a técnica de PCR foi eficiente para a detecção de *M. bovis*, pois resultou na amplificação de um fragmento de 500 pb correspondente ao DNA de *M. bovis*. Além disso, todas as amostras de leite bovino *in natura* dos meses de julho a dezembro foram negativas para a presença de *M. Bovis* pela técnica de PCR, o que indica que as amostras de leite não estavam contaminadas pelo patógeno (FIGURA 1).

Figura 1. Detecção de *M. bovis* pela técnica de PCR utilizando o protocolo de extração do Kit Comercial Chemagic (Chemagen®). A a H= produtores, C+ = controle positivo com DNA de *M. bovis*. C- = controle negativo. M = Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); gel de agarose 1,5%.



A especificidade da sequência do DNA de *M. bovis* avaliada no presente estudo (fragmento de 500pb) foi confirmada em estudo prévio de JORDÃO-JÚNIOR et al. (2005), que utilizaram amostras de leite tipo A, contaminadas artificialmente com diferentes diluições da cepa de *M. bovis* AN5. Foi verificada a amplificação de um fragmento de 500pb correspondente a *M. bovis* até a diluição de  $10^{-4}$  UFC/mL. Outro estudo avaliou a presença de *M. bovis* e de outras micobactérias potencialmente patogênicas em amostras de tecido e leite de bovinos, através do isolamento de DNA bacteriano, entretanto, as análises foram feitas após a semeadura das amostras meio CE cultura Löwenstein-Jensen. (LEITE et al., 2003).

Além destes estudos, FIGUEIREDO et al. (2008), testaram uma metodologia que fosse capaz de identificar a presença de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* diretamente do leite. A extração do DNA bacteriano foi realizada diretamente do leite previamente contaminado com diferentes diluições de *M. bovis*. Posteriormente, realizou-se a identificação molecular do complexo *M. tuberculosis* pela reação em cadeia da polimerase, seguida da análise de restrição do fragmento amplificado (PRA), utilizada para identificar o *M. bovis*. Os resultados obtidos neste estudo mostram que as técnicas moleculares empregadas permitem a detecção de *M. bovis* diretamente do leite, de forma rápida e eficiente, mesmo que presente em concentrações muito baixas.

Ainda hoje, o teste da tuberculina é o método oficial de diagnóstico da tuberculose, portanto, a técnica de PCR surge como um complemento para os demais testes de diagnóstico da tuberculose. VITALE et al. (1998) compararam o desempenho da técnica de PCR com a necropsia de amostras de nódulo linfático, pulmão e úbere de animais que apresentavam teste tuberculínico positivo antes de serem abatidos. Nesse caso, houve uma correlação de 100% entre a necropsia e a técnica de PCR, ou seja, a infecção foi confirmada em todas as amostras analisadas.

Além disso, a PCR pode ser uma ótima alternativa, na qual a eficiência do teste tuberculínico é zero, como nos casos de tuberculose mamária (ZANINI et al., 1998). ROMERO et al. (1999) compararam a performance da técnica molecular com os testes de cultura e o teste de tuberculina (PPD) na detecção de infecções causadas pelo *M. bovis* no leite, muco nasal e sangue. As amostras de sangue, leite e muco nasal foram coletadas de cinquenta animais livres da tuberculose, ou seja, PPD negativos. Cada uma delas foi dividida em dois recipientes, um para cultura e coloração e outro para o isolamento do DNA cromossômico. Os resultados desse estudo indicam que quando comparada com as demais técnicas que obtiveram positividade para apenas uma amostra, o método molecular é mais específico e mais sensível na detecção de *M. bovis*, pois foi capaz de detectar esse micro-organismo nos 3 tipos de amostras analisadas.

A técnica de PCR é considerada uma ferramenta útil na caracterização epidemiológica de animais infectados em áreas consideradas de alto risco de transmissão de *M. bovis*, além de apresentar uma maior especificidade e sensibilidade do que os testes convencionais.

## CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados, pôde-se verificar que a técnica de PCR é um método molecular que surge como uma ótima alternativa para a redução do tempo necessário para a identificação da *M. bovis*, substituindo, desta forma, os trabalhosos e demorados métodos microbiológicos e bioquímicos utilizados na identificação dessa bactéria. Além disso, essa técnica surge como uma grande aliada para a diminuição dos casos de tuberculose bovina no país, através da análise de leite cru proveniente de vacas contaminadas com a doença.

Portanto, ainda são necessários estudos posteriores que busquem a extração de DNA de *M. bovis* em leite contaminado artificialmente, através da inoculação de diferentes concentrações de suspensões de *M. bovis* no leite, para que se possa identificar a sensibilidade do protocolo do Kit

Comercial Chemagic (Chemagen®) e desta forma, avaliar o desempenho da técnica para a detecção de *M. bovis* no leite.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs-2.2.4/index.php/veterinary/article/view/3771/3014>>. Acesso em: 03 fev. 2012.
- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary/article/view/4409/3492>>. Acesso em: 03 fev. 2012.
- AHMADI, M.; ROHANI, S. M. R.; AYREMLOU, N. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. **Comparative Clinical Pathology**, Londres, v. 19, n. 1, p. 91-94, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/dh3300g572811522.pdf>>. Acesso em 20 jul. 2011.
- ARANAZ, A.; et al. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, n. 6, p. 1785-1789, 2003. Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org/content/53/6/1785.full.pdf+html>>. Acesso em: 24 jan. 2012.
- BEIGE, J.; et al. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 1, p. 90-95, 1995. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/33/1/90.full.pdf+html>>. Acesso em: 03 fev. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 051**. 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 da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, Brasília, DF, 2002 Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>>. Acesso em: 8 ago. 2011.
- 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. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal>>. Acesso em: 05 fev. 2012.
- COUSIN, M. A. Presence and activity psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, p. 172, 1982.
- COSIVI, O; et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 1, p. 59-70, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627667/pdf/9452399.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2012.
- DUFFIELD, B. J.; YOUNG, D. A. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 193-197, 1985. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113585900215>>. Acesso em: 01 fev. 2012.
- EMBRAPA Gado de Leite. **Informações técnicas**: estatísticas do leite. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0244.php>>. Acesso em: 19 jul. 2011.

FEKETE, A.; BANTLET, J. A.; HALLING, S. M. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 4, p. 79-83, 1992. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/4/1/79.full.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2012.

FIGUEIREDO, E. E. S.; et al. Detecção do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* no Leite pela Reação em Cadeia da Polimerase seguida de Análise de Restrição do Fragmento Amplificado (PRA) **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1023-1033, out./dez. 2008. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewArticle/1381>>. Acesso em: 02 fev. 2012.

FONSECA, L. F. L. Qualidade do leite e sua relação com equipamento de ordenha e sistema de resfriamento. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba, PR. **Anais do II Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite**, Curitiba: [s.n.], p. 54-56, 1998.

GALLIEN, P.; et al. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. **Veterinary Record**, Londres, v. 142, p. 512-514, 1998. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/142/19/512.abstract>>. Acesso em: 03 fev. 2012.

GUIMARÃES, F. F. Modificação na geografia da produção mundial de leite. **Revista Napgama**, São Paulo, v. 9, p. 19-23, 2006.

HAMAMA, A. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk: by the International Dairy Federation. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 5, p. 171-172, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224400890470>>. Acesso em: 09 fev. 2012.

JORDÃO JUNIOR, C. M.; et al. Padronização da técnica de PCR na detecção de *Mycobacterium bovis* diretamente no leite. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 51-55, jan./mar. 2005. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/100/113>>. Acesso em: 02 fev. 2012.

LEITE, C. Q. F.; et al. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v98n3/a05v98n3.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2012.

MA, Y.; et al. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 264-274, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030200748739>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

MATAR, G. M.; KHNEISSER, I. A.; ABDELNIOOR, A. M. Fast laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 2, p. 477-478, 1996. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/34/2/477.full.pdf+html>>. Acesso em: 09 fev. 2012.

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brasil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 229-237, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816059390080Z>>. Acesso em: 09 fev. 2012.

NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; BORGES, G. T. *Staphylococcus aureus* no processamento de queijo mussarela: detecção e avaliação da provável origem das linhagens isoladas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 125, p. 51-56, 2004.

PARDO, R. B.; et al. Isolation of *Mycobacterium* spp. in Milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

Disponível em: <[http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?pid=S1413-95962001000600007&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?pid=S1413-95962001000600007&script=sci_arttext&tlng=en)>. Acesso em: 02 fev. 2012.

RIBEIRO, M. G.; et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 52-58, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v29n1/a08v29n1.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2012.

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**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3735-3737, 1999. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/65/8/3735.full>>. Acesso em: 03 fev. 2012.

ROMERO, R. E.; et al. Identification of *Mycobacterium bovis* in Bovine Clinical Samples by PCR Species-Specific Primers. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 63, p. 101-106, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1189527/pdf/cjvetres00010-0023.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2012.

RUGGIERO, A. P.; et al. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.55-65, 2007. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74\\_1/ruggiero.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_1/ruggiero.pdf)>. Acesso em: 09 fev. 2012.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

VILELA, D.; LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. In: Santos, G. T.; Jobim, C. C.; Damasceno, J. C. Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais do II Sul – Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.

VITALE, F.; et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1050-1055, 1998. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/36/4/1050.full>>. Acesso em: 03 fev. 2012.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P. **Biologia Molecular do Gene**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ZANINI, M. S.; et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in Milk by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlin, v. 45, p. 473-479, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0450.1998.tb00818.x/abstract>>. Acesso em: 03 fev. 2012.

ZUMÁRRAGA, M.J; et al. Detection of *Mycobacterium bovis*-Infected Dairy Herds Using PCR in Bulk Tank Milk Samples. **Foodborne Pathog Dis**. New York. v. 9. n. 2, p. 132-7, 2012.