



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS, AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA

LEONARDO ROSA DA FRANÇA

DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO E
HISTOLÓGICO DE LESÕES MACROSCÓPICAS
SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA

Cruz das Almas – Bahia

2013

LEONARDO ROSA DA FRANÇA

**DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO E
HISTOLÓGICO DE LESÕES MACROSCÓPICAS
SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do curso de mestrado profissional em Defesa Agropecuária do Centro de ciências agrárias, ambientais e biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em defesa agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

Co-orientador: Prof. Dr. Jurandir Ferreira da Cruz

Cruz das Almas – Bahia

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

F814d	<p>França, Leonardo Rosa da. Diagnóstico anatomopatológico e histológico de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina: prevalência e histopatologia de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no Sudoeste da Bahia / Leonardo Rosa da França. _ Cruz das Almas, BA, 2013. 114f.; il.</p> <p>Orientador: Robson Bahia Cerqueira. Coorientador: Jurandir Ferreira da Cruz.</p> <p>1.Bovino - Doenças. 2.Tuberculose em bovinos - Inspeção sanitária. 3.Diagnóstico - Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 636.089</p>
-------	--



Ata da Defesa de **Leonardo Rosa da França**,
aluno do Programa de Pós-Graduação do
curso de mestrado em Defesa Agropecuária da
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Aos oito dias do mês de maio de 2013 nas dependências da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em sessão pública, reuniu-se a comissão examinadora constituída pelos professores: Dr. Robson Bahia Cerqueira (orientador), Dr. Joselito Nunes Costa e Dra. Flávia Carolina Souza de Oliveira, para examinar e julgar a Dissertação intitulada: "**Diagnóstico anatomopatológico e histológico de lesões macroscópicas sugestivas de Tuberculose bovina**" de autoria do aluno regular, Leonardo Rosa da França, do Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária, Curso de Mestrado Profissional. Os trabalhos foram iniciados às 14h pelo Professor Robson Bahia Cerqueira, presidente da banca, e depois de encerradas a apresentação e arguição às 17h, os examinadores reuniram-se para avaliação do trabalho tendo o mesmo sido aprovado, de acordo com os pareceres emitidos por cada membro da banca, que serão anexados à presente ata. Proclamados os resultados pelo presidente da banca, foi encerrada a sessão, da qual é lavrado a presente ata, que após lida e aprovada é assinada pelos componentes da banca examinadora, pelo mestrando, pelo vice-coordenador do Programa e por todos presentes. Cruz das Almas, 08 de maio de 2013.

Robson Bahia Cerqueira
Presidente

Joselito Nunes Costa
Membro da Banca

Flavia Carolina Souza de
Oliveira
Membro da Banca

Leonardo Rosa da França
Mestrando

Rodrigo Fortes da Silva
Vice-Coordenador

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

MAIO – 2013

DEDICATÓRIA

À minha família, minha vida.

“Quando penso em alguém, só penso em você”.

Para Luiza.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, "Oh Senhor Jesus, Amém";

Ao meu orientador, Professor Dr. Robson Bahia Cerqueira, pelo apoio e incentivo;

Ao Professor Dr. Jurandir Ferreira da Cruz, meu co-orientador, tutor e amigo;

Aos Diretores da ADAB, Paulo Emílio Torres e Adriano Bouzas, pelo apoio funcional;

Ao Professor Pedro Miguel Ocampos Pedroso e a Professora Juliana Targino S. A. Macêdo, do Laboratório de Patologia Animal da UFRB, pela grande ajuda na realização das análises laboratoriais;

Aos alunos estagiários do Laboratório da Patologia Animal da UFRB, futuros colegas!

Aos colegas e amigos do Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária: Adriana, Alessandro, Allex, Carvalhal, Daisy, Kátia, Lúcia, Luciana, Rodrigo, Solange, Uiliam, e Weber: conseguimos!

RESUMO

FRANÇA, L. R. **Diagnóstico anatomopatológico e histológico de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina.** 114 p. 2013. Dissertação (Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária) – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

O papel de destaque que o Brasil desfruta atualmente na produção de carne bovina, implica em que este produto apresente elevada qualidade e baixo risco sanitário. Neste sentido, os matadouros frigoríficos se constituem em um relevante instrumento de vigilância epidemiológica de enfermidades, sobretudo as de caráter zoonótico, dentre as quais se destaca a tuberculose, por apresentar grande impacto econômico e na saúde pública. A inspeção sanitária em matadouros faz a condenação parcial ou total das carcaças portadoras de lesões sugestivas de tuberculose. No entanto, o diagnóstico *post-mortem* apresenta limitações, uma vez que muitos processos inflamatórios granulomatosos apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para tuberculose. O diagnóstico laboratorial, em adição aos procedimentos da inspeção, auxiliaria na tomada de decisões sanitárias, além de permitir uma avaliação mais precisa das lesões, de forma a servir de apoio ao médico veterinário inspetor. O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia dos procedimentos de inspeção na detecção de lesões sugestivas de tuberculose e determinar a prevalência dessas lesões em bovinos abatidos na região Sudoeste da Bahia. No período de março a novembro de 2012 foram inspecionados 58.268 bovinos abatidos em um matadouro frigorífico em Vitória da Conquista. A inspeção consistiu na avaliação sistemática dos gânglios linfáticos e órgãos em busca das lesões sugestivas, por meio de exame visual e tátil com posterior incisão dos gânglios linfáticos. Setenta (0,12%) animais abatidos apresentaram 99 linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose. Ao exame histopatológico, 60,6% das amostras apresentaram lesões histológicas características de processo inflamatório do tipo granulomatoso, sugestivas de micobactérias. Das amostras coradas com Ziehl-Neelsen, 10,01% apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes, sendo, portanto, positivas para micobactérias. Em conclusão a prevalência de carcaças bovinas com tuberculose no Sudoeste da Bahia é baixa e os procedimentos na rotina de inspeção *post mortem* são satisfatórios para detectar lesões sugestivas desta zoonose.

Palavras-chave: Diagnóstico, granuloma, inspeção, *Mycobacterium spp.*

ABSTRACT

FRANÇA, L. R. **Pathological and histological diagnosis of macroscopic lesions suggestive of bovine tuberculosis.** 114 p. 2013. Dissertation (Professional Masters in Agriculture Protection) – Center for Agricultural Sciences Environmental and Biological, Federal University of Bahia Reconcavo, Cruz das Almas, 2013.

The prominent role that Brazil currently enjoys in beef production implies that this product shows high quality and low health risk. In this sense, slaughterhouses constitute an important tool for epidemiological surveillance of diseases, especially zoonotic, among which stands out tuberculosis, due to its large economic and public health impact. The sanitary inspection in slaughterhouses makes the partial or total condemnation of carcasses with suggestive lesions of tuberculosis. However, post-mortem diagnosis is limited, since many inflammatory granulomatous process present morphological characteristics similar to those described for tuberculosis. Laboratory diagnosis, in addition to the inspection procedures would help in making health decisions, besides allowing a more accurate assessment of lesions in order to provide support to the veterinary inspector. The aim of this study was to verify the effectiveness of inspection procedures for the detection of suggestive tuberculosis lesions and determine the prevalence those lesions in cattle slaughtered in Southwestern Bahia. From March to November 2012, 58,268 slaughtered animals were inspected in a slaughterhouse in Vitoria da Conquista. The inspection consisted in a systematic evaluation of the lymph nodes and organs searching for suggestive lesions, through visual and tactile examination with subsequent incision of the lymph nodes. Seventy (0.12%) slaughtered animals presented 99 lymph nodes with suggestive lesions of tuberculosis. To histopathology, 60.6% of the samples had histological lesions characteristic of inflammatory granulomatous process, suggestive of mycobacteria. From samples stained with Ziehl-Neelsen, 10.01% had acid-fast bacilli resistant, and therefore positive for mycobacteria. In conclusion, the prevalence of cattle carcasses with tuberculosis in Southwestern Bahia is low and the procedures in routine post mortem inspection are satisfactory for detecting lesions suggestive of this zoonosis.

Keywords: Diagnosis, granuloma, inspection, Mycobacterium spp

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência de bovinos abatidos com lesões sugestivas de tuberculose observadas ao exame *post mortem* em Vitória da Conquista-BA.....89

Tabela 2. Distribuição de lesões sugestivas de tuberculose em linfonodos de bovinos abatidos em Vitória da Conquista-BA.....92

Tabela 3. Número de lesões características de granuloma por linfonodo em bovinos abatidos em Vitória da Conquista-BA.....93

Tabela 4. Frequência de linfonodos, por região anatômica, com lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos em Vitória da Conquista-BA....95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Municípios de procedência dos bovinos abatidos(a) e com lesões sugestivas tuberculose(b), em bovinos abatidos em Vitória da Conquista-BA...85

Figura 2. Linfonodo peitoral com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, com forma arredondada, bem delimitada, cor amarelada e consistência firme.....91

Figura 4. Fotomicrografias: a) linfonodo classificado como sugestivo. Apresenta área central de necrose circundada por infiltrado inflamatório composto principalmente por macrófagos. Coloração HE, obj. 4x. b) Evidência de Célula gigante tipo Langerhans. Coloração HE, obj. 40x.....94

Figura 4. Fotomicrografias: Evidência BAAR em coloração Zielh-Nielsen.....97

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Avidina-biotina
AG85	Antígeno micobacteriano AG85
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
CFP-10	Antígeno micobacteriano CFP-10
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
ESAT6	Antígeno micobacteriano ESAT6
FPA	Fluorescência polarizada
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Human immunodeficiency vírus
HPC	Cloreto de hexadecilpiridínio
IFN- γ	Interferon gama
IgG1	Imunoglobulina subclasse igG
MAC	Mycobacterium avium-intracellulare
MAA	M. avium ssp. Avium
MAP	M. avium ssp. Paratuberculosis
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MPB83	Antígeno micobacteriano MPB83
MPB70	Antígeno micobacteriano MPB70
MPT63	Antígeno micobacteriano MPT63
MPT70	Antígeno micobacteriano MPT70
MPT51	Antígeno micobacteriano MPT51
MPT32	Antígeno micobacteriano MPT32
NAOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Potencial hidrogeniônico
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	Derivado protéico purificado
RD1	Região de diferença RD1
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UFC	Unidade formadora de colônias
TCD4	Receptores envolvidos na restrição de MHC e ativação das células T
TCD8	Receptores envolvidos na restrição de MHC e ativação das células T
ZN	Ziehl-Neelsen
1N HC1	H-ION catalysis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 ASPÉCTOS HISTÓRICOS DA TUBERCULOSE.....	5
3.2 ETIOLOGIA.....	9
3.3 EPIDEMIOLOGIA	12
3.4 TRANSMISSÃO/RESERVATÓRIO.....	19
3.5 RESPOSTA IMUNE.....	27
3.6 PATOGENIA	29
3.7 SINAIS CLÍNICOS.....	32
3.8 DIAGNÓSTICO	35
3.8.1 HISTOPATÓLOGICO	37
3.8.2 CULTURA E ISOLAMENTO.....	40
3.8.3 PCR.....	42
3.8.4 IMUNOHISTOQUÍMICO.....	46
3.8.5 DOSAGEM DE CITOCINA.....	49
3.8.6 ELISA	50
3.8.7 IMUNOFLORECÊNCIA	53
3.8.8 TESTE A CAMPO.....	54
3.8.9 DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO.....	60
3.9 CONTROLE E PREVENÇÃO	65
4. REFERÊNCIAS	69
5. ARTIGO ..	81

Prevalência e histopatologia de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no sudoeste da Bahia	82
RESUMO	82
SUMMARY	82
INTRODUÇÃO.....	83
MATERIAL E MÉTODOS.....	85
RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
REFERÊNCIAS	98

1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da carne no Brasil sofreu intensas transformações com a aplicação de novos modelos de produção, inserindo-se nesse contexto o melhoramento genético e a implementação de programas sanitários, os quais têm permitido ganhos em produção e produtividade. O Brasil, particularmente por deter o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com 212,8 milhões de cabeças, precisa que os produtos de origem animal destinados ao mercado externo e interno apresentem elevada qualidade e baixo risco sanitário (BRASIL, 2006).

A obtenção higiênica de carnes depende de dois fatores fundamentais: em primeiro lugar da sanidade do animal e em segundo, do ambiente que o cerca até a obtenção do produto processado (OLIVEIRA et al., 2010). Nesse sentido, os matadouros frigoríficos constituem-se em relevante instrumento de vigilância epidemiológica de enfermidades, em especial as de caráter zoonótico, possibilitando a realização de estudos com o intuito de avaliar a eficácia dos programas de controle e erradicação dessas enfermidades (FONSECA et al., 2008).

Dentre as zoonoses alimentares detectadas durante o exame *post mortem* nos matadouros frigoríficos destaca-se a tuberculose, enfermidade grave que apresenta grande impacto econômico e na saúde pública. O agente etiológico da tuberculose, pertencente ao gênero *Mycobacterium*, contém mais de 50 espécies, entre as quais se destacam as incluídas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*,

M. bovis, *M. africanum* e *M. microti*) pelo fato de serem patogênicas para o homem (PINTO, 2003).

Em bovinos, embora a doença seja causada principalmente pelo *M. bovis*, o *M. tuberculosis*, ainda que em menor proporção, pode causar a forma subclínica da infecção, tendo com principal fonte de infecção o contato com seres humanos infectados. Dados de notificações oficiais indicam prevalência média nacional de 1,3% de animais reagentes à tuberculina no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2006).

A inspeção sanitária em matadouros frigoríficos faz a condenação parcial ou total das carcaças portadoras de lesões presuntivas de tuberculose no exame *post mortem*, o que, além de ser amparado legalmente, constitui-se um excelente meio de vigilância a doença. No entanto, o diagnóstico *post mortem* apresenta limitações, uma vez que muitos processos inflamatórios granulomatosos apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para tuberculose. Estas lesões estão presentes em infecções causadas por microrganismos, tais quais, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces bovis*, *Actinobacillus lignieresii*, por fungos, na infestação por larvas de parasitos e até por alguns processos neoplásicos (SALAZAR, 2005).

Em ambientes, na qual a tuberculose humana e animal coexistem, o exame *post mortem* de bovinos abatidos para o consumo, em conjunto com o exame laboratorial das lesões sugestivas de tuberculose são etapas fundamentais para o diagnóstico da tuberculose, bem como, para se estimar a prevalência desta enfermidade, podendo-

se assim determinar o risco da infecção e suas implicações zoonóticas em humanos. Além disto, o diagnóstico laboratorial, em adição aos procedimentos da inspeção auxiliaria na tomada de decisões sanitárias, permitindo uma avaliação mais precisa das lesões macroscópicas encontradas nos tecidos de forma a estabelecer padrões morfológicos que sirvam de apoio ao médico veterinário inspetor (CORNER, 1994).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi correlacionar às lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina, detectadas na rotina de inspeção em matadouro frigorífico, com os achados microscópicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o aspecto morfológico das lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose ao abate;
- Realizar o exame histopatológico e verificar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) nas lesões granulomatosas com diagnóstico *post mortem* presuntivo de tuberculose;
- Descrever a prevalência de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos na região Sudoeste da Bahia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA TUBERCULOSE

São numerosas as referências feitas anteriormente ao perigo que representava para o homem o consumo de carne de animais sofrendo de caquexia, sendo muito provável que nesta designação estivesse incluída a tuberculose bovina. No Talmud, codificado em fins do século II, os rabinos proibiam ao povo hebreu utilizar-se de carne de bovinos em cujos pulmões fossem encontradas lesões ulcerativas. Em Munique, por volta de 1307, foi promulgada uma lei semelhante a do Talmud e em Leipzig, 1788, a morte de 12 estudantes foi atribuída à ingestão de carne de animal tuberculoso (SOUZA et al., 1999).

A história natural da doença começou a ser compreendida em 1810, quando Carmichael observou uma ligação entre escrófula e o consumo de leite de vaca em crianças, concluindo equivocadamente que a doença era desencadeada por fatores nutricionais. Klencke em 1846 se aproximou um pouco mais da verdade observando uma freqüência maior de linfadenite tuberculosa entre crianças alimentadas com leite de vaca do que naquelas amamentadas com leite materno, concluiu ser o leite a "fonte" dessa doença. Menos conhecidas foram as declarações do veterinário James Law em 1877, o qual afirmou que a tuberculose bovina era uma doença contagiosa, transmitida por meio de inoculação ou ingestão do tubérculo. Law também

acreditava que os seres humanos poderiam ser infectados ao comer carne mal cozida ou ao ingerir leite fresco de bovinos tuberculosos (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

Em 1882, Robert Koch declarou que o bacilo da tuberculose em humanos e bovinos seria o mesmo, e, por conseguinte, as formas de tuberculose humana e bovina eram idênticas. Ao fazê-lo, Koch aparentemente estava negligenciando o trabalho do médico francês Jean Antoine Villemin, que, em 1868, usando coelhos, descreveu a maior virulência do bacilo da tuberculose bovina em comparação com o bacilo da tuberculose humana. Em 1883, pouco depois do anúncio de Koch, os médicos Emanuel Klein e Heneage Gibbs, anunciaram diferenças entre os bacilos da tuberculose bovina e da tuberculose humana, em uma experimentação conduzida com pequenos animais a partir de material obtido de vacas tuberculosas. Eles demonstraram repetidamente que a cobaia de porco era suscetível a ambos os bacilos da tuberculose humana e bovina, no entanto, o coelho foi apenas suscetível ao bacilo da tuberculose bovina (PALMER; WATERS, 2011).

Estudos experimentais de transmissão conduzidos por Theobald Smith, em 1897, usando bezerros experimentalmente inoculados com escarro de tuberculose humana demonstraram que os bacilos humanos possuíam uma baixa virulência para o gado. Em 1901, Koch tinha concluído que não havia uma diferença entre bacilo da tuberculose bovina e humana, mas que havia pouco perigo de transmissão do bacilo bovino para o homem. Depois de ser confrontado com evidências de outros

cientistas, em 1908, no Sexto Congresso Internacional de Tuberculose, Koch modificou a sua posição, admitindo que a infecção bovina pudesse ocasionalmente ocorrer em humanos (SALAZAR, 2005).

Em 1900, na Grã-Bretanha, uma Comissão Real sobre Tuberculose foi formada para revisar o conhecimento sobre a doença e fornecer orientação adequada para a tomada de decisões políticas. Um membro da Comissão Real foi o cientista veterinário Sir John McFadyean, em seu relatório de 1907, ficou claro que eles sentiram nas afirmações de Koch um erro, concluindo que os fatos indicariam uma proporção muito grande de tuberculose contraída pela ingestão de produtos de origem animal contendo o bacilo da tuberculose de origem bovina e que uma quantidade considerável de doenças e perdas de vida, especialmente entre os jovens, devia ser atribuída ao consumo de leite de vaca contendo bacilo da tuberculose, indicando a necessidade de medidas mais rigorosas do que as aplicadas na época deveriam ser tomadas para evitar a venda ou o consumo de tal leite (MARTINS, 2004).

Em 1900, a tuberculose foi a principal causa de morte nos Estados Unidos. Mais de 25% de todas as mortes foram devido a doenças transmitidas pelo ar, sendo tuberculose a mais importante. Estima-se que aproximadamente 10% de todos os casos de tuberculose humanos foram resultantes da exposição a gado ou produtos bovinos tuberculosos. Na reunião anual de 1907 da Associação de veterinários sanitários dos EUA, Dr. Charles G. Lamb enfatizou a necessidade de veterinários

sanitaristas e autoridades de saúde pública atuarem juntos no controle das doenças contagiosas, especialmente a tuberculose bovina. Citando a transmissão da tuberculose bovina através do leite como um exemplo, Dr. Lamb apontou a necessidade de se ter um veterinário em todos os Conselhos de Saúde Pública. Portanto, o "Conceito de uma Única Saúde", hoje predominante, e que oculta à linha entre a medicina humana e medicina animal, tem sido desde há muito reconhecido como estrategicamente benéfico para o controle das doenças zoonóticas (PALMER; WATERS, 2011).

Tendo em vista a dimensão do problema e sua importância para a saúde pública, muitos países adotaram programas de controle da doença, tais como: rotina de inspeção de carnes, pasteurização do leite e medidas de controle da doença nas populações animais. No Brasil, Torres e Pacheco, em 1938, informaram sobre o isolamento do bacilo do tipo bovino de lesões humanas, tratando-se da primeira publicação da literatura médica nacional (SOUZA et al., 1999).

Até 1970, o bacilo bovino foi considerado uma variante do *M. tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. Neste mesmo ano, Karlson e Lessel propuseram sua classificação como espécie individual, denominada *M. bovis* (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997). De 1988 a 1992, houve um aumento no número de notificações de tuberculose no Brasil, chegando a 85.955 casos. Nestes casos, não foi possível a identificação da espécie de *Mycobacterium* envolvida (SOUZA et al., 1999).

3.2 ETIOLOGIA

As micobactérias causadoras da tuberculose pertencem à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium*, são bastonetes curtos aeróbicos, imóveis, não capsulados, não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, medindo de 0,5 a 7,0 μm de comprimento por 0,3 μm de largura. O tempo de multiplicação é geralmente lento e apresenta grande variação dentro do gênero, o que permite dividi-las em micobactérias de crescimento rápido (crescimento visível em menos de sete dias) e em micobactérias de crescimento lento (crescimento visível em mais de sete dias). As espécies, em sua maioria, são saprófitas, vivem e replicam-se em ambientes naturais, ao passo que uma pequena parcela adapta-se ao ambiente intracelular, tornando-se patógenos preferencialmente de vertebrados superiores (BIET et al., 2005).

Ao abrigo da luz, as micobactérias podem sobreviver por vários meses e nas pastagens por até dois anos. Porém, essas bactérias morrem pela pasteurização do leite, ou ação da luz solar direta em ambiente seco. Resistem muitas horas ou dias aos desinfetantes comuns, contudo alguns fenóis orgânicos conseguem matá-las em meia hora, quando usados a 3% (CASTRO et al., 2009).

Para a maioria das micobactérias, a temperatura ótima de crescimento varia de 35°C a 37°C. Para seu crescimento, podem ser utilizados os meios sólidos, como os meios de Löwenstein Jensen, Petragani e Middlebrook 7H10 e 7H11 para *M. tuberculosis*,

sendo que Stonebrink é o único meio utilizado para isolamento de *M. bovis*. O *M. bovis* tem dificuldade em se desenvolver em meios glicerinados, e por este motivo se desenvolve melhor no meio de Stonebrink, onde o glicerol é substituído pelo piruvato de sódio. Para o isolamento primário do *M. bovis* nos meios à base de ágar, recomenda-se uma pequena concentração de CO₂ (não superior a 5%), uma vez que o *M. bovis* é microaerófilo. O isolamento de *M. tuberculosis* nos meios de Löwenstein-Jensen e Petraghani demanda de 12 a 25 dias enquanto que o *M. bovis*, 24 a 40 dias para se desenvolver no meio de Stonebrink (MARCONDES et al., 2006).

Nos mamíferos, as micobactérias causadoras da tuberculose foram agrupadas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* e que constituem um conjunto de cinco bactérias filogeneticamente relacionadas: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canettii*. O *M. bovis*, dentro do complexo tuberculoso possui o maior número de hospedeiros, podendo ser encontrado nos bovinos, caprinos, ovinos, suínos, eqüinos, cães, gatos, búfalos, raposas, ruminantes silvestres, primatas não humanos e humanos (RIVERA; GIMÉNEZ, 2010). O *M. tuberculosis* é a principal causa da tuberculose em humanos e pode infectar bovinos, mas não causa doença progressiva nessa espécie, todavia pode sensibilizá-los ao teste tuberculínico (CASTRO et al., 2009).

Outro grupo de Micobactérias que não pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* são as denominadas micobactérias não tuberculosas que são habitantes naturais de uma grande variedade de reservatórios ambientais e cujo papel nas

doenças humanas e dos animais não foi plenamente reconhecido. Entre as micobactérias não tuberculosas as mais estudadas formam o complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC). O *M. avium* é subdividido em quatro subespécies: *ssp. Avium*, *ssp. Paratuberculosis*, *ssp. Silvaticum* e recentemente o *ssp. Hominisuis*. O *M. avium ssp. avium* (MAA), é um patógeno oportunista de pacientes com AIDS e *M. avium ssp. paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico da Doença de Johne ou paratuberculose dos ruminantes e que também tem sido isolado a partir de tecido de pacientes com doença de Crohn o que leva a preocupações de que este pode ser patogênico para o ser humano (FREITAS et al., 2001).

Embora classificadas como Gram-positivas, as micobactérias não são coradas pela coloração de Gram, mas pelo método de Ziehl-Neelsen, que utiliza a carbolfucsina que confere a coloração vermelha às micobactérias, estas, por resistirem ao descoloramento subsequente com solução álcool-ácido, são denominadas "bacilos álcool-ácido resistentes" (BAAR), sendo a álcool-acido-resistência a sua propriedade mais característica e que incluem uma grande quantidade de patógenos humanos e animais. Esta característica tintorial deve-se ao alto teor de lipídios – cerca de 60% – que integra a sua parede celular, composta basicamente por uma membrana citoplasmática recoberta por espessa camada de peptidoglicano (ácido N-glicolilmurâmico), o qual se encontra covalentemente ligado às cadeias de arabinogalactano (polissacarídeo) que, por sua vez, estão esterificadas na sua extremidade com ácidos graxos de cadeia longa, os ácidos micólicos. Há também proteínas e lipídios livres que não estão ligados covalentemente a este esqueleto

basal (complexo arabinogalactano-peptideoglicano). Dentre estes, o ácido micólico é o principal responsável por conferir às micobactérias resistência à descoloração por álcool-ácido, assim como a resistência à ação de diversos agentes químicos e antibióticos e a capacidade de formar biofilmes (WILDNER et al., 2011). O conteúdo lipídico em sua parede celular também é responsável por efeitos biológicos como a formação do granuloma (ácidos micólicos) e indução de necrose caseosa (fosfolipídios) (COELHO; MARQUES, 2006).

3.3 EPIDEMIOLOGIA

A Organização Mundial de Saúde Animal classifica a tuberculose bovina na sua Lista B, doenças transmissíveis com implicações sócio-econômicas e/ou de saúde pública, que são significativas para o comércio internacional de animais vivos e seus produtos. Para a produção bovina, a tuberculose é a causa de grandes perdas econômicas devido à morte de animais, a queda no ganho de peso, diminuição na produção de leite, descarte precoce de animais infectados, eliminação de animais de alto valor zootécnico e a condenação de carcaças no abate (ENRIQUE-CRUZ et al., 2010). Além disto, a doença se constitui em uma barreira para o comércio internacional de animais e produtos de origem animal, quando é prevalente em uma região (DEMELASH et al., 2009).

A tuberculose bovina é importante não apenas devido aos prejuízos econômicos, mas também pelo fato de ser uma fonte de infecção para os seres humanos. Os seres

humanos parecem ser tão susceptíveis a *M. bovis* quanto a *M. tuberculosis*. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e outros tipos de imunossupressão ocasionados por fatores como quimioterapia ou transplante de órgãos são associados ao grande aumento no risco de doença observável em seres humanos infectados por *M. tuberculosis*. Acredita-se que esse aumento no risco ocorre também no caso das infecções por *M. bovis* em seres humanos (MURAKAMI et al., 2009).

Apesar dos esforços intensivos ao longo de décadas, a tuberculose bovina continua a ser um problema significativo a nível mundial. O impacto da doença varia tanto por continente como por status econômico dos países individualmente. No entanto, em todas as regiões onde está presente, tem uma influência negativa na economia agrícola, além de ser uma séria ameaça zoonótica à saúde humana (DEMELASH et al., 2009). Esta situação é especialmente preocupante nos países em desenvolvimento, onde existem muitas deficiências nas medidas de prevenção e controle, ao passo que nos países desenvolvidos a doença foi quase erradicada, após a implementação de medidas preventivas e de controle, tais como teste/abate e a pasteurização do leite (HUMBLET et al., 2009).

A maioria dos estudos que abordam o *M. bovis* em países em desenvolvimento foi realizada na África. Alguns deles focaram nos riscos para o gado na Tanzânia, Zâmbia, Chade, Uganda, Eritrêa, Etiópia e outros lidaram com tuberculose em animais selvagens na África do Sul e Tanzânia. Estudos realizados sobre a prevalência da tuberculose bovina neste continente revelam que de 55 países africanos, 25 relataram a ocorrência esporádica ou baixa de tuberculose bovina, seis

relataram a doença como enzoótica, dois, Malawi e Mali, foram descritos como tendo uma elevada ocorrência, quatro não reportaram a doença, e os 18 países restantes não apresentaram dados estatísticos (COSIVI et al., 1998).

Na África, a tuberculose bovina tem recebido pouca atenção, e muitos países, não tem controle ou programa de erradicação. Aproximadamente 85% da população bovina e 82% da população humana no continente vivem em áreas onde a doença é prevalente ou apenas parcialmente controlada, sendo, nestas comunidades, é maior o risco da infecção, pois, por características da sociedade, existe um contato muito próximo entre as pessoas e os seus animais e é freqüente o consumo de leite cru (UNGER et al, 2003). Ademais em países como a Etiópia, é hábito cultural local o consumo de carne crua, sendo esta também uma via de contágio e que tem grande importância na forma zoonótica da tuberculose bovina nesta região (DEMELASH et al., 2010).

Nos países africanos, por falta de um sistema adequado de vigilância a doença, a detecção de lesões tuberculosas em animais submetidos ao abate com inspeção veterinária, se constitui em um importante ferramenta na determinação da prevalência da enfermidade (ASSEGED et al., 2004). Nesse sentido, o estudo sobre a prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em cinco matadouros distribuídos em diversas regiões da Etiópia, revelou uma variação entre 4,2% a 24,7% na prevalência de carcaças com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, demonstrando uma elevada prevalência de tuberculose em bovinos abatidos no país,

podendo-se inferir um cenário semelhante no rebanho bovino (DEMELASH et al., 2009; DEMELASH et al., 2011).

Em Camarões, a prevalência da tuberculose bovina também foi avaliada estudando-se os registros de condenação de três matadouros localizados nas maiores cidades do país, revelando taxas de detecção de tuberculose entre 0,18% e 4,25%, sendo a tuberculose prevalente nos bovinos destinados ao consumo humano e com sérias implicações para a saúde pública (NDUKUM et al., 2010). No Chade, em levantamento realizado em um matadouro local, constatou-se uma prevalência global de 7,3 % de animais com lesões sugestivas de tuberculose e que foram posteriormente confirmadas em exames laboratoriais (DIGUIMBAYE-DJAIBÉ et al., 2006).

Dos cerca de 374 milhões de bovinos na América Latina e no Caribe, 70% são criados em áreas onde as taxas de infecção por *Mycobacterium bovis* em bovinos são maiores do que 1%. Os restantes 30% estão em países onde a infecção afeta menos de 1% do gado bovino, incluindo 62 milhões nos países onde a infecção por tuberculose bovina é praticamente nulo. Medidas de controle da tuberculose bovina são parcial ou amplamente aplicadas na maioria dos países da Região. Essas medidas são baseadas em teste e abate, notificação, inspeção pós-morte e vigilância em matadouros (KANTOR; RITACCO, 2006).

No México, utilizando-se dados de epidemiologia espacial, foi constatada uma área de elevada prevalência de tuberculose bovina e que correspondia à região onde foi

observada uma grande concentração de gado leiteiro (MARTINEZ et al., 2007). Estudo realizado em matadouros mexicanos, no estado de Tamaulipas, no início da campanha contra a tuberculose bovina no país verificou uma prevalência consideravelmente maior (15,36%) no primeiro ano da campanha em relação aos três anos seguintes (8,09%, 4,42% e 10,14%) (ENRIQUE-CRUZ et al., 2010). No Equador, em uma região de produção de leite, contatou-se uma prevalência de 3,85% de bovinos positivos para tuberculose (PROANO-PÉREZ et al., 2006) e de 2,42% em carcaças de animais abatidos em um matadouro deste mesmo país (PROANO-PÉREZ et al., 2011). Na Argentina a prevalência média de tuberculose bovina em oito matadouros da Província de Santa Fé foi de 5,61% lesões sugestivas, destas, 89% foram posteriormente confirmadas em análises laboratoriais como positivas para tuberculose (LATINI et al., 1997).

Tanto na América Latina como no Caribe, os registros de tuberculose por *M. bovis* em humanos são escassos. Na América Latina, estimativas conservadoras indicam que do total dos casos de tuberculose em humanos, 2% dos quadros pulmonares e 8% dos casos extrapulmonares são provocados pelo *M. bovis*. No início do século passado, 70-80% de tuberculose dos linfonodos cervicais em crianças e 20% de tuberculose renal em adultos foram provocados por *M. bovis*. Nos países onde não existe o controle da tuberculose bovina, a infecção pelo *M. bovis* ocorre principalmente em jovens pela ingestão ou manipulação de leite contaminado (RUGGIERO, et al., 2007).

No Brasil, publicações oficiais de inquéritos epidemiológicos indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais reagentes à tuberculina no período de 1989 a 1998. Em Minas Gerais, um estudo realizado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) em 1999, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou uma prevalência de 0,85% de animais reagentes ao teste de tuberculinização. No mesmo estudo, foram detectados 5% de propriedades com animais reagentes (BRASIL, 2006).

Estudos realizados em diversos estados do Brasil revelam uma ampla variação na prevalência da tuberculose em rebanhos bovinos. No Paraná, os resultados mostraram uma prevalência de 0,098% de animais positivos provenientes de 3.198 propriedades (SABEDOT et al., 2009) e de 0,42% para bovinos maiores de 24 meses (SILVA et al., 2012). No estado do Rio Grande do Sul, foi constatada uma prevalência de 1,51% de animais com reações positivas no teste intra-dérmico, sendo que apenas um animal não apresentava lesões condizentes com tuberculose na inspeção post-mortem (POLETTO et al., 2004). Na região Sudeste foi encontrada uma prevalência de 0,54% no Estado do Espírito Santo, com variação entre 1,41% a 0,32% entre as regiões do Estado (LAVAGNOLI et al., 2010) e no Rio de Janeiro, em um inquérito realizado utilizando-se a base de dados de demanda do laboratório da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, observou-se uma taxa de prevalência de 49,8% (OLIVEIRA et al., 2008). No Nordeste, a avaliação da prevalência no estado do Rio Grande do Norte revelou um percentual de 8,66% de animais positivos (OLIVEIRA et al., 2007) e de 0,25% no estado da Paraíba (FIGUEIREDO et al., 2010).

A realização de inquéritos epidemiológicos em matadouros, visando detectar carcaças com alterações anátomo-patológicas características de tuberculose fornece uma útil informação e é um indicador da prevalência da enfermidade nos animais destinados ao abate e, portanto da probabilidade da exposição humana através do consumo de carne infectada, além de fornecer dados para regulamentar o modelo de programa estatístico a ser utilizado para se identificar a verdadeira prevalência da infecção tuberculosa no rebanho (DEMELASH et al., 2010).

A prevalência da tuberculose, diagnosticada em exame *post mortem* de rotina em matadouros, no entanto, pode ser duplicada, porque a inspeção de rotina só identifica 47% das lesões tuberculosas macroscopicamente detectáveis (CORNER, 1994). Mesmo assim, a prevalência continua subestimada, pois, para se chegar à prevalência real, seria necessário somar também os casos de tuberculose sem lesões macroscópicas detectáveis em exame post-mortem. Isso alerta para a possibilidade de, mesmo sendo baixa, existirem rebanhos infectados pela tuberculose (BAPTISTA et al., 2004).

Estudo realizado no Rio Grande do Sul, em 16 estabelecimentos de abate de bovinos, encontrou uma prevalência de tuberculose de 0,28% (WÜRFEL et al., 2009). Em São Paulo os dados epidemiológicos revelaram uma prevalência de 0,81% em um matadouro do oeste paulista (CRETELLA et al., 2006) e de 0,21% no município de Andradina (FERNANDES et al., 2003), neste mesmo estado, o perfil dos animais condenados por tuberculose em matadouros revelou que a enfermidade está mais

concentrada em rebanhos de leite com algum grau de tecnificação da produção, acometendo preferencialmente fêmeas leiteiras de raças européias com idade acima de 36 meses (GRISI FILHO et al., 2011). No estado de Minas Gerais, em 10 matadouros distribuídos por diversas regiões do estado, foi constatada uma prevalência global média de 0,7% (BAPTISTA et al., 2004). Em Mato Grosso, em um levantamento realizado em 07 matadouros, estimou-se uma prevalência de 0,007% para animais e de 0,61% para rebanhos (FURLANETTO et al., 2012). No estado do Pará observou-se uma prevalência de 0,82% de carcaças com lesões de tuberculose (DELGADO et al., 2011).

Na Bahia, no município de Ilhéus, contatou-se uma prevalência de 2,8% de animais positivos para tuberculose (RIBEIRO et al., 2003) e de 10% em trabalho desenvolvido com animais oriundos de nove municípios do recôncavo baiano (FERREIRA et al. apud COSTA, 2008). Entre os anos de 2008 a 2010 a Agência de Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia realizou o estudo epidemiológico da tuberculose bovina no estado, os resultados mostraram que as prevalências de focos e de animais (fêmeas e machos com idade maior ou igual a 24 meses) foram de 1,6% e 0,21% respectivamente (ÁVILA et al., 2012).

3.4 TRANSMISSÃO/RESERVATÓRIO

A tuberculose bovina é uma doença insidiosa porque animais aparentemente sadios podem estar infectados e transmitirem a doença. No gado, as lesões tuberculosas

podem se desenvolver nos órgãos, tecidos e ossos. A propagação da doença entre o gado se dá através de alimentos contaminados, leite, palha, água, saliva, fezes, urina, secreções vaginais, sêmen e até mesmo o ar. Dissemina-se entre rebanhos através da introdução de animais novos infectados, por contato acidental com animais infectados através de cercas, do fornecimento compartilhado de água, ou em feiras de gado (OLMSTEAD; RHODE, 2004).

Possíveis vias de entrada para a infecção por *Mycobacterium* são respiratórias, alimentares, congênitas, cutâneas e venéreas. Em bovinos, assim como em outros hospedeiros animais, a via de transmissão da tuberculose pode ser determinada pelo padrão das lesões observadas na investigação anatomopatológica. Animais com lesões restritas a cavidade torácica evidenciam que estes tenham sido infectados pela inalação de aerossóis, enquanto que aqueles com lesões em linfonodos mesentéricos são considerados como tendo adquirido a infecção por ingestão (BIET et al., 2005).

No gado bovino, em investigações a campo, a maioria das lesões é encontrada no trato respiratório inferior e superior e gânglios linfáticos regionais, assim se considera que, nesta espécie, a inalação de gotículas infectadas de tosse ou secreção nasal de um animal com tuberculose pulmonar ativa é a via mais provável de infecção (NEILL et al., 1994).

Como a transmissão é predominantemente respiratória, o confinamento tem particular importância na difusão da doença no rebanho, o que explica a maior

prevalência no gado leiteiro estabulado, à medida que a idade do rebanho aumenta, e a menor prevalência no gado de corte, os quais são criados em sistema extensivo e abatidos precocemente sendo menor o tempo de exposição aos membros infectados do rebanho. O tamanho do rebanho também é importante na transmissão da infecção. A tuberculose é introduzida em um rebanho, principalmente, pela aquisição de animais infectados, podendo se propagar nos animais, independentemente da idade, sexo e raça (ABRAHÃO et al., 2005).

A ingestão de *M. bovis* de animais infectados ou indiretamente de pastos contaminados, água ou fômites é considerada uma forma de propagação secundária à respiratória, como deduzida a partir da menor presença de lesões mesentéricas em casos de bovinos contaminados. Em bovinos infectados naturalmente, investigações sugerem que as lesões do trato alimentar, embora não seja comum, geralmente são mais frequentes em climas temperados, onde as condições são favoráveis para a disseminação e sobrevivência de *M. bovis* na forragem, enquanto as lesões das vias respiratórias são mais comuns em climas áridos, onde as condições favorecem a transmissão por aerossol de *M. bovis* (PALMER; WALTERS, 2006).

A via oral é a principal porta de entrada em bezerros amamentando-se em vacas tuberculosas. Um bovino infectado, sem aparentes sinais clínicos, pode excretar até 10^3 UFC de *M. bovis* por ml de leite. Em animais tuberculosos com infecção da glândula mamária por infiltração lobular de *M. bovis*, o leite pode apresentar a sua aparência inalterada. Evitar o consumo de leite cru, portanto, pode diminuir em 19% a incidência de tuberculose em bezerros provenientes de rebanhos endêmicos, por

isto esta é uma medida preventiva a se considerar nos planos de saneamento (GARRO et al., 2011).

Em casos de infecção congênita, a transmissão acontece via vasos sanguíneos umbilicais para o feto, a partir da infecção presente no útero da fêmea, mas de forma mais rara também, pode ocorrer através da deglutição do líquido amniótico infectado, que leva ao desenvolvimento de lesões nos intestinos ou nos linfonodos mesentéricos, como por inalação, que resulta em doença pulmonar. Em raras ocasiões, a transmissão genital da tuberculose pode ocorrer nos bovinos se houver lesões da infecção no pênis e vulva ou na mucosa prepucial e vaginal (MURAKAMI et al., 2009).

A transmissão de *M. bovis* pode ocorrer entre animais, de animais para humanos e vice-versa e, raramente, entre os seres humanos. O *M. bovis* é transmissível do gado para os humanos diretamente por via aérea ou através de contato direto com materiais contaminados com secreções do nariz e da boca de animal infectado. Resultados de pesquisas que revelaram o risco para indivíduos, estão relacionados a pessoas que podem ter contato com animais potencialmente infectados como veterinários, trabalhadores de matadouros, agricultores, ordenhadores, negociantes de animais e pessoal de laboratório. Indiretamente, o homem adquire a doença a partir de fontes animais por ingestão de carne e produtos de carne de bovinos infectados abatidos e consumo de leite infectado não pasteurizado. A Ingestão de água contaminada e produtos lácteos não pasteurizados representam um risco maior que a ingestão de produtos de carne infectados porque carcaças gravemente

infectadas são condenadas, partes das carcaças são processadas, assim como, produtos cárneos são inspecionados e bem cozidos (ANAELOM et al., 2010).

A transmissão de *M. bovis* de humano para humano, bem como a infecção simultânea com o *M. tuberculosis* é rara e muito provavelmente ocorre principalmente em casos incomuns. Onde existe a oportunidade, pode ocorrer à transmissão de *M. bovis* de seres humanos de volta para o gado e, nestas circunstâncias, complicar os esforços para controlar a tuberculose bovina no gado bovino. Imunossupressão devido à infecção por HIV é uma complicação conhecida em seres humanos afetados por *M. tuberculosis* e recentemente surgiu como um fator agravante em infecção de seres humanos *M. bovis* com a interface homem-animal, principalmente em surtos nosocomiais. Alguns destes foram causados por cepas multirresistentes de *M. bovis* e causou complicações em pacientes hospitalizados infectados pelo HIV (MICHEL et al., 2010).

Nos países em desenvolvimento, as condições para transmissão *M. bovis* aos seres humanos não só permanecem inalteradas, como também a população humana tem uma maior vulnerabilidade devido a pobreza, HIV e acesso reduzido aos serviços de saúde. A percentagem exata de *M. bovis*, em casos de tuberculose humana é muitas vezes difícil de determinar, uma vez que o diagnóstico de tuberculose, em geral, é feita com base somente na baciloscopia apenas. A OMS estima que 3,1% dos casos de tuberculose humana no mundo são atribuídos a infecção por *M. bovis* e estima que de 0,4 a 10% de isolados de escarro em pacientes de países africanos podem ser de *M. bovis* (COSIVI et al., 1998).

Na América Latina, em estudo realizado em 10 países, a percentagem de casos relatados de tuberculose bovina em humanos em relação aos causados por *M. tuberculosis*, variou entre 0% a 2,5%. Com a exceção de dois casos no Equador, três no Brasil, e um na Venezuela, todos os casos de *M. bovis* relatados foram diagnosticados na Argentina, onde o percentual médio de casos de *M. bovis* variou de 0,34% a 1,0%. Aparentemente, no Chile, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Peru e Uruguai, o *M. bovis* nunca foi isolado dos seres humanos. No entanto, estes dados negativos provavelmente subestimam a infecção, tendo em conta o uso limitado do meio contendo piruvato de ovo, e de meios semi-sintéticos em que *M. bovis* preferencialmente cresce (KANTOR et al., 2008).

No Brasil, o risco de se contrair o *M. bovis* pela ingestão de carne, apesar de baixo, não deve ser ignorado quando se considera o grande número de abates clandestinos, ou mesmo o abate de animais descartados de rebanhos tuberculina-positivos em matadouros municipais, que não atendem às normas de inspeção exigidas pela lei. Em relação ao leite, a situação também é preocupante, pois 41% do leite bovino consumido no país têm origem clandestina e é ingerido na sua forma líquida sem passar por processo de pasteurização, ou como queijo, iogurte e bebida láctea (GARRO et al., 2011).

A tuberculose animal causada por *M. tuberculosis* ocorre com maior frequência em animais que vivem em contato próximo com os seres humanos e, portanto, é uma das doenças infecciosas mais frequentemente registradas em animais selvagens em cativeiro. O risco de repercussão do *M. tuberculosis* de humanos para animais é

considerada alta onde a tuberculose em seres humanos continua a ser uma grande preocupação de saúde pública. Nos animais domésticos, a infecção com o bacilo da tuberculose humana é conhecida desde o início do século anterior, quando as lesões típicas foram encontradas em animais expostos a lixo e efluentes de hospitais de tuberculose. O número de casos documentados de *M. tuberculosis* em bovinos parece ter aumentado nos últimos anos, o que pode ser devido a um melhor diagnóstico por técnicas moleculares e/ou um aumento efetivo na transmissão de humanos para gado (MICHEL et al., 2010).

Os animais domésticos e selvagens podem ser considerados tanto como hospedeiros de manutenção (ou reservatório) ou hospedeiros acidentais (ou repercussão) para tuberculose bovina. Em espécies de hospedeiros reservatórios, a infecção pode persistir por transferência horizontal, na ausência de qualquer outra fonte de *M. bovis* e pode também ser transmitida para outros hospedeiros susceptíveis. Em contraste, os hospedeiros de repercussão são infectados com *M. bovis*, mas a infecção ocorre apenas esporadicamente ou persistir em suas populações se um hospedeiro de manutenção verdadeiro está presente no ecossistema. Se a fonte de infecção é removida, a prevalência da doença é reduzida, mas só pode ser mantida a longo prazo, por re-infecção de outra fonte (HAYDON et al., 2002).

A principal característica de *M. bovis* é a sua ampla gama de hospedeiros, maior de qualquer dos membros do complexo *M. tuberculosis*. O *M. bovis* causa doença em diversas espécies de animais domésticos, bem como, um abrangente número de animais de vida livre, animais de criação e em seres humanos. Apenas uma pequena

proporção destas espécies animais que se tornam infectados pode atuar como hospedeiros de manutenção deste organismo. A Fisiopatogenia, a capacidade de excreção, etologia (comportamento gregário ou não gregário) e a ecologia (comportamento alimentar, densidade populacional e interações com outras espécies) determinam a capacidade de uma espécie de participar, em um determinado biótopo, como reservatório *M. bovis*. (BIET et al., 2005).

Nos animais silvestres, o conhecimento de tuberculose através de programas de vigilância adequado nestas populações, pode ser importante nas estratégias de pesquisa para a completa eliminação da tuberculose no gado bovino. Espécies selvagens são consideradas reservatórios da doença e são responsáveis pela reintrodução da infecção nos animais domésticos. Dentre os hospedeiros selvagens do *M. bovis*, são considerados reservatórios silvestres o texugo (*Meles meles*), que tem sido sugerido por atuar como uma importante fonte de infecção na Grã-Bretanha e na Irlanda (DELAHAY et al., 2005). A presença da infecção por *M. bovis* em veados de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) em Michigan representa uma séria ameaça para o programa de Controle e Erradicação da tuberculose bovina nos Estados Unidos (CARSTENSEN; DONCARLOS, 2011). Na África a presença do *M. bovis* também foi descrita em antílopes (*Kobus leche kafuensis*) com graves conseqüências sobre a biodiversidade da região (MUNYEME; MUNANG'ANDU, 2011). Em Portugal, foram isoladas estirpes de *M. bovis* provenientes de bovinos e javalis (*Sus scrofa*) apontando a possibilidade de transmissão da enfermidade entre as duas espécies (DUARTE et al., 2007).

Entre os animais domésticos, os bovinos, búfalos e cabras são os animais de criação considerados hospedeiros reservatórios de *M. bovis*, os porcos, gatos, cães, cavalos e ovelhas são considerados hospedeiros de repercussão (COUSINS, 2001).

3.5 RESPOSTA IMUNE

O *M. bovis*, é um agente patogênico intracelular que infecta as células do sistema imune do hospedeiro principalmente os macrófagos. Uma vez no interior do macrófago as micobactérias podem ser destruídas por diferentes mecanismos microbicidas que este possui ou sobreviver e utilizar o macrófago para multiplicar-se, viajar dentro deste e ganhar acesso a outros tecidos através da circulação sanguínea e linfática (RIVERA; GIMÉNEZ, 2010).

O êxito de conter e, em alguns casos, eliminar a micobactéria dentro do macrófago, depende de muitos fatores inerentes à bactéria, ao hospedeiro e do ambiente que os rodeia, os quais são chaves para ativação de uma resposta imunitária protetora, considerada por ser essencialmente mediada por células e característica de infecções micobacterianas. A evasão deste tipo de resposta por parte da micobactéria também pode acontecer com a consequente ativação de uma resposta de tipo humoral (SMITH, 2003).

Uma vez que ocorre a fagocitose, o crescimento do bacilo no macrófago depende da virulência do mesmo. O bacilo da tuberculose produz um determinado número de chamados "fatores de virulência" que antagonizam com os mecanismos de defesa do

hospedeiro, permitindo ao patógeno multiplicar-se livremente no local primário de implantação antes de se dispersar para outros tecidos e órgãos não infectados. Um dos fatores de virulência está associado com a complexidade da parede celular, rica em lipídios, que protegem as micobactérias dos efeitos bactericidas dos produtos intermediários reativos de oxigênio dentro dos fagolisossomas, bem como, a inibição da fusão do fagossomo com o lisossoma, além do ataque a membrana do citoplasma (WATERS et al., 2003).

O bacilo tuberculoso é capaz de interromper o funcionamento normal do fagossomo, evitando o desenvolvimento de compartimentos dentro dele, ricos em pH ácido e hidrolases. As vesículas que contêm micobactérias falham na fusão com vesículas endossomais que contêm outras partículas ingeridas. Esta capacidade restringida dos fagossomos que contêm a micobactéria de fundir-se com outras vesículas, indica que sua composição química está alterada a fim de evitar a entrada da micobactéria no lisossoma, sendo bloqueada desta forma a fusão dos fagossomos com moléculas do hospedeiro que são daninhas ao bacilo (HOPE et al., 2004).

Os principais organismos de defesa na resposta imune anti-micobacteriana são os linfócitos T e as células apresentadoras de antígeno. Os linfócitos T são os primeiros envolvidos na infecção por *M. bovis* no gado bovino. A resposta imune celular predomina como a principal resposta imune na tuberculose. Todas as sub populações T são envolvidas na resposta anti-micobacteriana no gado bovino. A sequência de participação destas subpopulações é iniciada pelo $T\gamma\delta$, seguida de TCD4 e, mais tarde, com predominância de TCD8 $\alpha\beta$ (SMYTH et al., 2001).

O estabelecimento de uma resposta imune do tipo Th1 é de grande importância, e é caracterizada pela produção de interferon gama, que é considerada fundamental como via de ativação dos macrófagos. Nos bovinos infectados por *M. bovis*, a subpopulação TCD4 dominam a produção de interferon gama capaz de ativar a capacidade anti-micobacteriana dos macrófagos. As células TCD8 se encontram envolvidas, principalmente, na lise das células infectadas (COSIVI et al., 1998).

A resposta humoral, apesar da dominância inicial da resposta imune celular, tem um importante papel. Os antígenos ESAT-6, 14 KDa, MPT63, MPT70, MPT51, MPT32 e MPB83, têm sido identificados como epítomos importantes reconhecidos pelos linfócitos B na tuberculose bovina. O nível de anticorpos contra *M. bovis*, da classe IgG1 está correlacionado positivamente com alterações patológicas na tuberculose bovina em períodos de tempo prolongado. Estas observações indicam a possibilidade da aplicação de mais de uma prova em combinação, para fornecer uma melhor informação sobre o status em que se encontra a enfermidade no indivíduo (COBOS-MARÍN et al., 2003).

3.6 PATOGENIA

As rotas pelas quais os bovinos são infectados são influenciadas por fatores como o ambiente, idade e práticas agrícolas. A transmissão da tuberculose através da rota respiratória é facilitada pelo comportamento natural do gado, especialmente em comunidades com altas densidades de estocagem e significativa movimentação de animais entre fazendas e feiras. Sendo a porta principal de entrada do bacilo da

tuberculose em bovinos o alvéolo pulmonar, encontra-se uma predominância de lesões em gânglios brônquicos e/ou mediastínicos. Uma vez atingido o alvéolo, o bacilo é capturado por macrófagos e o seu destino será determinado pelos seguintes fatores: virulência do microrganismo, carga infectante e resistência do hospedeiro (MORRISON et al., 2000).

O foco primário da infecção é estabelecido após a interação do hospedeiro e patógeno. Esta lesão primária, juntamente com a lesão no linfonodo regional é denominada de "complexo primário". Dentro de focos infectados, os macrófagos assumem frequentemente uma aparência distinta de células epitelióides e células gigantes do tipo Langhans que também são formadas devido à fusão de macrófagos. Uma mistura de células epitelióides e gigantes formam o centro de tubérculos jovens, rodeada por uma zona de linfócitos, células plasmáticas e monócitos, e, com a progressão da lesão, o tubérculo desenvolve fibroplasia periférica e necrose caseosa, que resulta da reação de hipersensibilidade do tipo retardada. Com a mediação dos linfócitos T, ocorre a migração de novas células de defesa, culminando com a formação de granulomas. A aparência normalmente é de um nódulo firme branco ou amarelado e é comum a calcificação e áreas de necrose caseosa (NEILL et al., 1994) .

Em bovinos, as lesões do complexo primário podem persistir, com ou sem progressão, ou pode curar completamente. O desenvolvimento de lesões pode envolver o pulmão e pode ser unilateral ou bilateral, ocorrendo predominantemente nos lobos caudais e muitas vezes no terço distal destes lobos. A Tuberculose pleural

pode resultar diretamente de uma expansão das lesões subpleurais ou se espalhar através da linfa ou sangue, é caracteristicamente nodular, com lesões tendendo a ocorrer em grupos e podem tornar-se fortemente calcificadas. A pleurite caseosa difusa ocorre comumente com menos frequência, apresentando grandes placas caseosas entre camadas pleurais mais espessas (NEILL et al., 2001).

A disseminação da infecção para outros órgãos pode ocorrer precocemente durante o desenvolvimento da doença, ou numa fase tardia, provavelmente em função de uma queda na imunidade do animal. A generalização da infecção pode assumir a forma miliar, que ocorre de maneira abrupta e maciça, devido à entrada de um grande número de bacilos na circulação, ou pela forma protraída, que é a mais comum, e se dá pela via linfática e sanguínea, acometendo o pulmão, linfonodos, fígado, baço, úbere, ossos, rins, sistema nervoso central, disseminando-se por, praticamente, todos os tecidos (NEILL et al., 2005).

À medida que a lesão envelhece, o tecido conjuntivo colagenoso que circunda a lesão aumenta em quantidade e maturidade. Se as bactérias forem eliminadas, o tubérculo será reduzido a uma pequena massa de tecido cicatricial hialino. Contudo, mesmo com a cura, os microrganismos podem não ter sido completamente eliminados, e persistem na forma de infecção latente. Posteriormente, após a infecção primária, pode ocorrer a reativação da doença. O indivíduo já apresenta memória imunológica para os antígenos dos bacilos da tuberculose e, em geral, desenvolve lesão mais circunscrita, de evolução mais lenta (POLLOCK; NEILL, 2002).

A manifestação da doença em outros órgãos e tecidos dependerá também da via de infecção pela qual o animal é infectado, da resposta imune do hospedeiro e a virulência do organismo. Infecções adquiridas através da pele normalmente serão limitadas ao sítio inicial ou podem envolver o nódulo linfático local. Na tuberculose congênita o complexo primário localiza-se no fígado e no linfonodo hepático, embora as lesões primárias nem sempre sejam óbvias. Nestes casos, a propagação da doença é rápida e a morte do bezerro pode ocorrer dentro de algumas semanas, quando a doença alcança a generalização (MENZIES; NEILL, 2000).

A infecção por *M. tuberculosis* em bovinos é pouco comum, devido à elevada resistência desta espécie. O desenvolvimento de lesões progressivas ocorre raramente, mas os bacilos podem sobreviver por algum tempo em seus tecidos, principalmente nos linfonodos, sensibilizando o animal, podendo gerar reação cruzada no teste de tuberculinização para tuberculose bovina (ACHA; SZYFRES, 2001).

3.7 SINAIS CLÍNICOS

A tuberculose pode causar uma grande diversidade de sinais clínicos, tanto em bovinos, como em seres humanos. Na maioria dos rebanhos bovinos infectados por *M. bovis* a doença é inaparente e a sua presença somente é detectada pelo teste tuberculínico, o curso da doença é, nestes casos, crônico e normalmente limitado aos pulmões, linfonodos pulmonares e linfonodos craniais. Alguns animais podem passar

toda sua vida útil sem a sintomatologia evidente, constituindo uma ameaça potencial para o resto do rebanho (MURAKAMI et al., 2009).

Em casos avançados, a dispnéia pode ser aparente, devido a extensas lesões pulmonares que levam ao enfraquecimento das funções respiratórias, ou em decorrência do aumento dos linfonodos bronquiais, que causam a obstrução das vias aéreas. O comprometimento dos pulmões, além da dispnéia, leva a uma tosse crônica, devido à broncopneumonia, esta tosse ocorre vez ou outra e é deprimida, entrecortada e produtiva. Pode ocorrer corrimento nasal seroso ou purulento, taquipneia e hiperpneia. Raramente podem ser auscultadas áreas de vazio pulmonar, correspondente a maciez percussora e às vezes ruídos de roce pleural, crepitações e sibilos. Em casos avançados de tuberculose pulmonar pode ocorrer hemoptise e a respiração pode ficar profunda. Nestes casos os bovinos podem apresentar emagrecimento progressivo, anorexia, febre e debilidade (JUNIOR; SOUZA, 2008).

Os sinais mais comuns de acometimento alimentar são causados pela pressão de linfonodos aumentados sobre os órgãos vizinhos, como o timpanismo ruminal recidivante e, depois, persistente. Os linfonodos mesentéricos aumentados de volume podem provocar obstruções intestinais, e o aumento dos linfonodos retrofaringeos pode levar a disfagia, estridores e salivação. A ocorrência de diarreia é rara, e quando presente, resulta de úlceras tuberculosas no intestino delgado (CASTRO et al., 2009).

Em infecções tuberculosas na glândula mamária, o achado característico é um endurecimento e hipertrofia acentuada que envolve primeiro a parte superior do úbere nos quartos posteriores. No início o leite não apresenta anormalidades macroscópicas, mas com o avanço da doença, aparecem flocos muito finos que se depositam quando o leite está em repouso, deixando-o com aspecto claro de coloração âmbar (ABRAHÃO et al., 2005).

A endometrite, como resultado da tuberculose, pode causar infertilidade ou resultar em abortos no estágio final da prenhez. A fêmea afetada pode ter repetição de cio e a metrite pode levar a peritonite e salpingite. A vulva também pode estar comprometida e podem ser encontradas massas ovarianas, sendo frequente e quase sempre bilateral com comprometimento dos ovários. Pode existir um corrimento purulento crônico altamente infectado por *M. bovis*, principalmente em vacas que apresentam falha na concepção. Algumas vacas apresentam vaginite tuberculosa concomitante ao corrimento (JUNIOR; SOUZA, 2008).

A forma humana da infecção pelo *M. bovis* tem manifestações clínicas semelhantes, com a causada por *M. tuberculosis*. Tal como acontece com a infecção humana por *M. tuberculosis*, a invasão *M. bovis* nos tecidos é seguida por uma resposta de macrófagos inicial que não é, contudo, suficiente para prevenir a proliferação de microrganismos. As manifestações clínicas mais comuns, na infecção por *M. Bovis* em humanos estão associadas à forma extra-pulmonar da doença, linfadenopatia cervical (que afeta principalmente a tonsilas e os gânglios linfáticos pré-auriculares), lesões intestinais, tuberculose crônica da pele (*lupus vulgaris*), e outras formas de

manifestações não pulmonares são particularmente comuns, no entanto, em pacientes imunodeficientes, a doença pode evoluir para um quadro grave e disseminado (ANAELOM et al., 2010).

3.8 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico preciso da tuberculose bovina em animais vivos é notoriamente problemático. A patogênese da doença pode variar dentro de uma espécie, bem como, entre espécies, resultando em diferentes vias de excreção e os padrões de transmissão. Períodos de incubação mais prolongados, de até vários anos em algumas espécies, indicam que os animais aparentemente saudáveis podem transportar e excretar micobactérias patogênicas. Além disso, as micobactérias podem ser eliminadas apenas intermitentemente por animais infectados, o que limita a sensibilidade dos testes baseados na detecção de *M. bovis* nas excreções em um único momento (DREWE et al., 2009).

Nestas circunstâncias, é necessário desenvolver sistemas de diagnóstico que são diretamente aplicáveis de amostras biológicas e permitir um elevado nível de realização e bons níveis de sensibilidade e especificidade, permitindo um diagnóstico rápido, no laboratório, utilizando as amostras colhidas no matadouro (PARRA et al., 2008).

Apesar de vários métodos terem sido desenvolvidos para o diagnóstico da tuberculose, nenhum deles pode ser empregado isoladamente, havendo sempre a

necessidade do uso de técnicas complementares para o alcance de uma informação eficaz e completa (COSIVI et al., 1998). Vários métodos estão atualmente disponíveis e consistem em recentes avanços para o controle da tuberculose. A prova tuberculínica, a vigilância epidemiológica em matadouros, os controles sanitários e o diagnóstico de laboratório, são elementos básicos que devem ser empregados com critério e de modo adequado a cada situação epidemiológica, sendo que, os resultados laboratoriais obtidos devem ser sempre interpretados em conjunto com os achados clínicos (RUGGIERO et al., 2007).

O diagnóstico clínico da tuberculose é difícil devido ao fato de que os sinais respiratórios, o emagrecimento e o aumento de tamanho de alguns linfonodos ocorrem em casos avançados da enfermidade e podem ser confundidos com outras doenças, por outro lado, um animal pode estar infectado, com um foco localizado e apresentar-se aparentemente sadio (CASTRO et al., 2009).

Nos casos de tuberculose avançada, o diagnóstico clínico assume maior importância, pois os animais em geral apresentam decréscimo da sensibilidade alérgica, podendo, por vezes, chegar a anergia. Os sinais clínicos mais frequentes são a caquexia progressiva e a tosse seca, curta e repetitiva. Podem ser reconhecidos também sinais de broncopneumonia com tosse úmida (com presença de escarro) seguida de dispnéia e taquipnéia. Animais tuberculosos, quando submetidos à marcha forçada, tendem a posicionar-se atrás dos demais, demonstrando cansaço e baixa capacidade respiratória. Pode ocorrer linfadenomegalia localizada ou generalizada (BRASIL, 2006).

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Os diretos envolvem o isolamento e identificação do agente etiológico no material biológico a partir de lesões oriundas de animais doentes. A dificuldade de obtenção de amostras *in vivo* torna pouco viável sua utilização rotineira, uma vez que é bastante complexa a obtenção de lavados bronco-alveolares em bovinos, dessa forma, os métodos diretos de diagnóstico têm-se limitado ao diagnóstico *post-mortem* da infecção. Os indiretos pesquisam uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral (produção de anticorpo circulantes) ou celular (mediada por linfócitos e macrófagos) e são mais utilizados no diagnóstico da infecção *in vivo* (FRÁGUAS et al., 2008).

3.8.1 HISTOPATOLÓGICO

A histopatologia é uma forma de diagnóstico que consiste na análise de lesões suspeitas de tuberculose, colhidas em carcaças submetidas à inspeção *post mortem*. Os exames histológicos são práticos, rápidos e de baixo custo, além disto, outra vantagem da histopatologia é aumentar a sensibilidade de diagnóstico quando esta é realizada em conjunto com a cultura, sendo um importante meio de diagnóstico a ser aplicado principalmente em regiões de alta prevalência da doença (WATRELOT-VIRIEUX et al., 2006).

O exame histopatológico é uma técnica indireta de diagnóstico presuntivo de tuberculose que permite a verificação da presença de granuloma, o que é considerado sugestivo da enfermidade, ou direta, quando sob coloração especial de

Ziehl-Neelsen, é pesquisada a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (MEDEIROS et al., 2012).

A metodologia deste exame consiste em se obter fragmentos de lesões presuntivas, com espessura de até 1,0 centímetro, compreendendo preferencialmente a área de transição entre a área com lesão e a aparentemente normal. As amostras de tecido devem ser acondicionadas em frascos de boca larga e fixadas com formol a 10%. Após a fixação as amostras são inseridas em blocos de parafina e microtomizadas, sendo que as que possuem lesões fortemente calcificadas passam por um processo de descalcificação para facilitar no preparo dos cortes histológicos. Para o preparo das lâminas, são efetuados cortes com cerca de 2 micrômetros, que posteriormente, são submetidos a coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) e examinados sobre microscopia de luz (VARELLO et al., 2008).

A morfologia das lesões granulomatosas características da tuberculose, é observada, revelando uma área central de necrose caseosa, às vezes mineralizada, circundada por células gigantes tipo Langhans, células epitelióides, histiócitos e na periferia a presença de mononucleares, linfócitos e raros plasmócitos, circundados por tecido conjuntivo fibroso (LAISSE et al., 2011).

Os achados histopatológicos podem ser classificados como positivos quando verificasse a presença de granuloma tuberculoso exibindo necrose central com ou sem mineralização rodeado por macrófagos, linfócitos, células plasmáticas, neutrófilos, células epitelióides, células gigantes de Langhans, e inseridos em parte ou

completamente por uma cápsula fina; inconclusivos quando ocorre lesão caracterizada por um aglomerado irregular não encapsulado de células epitelióides, mas não verifica-se a presença células gigantes multinucleadas tipo Langhans e necrose, consistente com lesões em uma fase inicial, e negativos quando a lesão apresenta características não consistentes com granuloma tuberculoso, incluindo significativos infiltrados eosinofílicos, hiperplasia linfóide, a presença de colônias de bactérias dentro da área necrótica ou tumores (WANGOO et al., 2005)

As lâminas histológicas são submetidas então a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen, modificada por Faraco e Wade, onde estas são coradas com o corante Fucsina e Azul de Metileno. A metodologia se baseia nas propriedades tintoriais comuns as micobactérias e as bactérias dos gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium*. Estas apresentam grande quantidade de lipídeos (ácido micólico) em suas paredes. Tal particularidade faz com que essas bactérias, quando submetidas a uma coloração, se impregnem pelo corante. Após uma descoloração por solução de ácido clorídrico em álcool, elementos celulares e outras bactérias se descoram, mas as micobactérias mantêm a coloração e por isto são denominadas BAAR. Essas características tintoriais se mantêm enquanto a membrana bacteriana estiver íntegra. Com a ruptura da mesma, desaparece a característica álcool-ácido-resistente. Após coloração pela fucsina de Ziehl, procede-se à coloração de fundo com solução de azul de metileno. Nesta técnica os bacilos, são visualizados, em microscopia óptica de luz como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, isolados, aos pares ou em grupos corados em vermelho com o fundo azul (BRASIL, 2006).

O método de visualização de micobactérias através da coloração de Ziehl-Neelsen, a despeito de ser rápido e barato, não permite, no entanto, distinguir membros da família Mycobacteriaceae, e outros organismos que partilham esta ácido-característica. Além disso, só consegue revelar a presença de BAAR quando as concentrações são superiores a 10^4 bactérias por mililitro (RODRIGUEZ et al., 2004).

3.8.2 CULTURA E ISOLAMENTO

O diagnóstico definitivo da tuberculose está fundamentado no isolamento e na identificação do agente, esta metodologia, no entanto, apesar de classicamente ser considerada como “padrão-ouro”, apresenta aspectos restritivos para o seu uso, pois as técnicas bacteriológicas empregadas apresentam baixa sensibilidade, necessitam de uma grande quantidade de bacilos viáveis e consomem muito tempo para crescimento em meios de cultura apropriados (que pode variar entre 4 e 6 semanas) (RUGGIERO et al., 2007).

A melhor maneira de detectar *M. bovis* em fragmentos de tecido é através da inoculação de amostras descontaminadas em meio de cultura, posteriormente incubadas a 37 ° C por até 60 dias. O objetivo da descontaminação da amostra é inativar outras bactérias que possam estar presentes na amostra, a fim de evitar o seu crescimento mais rápido e a exaustão dos nutrientes, o que torna inviável o crescimento do *M. bovis*. Os produtos utilizados nos procedimentos de descontaminação não devem ser agressivos para as micobactérias e, ao mesmo tempo, serem capazes de inativar a microbiota acompanhante. O balanço destas duas possibilidades, assim como o grau de contaminação da amostra, vai ser o

principal fator responsável pela sensibilidade do método de isolamento (AMBROSIO et al., 2008).

O maior problema encontrado na seleção de um reagente e a concentração deste para a descontaminação de amostras é o efeito adverso que os diversos reagentes possuem sobre *M. bovis*. O reagente ideal deve ter um mínimo de toxicidade para o *M. bovis*, mas a toxicidade máxima para outros organismos contaminantes. Como nenhum reagente ideal foi encontrado o tipo e concentração do descontaminante utilizado é muito importante. O método usado tradicionalmente para a descontaminação de amostras é o de Petroff, considerada sensível e relativamente barato e que utiliza que utiliza NaOH a 4%, com posterior neutralização com 1N HCl. Além do método de Petroff, outras substâncias também são utilizadas para o mesmo fim, tais como, o Cloreto de hexadecilpiridínio (HPC) a 0,75% e o ácido sulfúrico 6% que apresentam baixa toxicidade para o *M. bovis*. O ácido sulfúrico é o método utilizado no laboratório de referência brasileira para doenças animais e o HPC não requer a fase de neutralização, apresentando um tempo de processamento mais rápido (HOLLANDA et al., 2002).

A metodologia de isolamento de micobactérias em meios de cultura, é realizada rotineiramente através da inoculação nos meios de Löwenstein Jensen, Petragnani e Middlebrook 7H10 e 7H11 para *M. tuberculosis*, enquanto que Stonebrink é o único meio utilizado para isolamento de *M. bovis*. O *M. bovis* tem dificuldade em se desenvolver em meios glicerinados, e por este motivo se desenvolve melhor no meio de Stonebrink, onde o glicerol é substituído pelo piruvato de sódio. Para o isolamento

primário do *M. bovis* nos meios à base de ágar, recomenda-se uma pequena concentração de CO₂ (não superior a 5%), já que o *M. bovis* é microaerófilo (MARCONDES et al., 2006).

Nos meios de cultura a base de ágar, o crescimento bacteriano é mais rápido, sendo que a primeira colônia de bactérias reconhecível aparece em torno de 28 dias no 7H11. Quando se utiliza o meio de Stonebrink este tempo é de 36 dias. Entretanto, os meios a base de ágar são mais suscetíveis ao crescimento de microrganismos contaminantes, mesmo se a amostra tenha sido previamente descontaminada. Após o cultivo, técnicas bioquímicas, com base em parâmetros observados, são utilizadas para a identificação das espécies de micobactérias. O aumento da quantidade de niacina, a redução de nitrato e nitrito e a produção de catalase, que ocorre no cultivo *M. Tuberculosis* e que não ocorre com o *M. bovis*, permitem uma seleção previa entre estas bactérias. O teste de sensibilidade ao antibiótico pirazinamida também é utilizado para diferenciar o *M. bovis* do *M. tuberculosis* e contribui para o diagnóstico definitivo (CORNER, 1994).

3.8.3 PCR

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular como a de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que permite a amplificação de segmentos gênicos pela reação de polimerase em cadeia, foi um dos principais avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas e têm permitido o estudo da expressão gênica e o diagnóstico de doenças genéticas, neoplásicas e infecciosas. A técnica de PCR foi introduzida em 1986 por Mullis e Faloona, sendo considerada revolucionária por permitir inúmeras

vezes e em poucas horas a amplificação *in vitro* de uma seqüência alvo de DNA. Através do emprego da enzima Taq polimerase, proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*, este método permite a identificação e amplificação do DNA bacteriano. A técnica é empregada no diagnóstico da tuberculose tanto na detecção do agente em isolados de cultura como também em amostras clínicas (MACENTE; RIBEIRO, 2009).

A amplificação da fita de DNA com seqüência complementar à fita molde se desenvolve em três etapas distintas: a desnaturação térmica e a separação da dupla fita de DNA bacteriano, a hibridação das fitas resultantes com os *primers* (marcador genético polimórfico) e a extensão destes com o auxílio da enzima DNA-polimerase. Os fragmentos amplificados podem ser evidenciados em gel de eletroforese corado com brometo de etídio, ou por *primers* marcados com isótopos radioativos, ou fluorescentes e ainda empregando-se métodos enzimáticos ou de quimiluminescência (RUGGIERO et al., 2007)

De um modo geral, o sucesso do método de PCR, na rotina de diagnóstico da tuberculose, depende da disponibilidade de DNA livres de contaminantes que dificultam o processo de amplificação. O isolamento de DNA com sílica de thyocianate-diatomáceas é uma técnica eficiente para liberar o DNA a partir de várias fontes. No entanto, a presença de impurezas na solução de DNA, que interferem na sua amplificação, continua como um obstáculo para a adoção universal desta técnica (ZANINI et al., 2001).

A escolha do DNA alvo, a definição dos *primers* dentro da sequência do DNA e o emprego de métodos de extração adequados, são também fatores determinantes para sua acuidade (OGUSKU; SALEM, 2004).

As sequências de oligonucleotídeos, que constituem os *primers*, agem como sondas e são consideradas elementos chaves para garantir a especificidade da reação, uma vez que a amplificação do DNA só será possível se houver a hibridização do *primer* com a sequência alvo de DNA da amostra, fornecendo assim, um sítio para que a enzima DNA-polimerase promova a síntese e a incorporação de nucleotídeos. A discriminação do gênero *Mycobacterium* pode ser efetuada com *primers* gêneros-específicos, que detectam as micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, ou ainda os *primers* espécie-específicos que reconhecem sequência de DNA do *M. bovis*, embora não diferencie do *M. tuberculosis* (RUGGIERO et al., 2007).

Em populações onde o status da doença é desconhecido uma técnica que diferencia as micobactérias que integram o complexo *M. tuberculosis* é um elemento repetitivo IS6110, encontrado em diferentes sítios do cromossomo de *M. tuberculosis* e que determina uma grande heterogeneidade genotípica em isolamentos (ZANINI et al, 2001). A PCR multiplex, que emprega em uma mesma reação vários conjuntos de pares de *primers* específicos para determinadas regiões do genoma bacteriano, tem sido uma alternativa para diferenciar as micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (YEBOAH-MANU et al., 2001). Atualmente, o uso da PCR multiplex em tempo real, cujo tempo de ensaio é de uma hora, vem sendo utilizado para identificar e

diferenciar simultaneamente cinco espécies de bactérias do complexo *M. tuberculosis*, envolvidas na tuberculose zoonótica (REDDINGTON et al., 2011).

Nos ensaios moleculares, um fator de relevante importância é o desenvolvimento de um método apropriado para a extração de um pequeno número de organismos de lesões teciduais e a liberação do DNA presente nestes organismos para a amplificação por PCR. Os primeiros estudos empregando PCR para a detecção direta de *M. bovis* em tecidos bovinos foram realizados em 1995 por Wards et al, as vantagens referidas incluíam a rapidez e a habilidade para detectar bacilos inviáveis. Com a diversidade de kits de extração de DNA e o aperfeiçoamento dos procedimentos de amplificação, o diagnóstico de culturas de micobactérias por PCR é muito sensível, mas a reação, quando empregada para amostras de tecido, ainda apresenta restrições quanto à sensibilidade em razão da pequena quantidade de bacilos (RORING et al., 2000).

A aplicação de uma metodologia de diagnóstico molecular que permita a detecção rápida do *M. bovis* diretamente em amostras biológicas de lesões compatíveis com tuberculose é uma interessante alternativa para a confirmação de existência da doença, a ser utilizada na vigilância epidemiológica de animais abatidos em matadouro em programas de erradicação. Neste sentido, a detecção molecular por meio PCR multiplex em tempo real, processo baseado na aplicação direta em amostras biológicas de bovino, permite a diferenciação entre as bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, do complexo *Mycobacterium avium* e outras micobactérias atípicas, representando uma ferramenta de alto rendimento para a

detecção da presença de micobactérias diretamente em amostras clínicas de animais (PARRA et al., 2008).

Em um estudo realizado com amostras de linfonodos, oriundos de bovinos abatidos em matadouro, foram comparados os métodos de diagnóstico em cultura, PCR das colônias e PCR direto das peças. A PCR detectou *M. bovis* em todas as amostras oriundas de colônias e quando foi realizado direto das lesões, a positividade aumentou para 38 amostras, pois identificou a bactéria em amostras que não haviam crescido na cultura e em amostras contaminadas, estes resultados foram obtidos quando se adicionou *alfa-caseína* no mix de extração de tiocianato de guanidina (ZANINI et al., 2001).

3.8.4 IMUNOHISTOQUÍMICO

A imunohistoquímica é uma combinação de técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas que possibilita a detecção de antígenos tissulares *in situ*, por meio da utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras. A localização de tais antígenos pode ser feita a partir de tecidos frescos (cortes de congelação) ou tecidos já fixados e processados pelos métodos histológicos convencionais, através da conjugação das moléculas de imunoglobulina com moléculas marcadoras, normalmente, de caráter enzimático, tais como, a peroxidase e a fosfatase alcalina (PALMER et al., 2007).

A imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos tem o potencial de revelar qualquer antígeno micobacteriano, e a presença de uma parede celular intacta do

bacilo não é um pré-requisito para a realização deste exame. Desta forma, a imunohistoquímica é considerada geralmente como sendo mais sensível do que a tradicional técnica de coloração Ziehl-Neelsen e tem sido utilizada com a finalidade de melhorar o diagnóstico da tuberculose. A técnica além de ser uma ferramenta de diagnóstico, também fornece informações sobre a resposta imune do hospedeiro (MEDEIROS et al., 2010).

A técnica em que os anticorpos primários específicos para o antígeno de interesse são marcados com uma enzima é denominada método direto. Na imunocoloração direta, o anti-soro é incubado sobre o tecido, seguido pela adição de um substrato de enzima que provoca a deposição de um produto de reação colorido insolúvel nos locais de ligação do anticorpo nos tecidos. A reação produzida é visível ao microscópio óptico. A imunocoloração direta é uma técnica de realização simples e econômica, no entanto, fornece uma amplificação pouco visível da ligação, em decorrência disto a sua utilização está limitada à detecção de antígenos abundantes, tais como em depósitos de imunoglobulinas em biópsias de pele para o diagnóstico das doenças da pele auto-imunes (MUSTAFA et al., 2006).

A técnica indireta de imunocoloração utiliza uma enzima-conjugada anti-imunoglobulina em um anticorpo secundário para detectar a ligação do anticorpo primário que com o antígeno específico presente no tecido. Embora o método de imunocoloração indireta seja um pouco mais complexo e moroso de executar, esta reação possui duas vantagens sobre o método direto. A reação indireta aumenta a sensibilidade de detecção do antígeno porque vários anticorpos secundários irão se

ligar a cada anticorpo primário, intensificando o sinal visível produzido, além disso, a reação indireta não exige a conjugação de cada um dos anti-soros primários. Anti-soros de título elevado de enzima conjugada com imunoglobulinas estão comercialmente disponíveis, e um anti-soro conjugado com enzima única para a imunoglobulina de coelho ou de cabra pode ser usado com vários anticorpos primários, em diversas reações (PUROHIT et al., 2007).

Em adição ao método indireto, há uma variedade de outras técnicas imunoenzimáticas concebidas para uma maior amplificação do sinal visível produzida pela ligação de anticorpos primários em amostras de tecidos. Uma das mais versáteis é o complexo avidina-biotina (ABC). A técnica ABC baseia-se na interação das moléculas de avidina e biotina e inclui a utilização de um anticorpo primário não-conjugado, um anticorpo secundário conjugado com biotina e um complexo avidina-biotina-peroxidase. Esta técnica, comparada com a técnica direta e indireta, é mais complexa e demorada, no entanto, a amplificação proporcionada por esta coloração é muitas vezes necessária para detecção de antígenos escassos ou antígenos imunologicamente alterados pela fixação com formalina, sendo utilizada para a detecção da maior parte dos marcadores de tumores e agentes de doenças infecciosas em tecidos (BEYTUT, 2011).

A utilização da técnica de imunohistoquímica tem provocado grande impacto na patologia humana e veterinária, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade. A técnica permite que a mesma amostra possa ser utilizada tanto para exame histológico e imuno-histoquímico de rotina. A capacidade de detecção de antígenos

em amostras fixas também permite diagnósticos retrospectivos nos casos em que não há mais amostras de tecidos frescos disponíveis. Além disso, este exame pode melhorar exatidão, promovendo a visualização da distribuição do agente infeccioso da doença simultaneamente com lesões histológicas (BREES et al., 2000).

3.8.5 DOSAGEM DE CITOCINA

Nos animais infectados por *M. bovis*, as células T respondem aos antígenos micobacterianos, sob expansão clonal levando ao desenvolvimento de células de memória. Na resposta imune anti-micobacteriana os subgrupos de células T (TCD4 e TCD8) proliferam-se significativamente. O interferon gama (IFN- γ) é uma citocina predominantemente liberada pelas células T após estimulação antigênica (POLLOCK et al., 2005).

O ensaio de interferon gama bovino empregado no diagnóstico *in vitro* da tuberculose, assim como no teste intradérmico, tem como objetivo detectar a resposta imune mediada por células do hospedeiro contra a infecção causada pelo *M. bovis*. Ele está fundamentado na dosagem da citocina IFN- γ em amostras de sangue de animais infectados, após a prévia estimulação dos linfócitos com PPD bovino e aviário, uma vez que, as células dos animais não infectados, quando estimulados, não produzem a citocina (RUGGIERO et al., 2007).

A partir de uma a quatro semanas de infecção, as células T presentes no sangue periférico de bovinos infectados, liberam *in vitro* quantidades mensuráveis de IFN- γ , quando o animal é estimulado pela tuberculina. Caso o animal esteja infectado por

M. bovis a produção de IFN- γ será maior quando inoculada a tuberculina bovina, ao passo que, quando o animal estiver contaminado com o *M. avium* a maior produção da citocina será pela inoculação de tuberculina aviária (WOOD; JONES, 2001).

O exame é realizado em duas etapas, na primeira o sangue é heparinizado e distribuído em duplicatas, as amostras então são incubadas por 28 hora a 37°C na presença dos antígenos bovino e aviário e do controle negativo. Retirando-se o sobrenadante após 16 a 24 horas. Na segunda etapa, quantifica-se a produção de IFN- γ utilizando um kit comercial. Várias proteínas podem aumentar a especificidade do diagnóstico ante-mortem da tuberculose bovina, tais como a ESAT-6 e a CFP-10. Eles são codificadas pela região de diferença RD1, presentes no *M. bovis* e em outros membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e, em algumas espécies de micobactérias não-tuberculoso (MOLICOTTI et al., 2011).

Assim como no teste intradérmico a dosagem de citocina pode não ser específico, uma vez que animais não infectados podem apresentar resultados positivos quando expostos a antígenos de micobacterias ambientais, além disto, o método apresenta outras restrições como o elevado custo e tempo inferior a oito horas entre a coleta e o processamento das amostras de sangue (RUGGIERO et al., 2007).

3.8.6 ELISA

Em geral, as respostas mediadas por células imunitárias predominam no início da infecção por *M. bovis*. Em estágios mais avançados da doença, ocorre uma maior

resposta humoral e os anticorpos séricos passam a ser detectados (POLOCK et al., 2005).

Os programas destinados ao controle e erradicação da tuberculose bovina são baseados na identificação de animais positivos através de teste tuberculínico. Estes testes apresentam desvantagens na identificação de animais reagentes em um estado crônico da doença, em que os animais falham em responder, sendo chamados de anérgicos ao teste, mantendo, no entanto, o bacilo circulando no rebanho. Os animais que não respondem ao teste de tuberculina, em estágios avançados da doença, podem ser detectados pelo teste imunoenzimático ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (LIGHTBODY et al., 1998).

A utilização do teste ELISA apresenta também outras vantagens para o diagnóstico da tuberculose bovina, pois este teste requer apenas uma manipulação dos animais, a amostragem de sangue pode ser repetida tantas vezes quanto necessário, sem alterar o estado imunitário do animal e a interpretação dos resultados baseia-se em valores numéricos, tornando esta mais objetiva do que a observação de um inchaço da pele (LILENBAUM et al., 2001).

A técnica indireta ELISA mede a ligação de anticorpos específicos para um antígeno. A fim de diagnosticar bovinos infectados por *M. bovis*, os antígenos normalmente utilizados são a PPD e isoladas ou associadas antígenos purificados a partir de *M. bovis*. Em relação aos antígenos purificados de *M. bovis*, o complexo AG85 representa a maior parte das proteínas secretadas, atingindo uma sensibilidade de

91,3% e especificidade de 94,8%. No entanto, os anticorpos dirigidos contra os antígenos podem também estar presentes em indivíduos não infectados que conduzem a resultados falso positivos (MEDEIROS et al., 2010).

A proteína MPB70 que representa aproximadamente 10% da PPD tem sido identificada como uma célula B alvo em bovinos tuberculosos e também como uma proteína razoavelmente específica. Tanto esta proteína como a sua proteína homóloga MPB83, ambas consideradas como antígenos soro dominantes e reconhecidamente espécie-específicas, sendo altamente expressas no *M. bovis*, mas minimamente expressa em *M. tuberculosis*, tem sido incluídas com o objetivo de aumentar a especificidade do teste, não resultando, porém, em maior sensibilidade (WIKER, 2009).

Embora testes sorológicos não possam ser considerados métodos de diagnóstico de primeira escolha, muitas pesquisas indicam estratégias para a sua utilização. Suas recomendações são baseadas na existência de animais anérgicos, bem como, o aumento de títulos de anticorpos em estágios mais avançados da doença. Estes testes são simples e não onerosos, oferecendo uma alternativa para detectar animais negativos ao teste intradérmico e interferon gama, tornando-se uma alternativa de baixo custo em programas de erradicação da tuberculose bovina, como diagnóstico complementar para a identificação e eliminação de bovinos em estados avançados da doença (LILENBAUM; FONSECA, 2006).

3.8.7 IMUNOFLORECÊNCIA

Imunofluorescência é uma reação antígeno-anticorpo, onde os anticorpos são marcados com um corante fluorescente e o complexo antígeno-anticorpo é visualizada utilizando um microscópio com luz ultra-violeta (fluorescente). Os fluorocromos são corantes que absorvem os raios ultravioletas e emitem luz visível. Este processo é chamado de fluorescência. Os fluorocromos habitualmente utilizados na imunofluorescência são o isotiocianato de fluoresceína de cor verde e tetrametil rodamina isotiocianato, vermelho (STRAIN et al., 2011).

A técnica de imunofloreência pode ser realizada de forma direta ou indireta. A técnica direta é utilizada para detectar o antígeno em amostras clínicas usando anticorpos específicos marcados com fluorcromo. As etapas envolvidas no processo são: fixação de esfregaço na lâmina, o tratamento com anticorpo marcado, incubação, lavagem para remover o excesso de anticorpos marcados não ligados e visualização sob microscópio fluorescente. Esta técnica pode ser usada para detectar vírus, parasitárias e antígenos de tumor (AOKI et al., 2010).

A técnica indireta é utilizada para a detecção de anticorpos no soro. Os antígenos em esfregaço são preparados para reagir com um anticorpo específico não marcado (produzidos em ratos), após a lavagem os anticorpos não ligados são eliminados. A presença de anticorpos específicos de rato, ligado ao antígeno no esfregaço é detectada pela adição de um segundo anticorpo marcado anti-gama globulina. Este anticorpo liga-se ao primeiro anticorpo, mesmo após lavagem. A detecção da presença do segundo anticorpo é observada sob microscópio de fluorescência. A

técnica indireta é habitualmente utilizada para detectar anticorpos em processos infecciosos (AOKI et al., 2010).

A utilização da imunofluorescência, nos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, é uma alternativa de diagnóstico sorológico simples, rápido e de baixo custo e que pode ser adaptado para utilização a campo (SCHILLER et al., 2010). Nos ensaios de fluorescência polarizada (FPA), um marcador (o antígeno alvo ou parte dele) ligado a uma molécula fluorescente é adicionado ao soro. Se o anticorpo está presente no soro, este se liga ao antígeno marcado e a polarização de fluorescência mensurável aumenta devido ao aumento conjugado do tamanho do complexo antígeno-anticorpo. A aplicação deste teste utilizando a proteína MPB70 marcada com fluoresceína para a detecção de anticorpos contra *M. bovis* no soro, pode detectar a presença de anticorpos específicos em minutos, com uma especificidade estimada de 98.3% e uma sensibilidade de 92,9%, (SURUJBALLI et al., 2002).

3.8.8 TESTE A CAMPO – TUBERCULINIZAÇÃO

O ponto fundamental para o controle de tuberculose bovina é a detecção precisa e remoção de animais infectados com *Mycobacterium bovis*. A infecção do gado com este organismo é geralmente crônica e pode permanecer subclínica durante um longo período. É importante ressaltar, que o gado infectado pode se tornar infeccioso muito antes de apresentar quaisquer sinais clínicos óbvios ou lesões típicas de tuberculose, detectável mesmo com um exame clínico cuidadoso. Mesmo se estiver presente, os sinais clínicos da tuberculose no gado não são patognomônicos. Como

resultado, uma eficaz vigilância *ante mortem* da tuberculose bovina, deve se basear primeiramente na detecção de animais infectados numa fase inicial, através da utilização de testes de imunodiagnóstico sensíveis (RUA-DOMENECH et al., 2006).

Os dois testes aprovados para o diagnóstico *ante mortem* da tuberculose bovina são: o teste *in vivo* intradérmico de tuberculina e o ensaio *in vitro* de interferon gama (IFN- γ) (sangue-baseado). O primeiro detecta uma reação de hipersensibilidade do tipo retardada de uma injeção intradérmica de tuberculina, enquanto o segundo detecta a libertação de IFN- γ em culturas de sangue total estimulado com tuberculina usando um ensaio solvente imunológico ligado a enzima. Em países que implementaram programas de erradicação da tuberculose bovina, os exames de triagem de rotina em rebanhos bovinos são baseados no teste intradérmico de tuberculina, este, também é o teste *ante mortem* prescrito pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) como técnica de referência para o comércio internacional de gado bovino (ANON, 2005).

Programas baseados no teste de pele em rebanhos bovinos, complementados com o abate obrigatório dos animais positivos, restrição de movimento de rebanhos infectados e vigilância em matadouros para animais infectados e não detectados, erradicaram a tuberculose bovina em muitos países desenvolvidos, tais como a Austrália, a maioria dos Estados Membros da União Européia, Suíça, Canadá e vários estados dos EUA (COUSINS, 2001).

O extrato de glicerol de cultura líquida pura de bacilos da tuberculose foi descoberto por Robert Koch, em 1890, originalmente foi desenvolvido como uma possível vacina terapêutica para a tuberculose humana, que, após ter sido refinada, Seibert em 1934, desenvolveu a tuberculina conhecida como PPD (Purified Protein Derivative), em que as proteínas são separadas do meio de cultura por precipitação, para ser usada, em vários países em todo o mundo, como uma ferramenta de diagnóstico na medicina humana e veterinária (MONOGHAN et al., 1994).

A tuberculina pode ser definida como um extrato obtido de filtrados de cultivos de *Mycobacterium* sp previamente esterilizados pelo calor, para ser utilizado com o propósito de medir a hipersensibilidade retardada causada pela infecção por micobactérias. A tuberculina bovina em uso atualmente em muitos países, inclusive no Brasil, é uma preparação de *M. bovis* AN5, uma cepa de campo isolada na Inglaterra por volta de 1948 e selecionada para o crescimento ótimo *in vitro*. O organismo é cultivado em meio líquido sintético, tratado termicamente em fluxo livre de vapor, filtrado, concentrado por precipitação, lavado e, em seguida, re-dissolvido em uma preparação estéril, isento de micobactérias intactas. Similarmente, as tuberculinas aviária e humana são obtidas, respectivamente, a partir de culturas de estirpes específicas de bacilos da tuberculose aviária - *M. avium* subsp. *avium* e humana - *M. tuberculosis* (POLLOCK et al., 2003).

Quando tuberculina bovina é injetada na pele de um animal não sensibilizado aos antígenos da tuberculina, não há nenhuma resposta inflamatória local significativa. No entanto, se a tuberculina é injetada em um animal cujo sistema imunológico

tenha sido sensibilizado por uma infecção com *M. bovis*, ou por exposição a antígenos de reação cruzada, desencadeia uma resposta inflamatória com endurecimento e edema progressivo no local da inoculação, que atinge a sua maior intensidade 48-72 h após a aplicação e regridem rapidamente depois disso. A intensidade da reação cutânea pode ser quantificada pela mensuração do tamanho do endurecimento ou do engrossamento da pele. A reação à tuberculina pode evoluir para uma necrose central, algumas vezes acompanhada por vesícula e endureção características de uma hipersensibilidade intensa (RUA-DOMENECH et al., 2006).

Esta hipersensibilidade tardia a reação à aplicação intradérmica da tuberculina PPD, é mediada por uma população de células T sensibilizadas e leva várias semanas para desenvolver-se após a infecção, quando estes reconhecem, então, os antígenos tuberculínicos e secretam citocinas, entre elas o interferon gama. Há bovinos que, embora infectados, não reagem à tuberculinização devido a uma deficiência temporária do sistema imunitário, induzida por inoculações sucessivas de tuberculina ou aplicação de altas concentrações do antígeno, denominada dessensibilização. Reações falso-negativas também podem ocorrer em tuberculinizações próximas ao parto ou em animais com alimentação deficiente. Em animais com tuberculose generalizada, ou em estágios finais da doença, há um excesso de antígeno circulante que induz uma imunossupressão específica, ocorrendo então o fenômeno da anergia (BRASIL, 2006).

No seu formato mais simples, o teste da pele é realizado pela inoculação de um volume de no máximo 0,2 ml de tuberculina na pele bovina. Aproximadamente 72

horas após a inoculação, o local é palpado e examinado para verificar qualquer evidência de inflamação. Este é conhecido como o teste intradérmico único e pode ser aplicado na pele da região cervical média (cervical simples) ou na base da cauda (prega caudal). Quando teste cervical simples é utilizado, além da subjetiva palpação e observação visual do local da inoculação, a espessura da prega cutânea é medida com cutímetro, imediatamente antes da inoculação da tuberculina e 72 horas mais tarde com variação de 4-6 horas para mais ou menos (ANON, 2005).

O teste cervical comparativo com PPD bovino e aviário aplicados simultaneamente em diferentes locais, geralmente do mesmo lado da pele do pescoço, deve ser utilizado como teste confirmatório, por sua maior especificidade em relação aos testes simples. A interpretação do teste baseia-se na observação de que bovinos infectados com *M. bovis* tendem a mostrar uma maior resposta a tuberculina bovina do que a tuberculina aviária, enquanto que as infecções com outras micobactérias promovem a relação inversa. Este teste, por conseguinte, permite uma melhor discriminação entre animais infectados com *M. bovis* e aqueles sensibilizados à tuberculina após a exposição a organismos do complexo *M. avium* ou a micobactérias ambientais não patogênicas (ANON, 2005).

O tipo de teste de pele a ser usado geralmente depende da prevalência da tuberculose e da prevalência de exposição a outros sensibilizantes, tais como micobactérias ambientais. O teste não comparativo caudal é o principal teste primário *ante mortem* de rotina para rastreamento da tuberculose em um animal e rebanhos nos EUA, Canadá e Nova Zelândia e foi o teste utilizado com sucesso para

erradicar a tuberculose bovina da Austrália. O teste cervical simples é o teste de rastreio primário de tuberculose para um animal e rebanhos na Europa continental. Em todos esses países, o teste comparativo é usado principalmente como um teste auxiliar para animais reatores ou reatores inconclusivos para o intradérmico simples, embora o teste IFN- γ vem gradualmente substituindo o teste comparativo como o teste na ordem de escolha. Em contraste, no Reino Unido e na Irlanda, estudos que avaliam o desempenho do teste intradérmico simples revelou uma elevada incidência (6-12%) de bovinos com reações falso-positivas (não específicas) à tuberculina de mamíferos (RUA-DOMENECH et al., 2006).

No Brasil, o protocolo de testes preconizado pela legislação em vigor recomenda para o diagnóstico indireto da tuberculose, a utilização dos testes alérgicos de tuberculinização intradérmica em bovinos e bubalinos com idade igual ou superior a seis semanas e devem ser realizados por médico veterinário habilitado pelo MAPA. O teste cervical simples é o teste de rotina recomendado, o teste da prega caudal por ser de execução mais simples e prática, pode ser utilizado quando há necessidade da realização de um teste de triagem, e, pela legislação, esse teste é admitido para utilização de rotina, exclusivamente em estabelecimentos de criação especializados na pecuária de corte (BRASIL, 2006)

O teste cervical comparativo é o teste confirmatório utilizado em animais inconclusivos ao teste cervical simples e reagentes ao teste da prega caudal. A positividade do teste comparativo, no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), é estabelecida quando a diferença do

aumento da dobra da pele provocada pela inoculação da tuberculina PPD bovina e da tuberculina PPD aviária, após 72 horas é maior ou igual a quatro mm. Devendo ser este o teste de eleição para rebanhos do país com alta frequência de reações inespecíficas, evitando-se os prejuízos decorrentes da eliminação de animais falso-positivos, bem como, estabelecimentos certificados como livres e para estabelecimentos de criação de bubalinos (BRASIL, 2006).

3.8.9 DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO

A inspeção de carcaça ou a necropsia detalhada constituem importantes ferramentas no diagnóstico da tuberculose bovina (BRASIL, 2006). Nos países nos quais as normas de inspeção *post mortem* são rigorosas, o procedimento adotado tem como critério a detecção da totalidade das lesões suspeitas através de uma inspeção minuciosa dos tecidos apropriados (RUGGIERO et al., 2007).

A principal razão para a realização da inspeção *post mortem* de carcaças em matadouro é a proteção da saúde pública. A situação da tuberculose nos bovinos destinados ao abate é um indicador aproximado da prevalência de animais para abate, tuberculo-positivos e, portanto, da exposição humana através do consumo de carne infectada. Além de fornecer dados para o estabelecimento de um programa baseado na verdadeira prevalência da infecção tuberculosa nos bovinos, o exame das carcaças também fornece pistas sobre se a infecção está na sua fase inicial ou atingiu a fase transmissível. Isso proporciona uma melhor consciência programática com o posterior desenvolvimento de uma orientação sobre como reduzir o risco da propagação da enfermidade dentro de uma área geográfica específica, bem como,

oportunidades de se rastrear a fonte de infecção para os rebanhos (BIFA et al., 2010).

A detecção de tuberculose pela inspeção *post mortem* requer que os animais infectados apresentem lesões visíveis nos locais inspecionados. No entanto, em alguns animais infectados por *M. bovis*, as lesões macroscópicas não são visíveis nos tecidos examinados no momento do abate. Portanto, existe a possibilidade de que, quando um número muito grande de carcaças são inspecionadas diariamente, alguns animais com lesões incipientes podem passar despercebidos. Além disso, a inspeção de carnes pode levar à classificação de não-tuberculosas lesões que, devido às semelhanças na aparência macroscópica, são tuberculosas (TEKLU et al., 2004).

As lesões macroscópicas provocadas pelo *M. bovis*, apresentam coloração amarelada, com nódulos de 1 a 3 cm de diâmetro ou mais, que podem ser confluentes, com aspecto purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar necrose de caseificação no centro da lesão, ou, ainda, calcificação nos casos mais avançados (BRASIL, 2006).

Lesões com características acima, não são patognomônicas da tuberculose bovina, sugerindo um diagnóstico diferencial, pois podem ocorrer também nas infecções por *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus lignieresii*, *Pseudomonas aeruginosa*, por parasitas, fungos e em alguns processos neoplásicos que podem ser confundidos com tuberculose (OHARA, 2006). Apesar das dificuldades, nas fases iniciais de programas de controle da tuberculose e em regiões

em que a prevalência da doença é alta, uma grande confiança pode ser colocada no diagnóstico de tuberculose com base na detecção macroscópica de lesões na inspeção *post-mortem* (CORNER, 1994).

Milian-Suazo et al. (2000) descrevem que a alta proporção de resultados positivos na cultura bacteriológica e no exame histopatológico indica que a inspeção da carcaça com lesões macroscópicas pode ser confiável na estimativa da prevalência da doença.

Cerca de 70% a 90% dos casos de lesões presuntivas de tuberculose, encontradas no exame de carcaças em matadouros, encontram-se nos linfonodos da cabeça e tórax, e 66% dos animais necropsiados apresentam apenas uma única lesão visível. Em 95% dos casos, as lesões estão localizadas em linfonodos (mediastínicos, retrofaríngeos, bronquiais, parotídeos, cervicais, inguinais superficiais e mesentéricos), pulmão e fígado. Com menor frequência, podem estar presentes em intestino e tecido mamário, ou em qualquer outro órgão ou tecido do animal (BRASIL, 2006).

Em um estudo realizado na Austrália, foi observado ser conveniente acrescentar a inspeção post-mortem convencional, o cuidadoso exame do pulmão, dos linfonodos mediastínicos, retrofaríngeos e brônquicos podendo estabelecer desta forma o diagnóstico em 86% das carcaças de bovinos com apenas uma lesão macroscópica presuntiva de tuberculose. A eficiência do exame pode identificar 95% das carcaças com única lesão presuntiva da doença, quando é acrescentado o exame dos

linfonodos mesentéricos, os linfonodos parotídeos, cervicais caudais e inguinais superficiais ao procedimento anterior. Desta forma, dependendo da experiência do inspetor, a análise das lesões macroscópicas durante a inspeção pode provir um rápido e real diagnóstico da tuberculose. Em matadouros menores, no entanto, além de procedimentos inadequados, as lesões podem passar despercebidas, por não haver tempo para o exame detalhado de órgãos e tecidos (CORNER et al., 1990).

Estudos conduzidos em matadouros na Etiópia revelaram que os procedimentos de inspeção adotados apresentam uma capacidade limitada para detectar carcaças infectadas com *M. bovis*. Quando comparados com os protocolos detalhados de inspeção de abate, a rotina de inspeção nos matadouro falhou em detectar a maioria das carcaças infectadas. Em cinco matadouros a inspeção de rotina não conseguiu detectar 71,8% de carcaças infectadas com tuberculose (BIFA et al., 2010). Em outro trabalho, no sul do país, a inspeção de rotina detectou apenas 29,4% das carcaças com lesões visíveis de tuberculose (TEKLU et al., 2004).

O acompanhamento da rotina de inspeção no México detectou 16% de bovinos com tuberculose, sendo que 90% destes bovinos tinham lesões localizadas, afetando somente um órgão ou tecido. Dos 400 animais tuberculosos 84% tinham lesões em linfonodos, sendo assim distribuída: retrofaríngeos 49,2%, mediastinais 24,4%, mandibulares 6,4%, traqueobrônquicos 3%, mesentéricos 2,4% ou uma combinação destes linfonodos. As lesões também foram encontradas no pulmão 1,5%, úbere 1,5%, fígado 0,7% e cartilagem esternal 0,2% (MILIAN-SUAZO et al., 2000).

Os procedimentos de rotina na inspeção de carcaças bovinas foram avaliados em seis frigoríficos da Argentina, os resultados indicaram que os profissionais e técnicos que fiscalizam o abate naqueles frigoríficos, têm uma grande capacidade de diagnosticar lesões tuberculosas macroscópicas em animais abatidos, com uma confiabilidade de 89%, o que demonstra a importância do inspetor frigorífico como participante nos programas de controle e erradicação da tuberculose (LATINI et al., 1997).

No Brasil, a inspeção das carcaças é regulamentada pelo RIISPOA "Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal", garantindo que todos os órgãos sejam examinados na sala de matança, imediatamente após a sua remoção da carcaça, assegurando sempre a identificação entre órgãos e carcaça correspondente. Os gânglios inguinais, ilíacos, pré-curais, pré-escapulares e pré-peitorais devem ser sempre examinados. Na inspeção *post mortem* da carcaça, vários critérios devem ser seguidos para liberação para o consumo ou não da carcaça, carcaças com lesões sugestivas de tuberculose podem ser destinadas a condenação total, parcial ou tratamento pelo calor, o que vai depender da localização, extensão e quantidade de lesões encontradas (BRASIL, 1997).

Em um matadouro no estado do Pará, foi constatado que a inspeção de carcaças bovinas e a condenação das mesmas acometidas por lesões suspeitas de tuberculose é uma importante ferramenta epidemiológica, bem como uma fundamental ação a fim de evitar o consumo de carne de animais infectados, garantido a segurança alimentar da população (DELGADO et al., 2011).

3.9 CONTROLE E PREVENÇÃO

Controlar uma doença significa limitar esta de tal forma que a sua incidência diminua consideravelmente e haja condições para evitar sua disseminação caso apareça um novo foco, fazendo com que a enfermidade deixe de representar um risco econômico ou de saúde pública. O controle é indicado para regiões nas quais seria inviável a realização da erradicação como medida inicial, por ser a doença endêmica e altamente disseminada (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

O controle da tuberculose fundamenta-se no bloqueio de pontos críticos da cadeia de transmissão da doença. Inicialmente é necessário conhecer a situação sanitária do rebanho em cada unidade de produção. A identificação das fontes de infecção é baseada principalmente em uma política de teste tuberculínicos e o abate dos animais reagentes. O cuidado na introdução de novos animais no rebanho, também é uma estratégia fundamental para o controle na propriedade, devendo estes serem testados na origem e após a entrada no quarentenário da unidade de criação, respeitando-se o intervalo mínimo de 60 dias entre os testes (BRASIL, 2006).

Em vários países, no começo do século XX, foram iniciadas campanhas para o controle e a erradicação da tuberculose bovina. Nestas nações a enfermidade foi erradicada ou eficientemente controlada. O maior estímulo para o controle desta enfermidade foi o de evitar o seu caráter zoonótico, que naquele período alcançava índices alarmantes tanto na população humana com o animal (COLLINS, 2001).

Os programas de controle e erradicação da tuberculose bovina nos países ocidentais, que tiveram sucesso, baseiam-se no saneamento de rebanhos infectados, por meio da realização de testes tuberculínicos periódicos, sacrifício de animais reagentes e confirmação do diagnóstico por meio de exames histopatológicos e bacteriológicos. Outras medidas como a adoção de métodos de desinfecção, controle do trânsito de animais, quarentena, notificação, controle de reservatórios e a criação de divisões entre regiões e propriedades de acordo com a ocorrência da doença, também contribuíram para a erradicação bem sucedida ou a redução significativa da incidência da doença em países como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Dinamarca, Austrália e Uruguai (WEDLOCK et al., 2002).

Outra importante medida observada em países que lograram êxito no controle e erradicação da enfermidade é a indenização dos proprietários, embora na maioria dos casos esta seja parcial. A divisão de custos entre o governo e a iniciativa privada aumenta a possibilidade de sucesso, pois cada seguimento envolvido torna-se co-responsável pelo programa. A indenização é feita de maneira direta, por animal positivo abatido, ou indireta, através da valorização dos produtos comercializados pelos criadores que aderem ao programa (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

Apesar dos esforços de erradicação intensiva ao longo de décadas, a tuberculose bovina continua a ser um problema com perspectiva global. Vários fatores foram identificados como principais obstáculos para a sua erradicação. Em alguns países, os reservatórios na vida selvagem constituem uma fonte contínua de re-infecção para o gado. Outros fatores que contribuem para a persistência da tuberculose são as

limitações dos testes de diagnóstico (no que concerne tanto a sensibilidade como a especificidade), grandes rebanhos, intensificação do movimento de animais e do comércio destes, extensão territorial, infra-estrutura, clima, características das criações, existência de serviços veterinários organizados e disponibilidades de recursos financeiros (SCHILLER et al., 2010).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi instituído em 2001, com o objetivo de diminuir o impacto negativo desta zoonose na saúde humana e animal, além de promover a competitividade nacional (BRASIL, 2001). As propostas técnicas do programa incluem a certificação de propriedades livres ou monitoradas da doença, com adesão voluntária dos produtores; o controle do trânsito de animais; normas sanitárias para participação de bovinos em exposições, feiras e leilões; o credenciamento e capacitação de veterinários; o diagnóstico e apoio laboratorial com participação do Serviço Oficial e a educação sanitária (BRASIL, 2006).

O Brasil reúne condições que favorecem a implementação do programa, dentre as quais se destacam a existência de serviços veterinários com experiência no controle de doenças animais; de laboratórios capacitados para a produção de antígenos e a realização de diagnóstico, bem como, a existência de bacias leiteiras relativamente organizadas. No entanto, alguns fatores dificultam um sucesso mais amplo, tais como o tamanho do rebanho nacional; a grande extensão territorial; a existência de fronteiras com outros dez países; as grandes diferenças regionais quanto a infraestrutura e condições sócio-econômicas; a grande heterogeneidade das criações

quanto ao modo de produção e situação sanitária; a insuficiência dos recursos financeiros destinados aos órgãos oficiais que se ocupam da saúde animal e a inexistência de fundos para indenização dos criadores que abatem animais reatores positivos (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997).

Outra importante medida de controle é o monitoramento dos rebanhos pela detecção de lesões tuberculosas realizado pelo serviço de inspeção de carcaças quando do abate dos animais, cujos achados de matança em carcaças e vísceras presuntivos de tuberculose são comunicados ao Serviço de Defesa Oficial, bem como, presuntivos de tuberculose proceder ao abate sanitário de animais reagentes positivos (BRASIL, 2006).

Como medida preventiva recomenda-se que a saúde dos trabalhadores da propriedade seja rotineiramente monitorada. Além disto, ações sobre possíveis reservatórios domésticos, sinantrópicos ou silvestres devem ser consideradas, bem como, prover a propriedade de Instalações adequadas, que permitam boa ventilação e exposição direta à luz solar, contribuem para prevenir a contaminação do ambiente. Recomenda-se ainda higienizar e desinfetar periodicamente todas as instalações, especialmente os bebedouros e os cochos. Deve-se ainda, abolir a utilização do leite de vacas reagentes para qualquer finalidade, e em quaisquer circunstâncias (CASTRO et al., 2009). A inspeção sanitária dos produtos de origem animal destinados ao consumo humano e a pasteurização ou esterilização do leite e derivados, também são medidas preventivas importantes para prevenir esta zoonose (BRASIL, 2006).

4. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals**, 3.ed, Pan American Health Organization, v.1, p. 283-299, Washington, D.C.: 2001.

AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. D.; RODRIGUEZ, A. R.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 241-244, 2008.

ANAELOM, N. J.; IKECHUKWU, O. J.; SUNDAY, E. W.; NNAEMEKA, U. C. Zoonotic tuberculosis: A review of epidemiology, clinical presentation, prevention and control. **Journal of Public Health and Epidemiology**, v. 2, n. 6, p. 118-124, 2010.

ANON. **Bovine Tuberculosis Eradication: Uniform Methods and Rules**. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Washington, D.C.: 2005.

AOKI, V.; SOUSA JUNIOR, J. X.; FUKUMORI L. M. I.; PÉRIGO, A. M.; FREITAS, E. L.; OLIVEIRA, Z. N. P. Imunofluorescência direta e indireta. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.

ASSEGED, B.; WOLDESENBET, Z.; YIMER, E.; LEMMA, E. Evaluation of abattoir inspection for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle at Addis Ababa Abattoir. **Tropical Animal Health and Production**, v. 36, p. 537-546, 2004.

ÁVILA, L. N.; BAHIENSE, L. C.; PEREZ A. M.; GONÇALVES, V. S. P.; BAVIA, M. E.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F.; TELLES, E.; DIAS, R.; AMAKU, M. Prevalência e análise espacial da tuberculose bovina no estado da Bahia. In: 1º ENCONTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA VETERINÁRIA, 2012, São Paulo, **Resumos...**, Acta Scientiae Veterinariae. 40 (Supl 2): 2012.

BAPTISTA, F.; MOREIRA, E. C.; SANTOS, W. L. M.; NAVEDA, L. A. B. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p.577-580, 2004.

BEYTUT, E. Immunohistochemical evaluation of surfactant proteins and lymphocyte phenotypes in the lungs of cattle with natural tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 119-124, 2011.

BIET, 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, 2005.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 1997.

_____. **Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001**. Institui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Diário Oficial da União, Brasília: 11 de janeiro de 2001.

_____. **Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Brasília, 2006. 188 p.

BREES, D. J.; REIMER, S. B.; CHEVILLE, N. F.; FLORANCE, A.; THOEN, C. O. Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 60-63, 2000.

CARSTENSEN, M.; DONCARLOS, M. W.; Preventing the Establishment of a Wildlife Disease Reservoir: A Case Study of *Bovine Tuberculosis* in Wild Deer in Minnesota, USA. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011.

CASTRO, K. G.; LERVORE, J. P. M.; CARVALHO, G. D. Tuberculose bovina: diagnóstico, controle e profilaxia. **PUBVET**, Londrina, v.3, n. 30, Ed. 91, Art. 648, 2009.

COBOS-MARÍN, L.; MONTES-VARGAS, J.; RIVERA-GUTIERREZ, S.; LICEA-NAVARRO, A.; GONZÁLEZ-Y-MERCHAND, J. A.; ESTRADA-GARCÍA, I. A novel multiplex-PCR for the rapid identification of *Mycobacterium bovis* in clinical isolates of both veterinary and human origin. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p. 485-490, 2003.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. A. Etiologia das micobactérias. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**. Julho / Dezembro de 2006.

COLLINS, J. D. Tuberculosis in cattle: new perspectives. **Tuberculosis Journal**, v. 81, n. 1/2, p. 17-21, 2001.

CORNER, L. A.; MELVILLE, L.; McCUBBIN, K.; SMALL, K. J.; McCORMICK, B. S.; WOOD, P. R.; ROTHEL, J. S. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, n. 11, p. 389-392, 1990.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 53-63, 1994.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; MESLIN F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, V.4, n. 1, 1998.

COSTA, A. C. F. Tuberculose bovina: diagnóstico anatomo-histopatológico, bacteriológico e molecular em animais abatidos na Região Metropolitana de Salvador, Bahia. **Dissertação de Mestrado**. Salvador, Bahia, 46 p. 2008.

COUSINS, D. V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. **Revue Scientifique et Technique**, v. 20, n. 1, p. 71-85, 2001.

CRETELLA, R. V.; MARTINS, R. L. G.; PINHEIRO JUNIOR, O. A. Incidência e destino de carcaças de bovinos acometidos por tuberculose na região centro oeste paulista no período de julho à dezembro de 2004. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 6, 2006.

DELAHAY, R. J.; SMITH, G. C.; WARD, A. I.; CHEESEMAN, C. L. Options for the management of bovine tuberculosis transmission from badgers (*Meles meles*) to cattle: evidence from a long-term study. **Mammal Study**, v. 30, p. 73-81, 2005.

DELGADO, E. M.; ABRANTES, M. R.; SOUSA, I. K. F.; NEVES, K. A. L.; MOREIRA, T. R.; VINHOLTE, B. P.; CASTRO, A. N.; SILVA, J. B. A. Condenação de carcaças acometidas de lesões sugestivas de tuberculose em abatedouro na região oeste do Pará, Brasil. In: IX Congresso Brasileiro Buiatria. **Anais...**, Goiânia. Vet. e Zootec. 2011, v. 18.

DEMELASH, B.; INANGOLET, F.; OLOYA, J.; ASSEGED, B.; BADASO, M.; YILKAL, A.; SKJERVE, E. Prevalence of Bovine tuberculosis in Ethiopian slaughter cattle based on post-mortem examination. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 755-765, 2009.

DEMELASH, B.; ASSEGED, B.; SKJERVE, E. Diagnostic efficiency of abattoir meat inspection service in Ethiopia to detect carcasses infected with *Mycobacterium bovis*: Implications for public health. **BMC Public Health**, v. 10, p. 462, 2010.

DEMELASH, B.; INANGOLET, F.; ASSEGED, B.; OLOYA, J.; DJONNE, B.; SKJERVE, E. Risk factors associated with prevalence of tuberculosis-like lesions and associated mycobacteria in cattle slaughtered at public and export abattoirs in Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, p. 529-538, 2011.

DIGUIMBAYE-DJAIBÉ, C.; HILTY, M.; NGANDOLO, R.; MAHAMAT, H. H.; PFYFFER, G. E.; BAGGI, F.; HEWINSON, G.; TANNER, M.; ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E. *Mycobacterium bovis* Isolates from Tuberculous Lesions in Chadian Zebu Carcasses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, 2006.

DREWE, J. A.; DEAN, G. S.; MICHEL, A. L.; PEARCE, G. P. Accuracy of three diagnostic tests for determining *Mycobacterium bovis* infection status in live-sampled wild meerkats (*Suricata suricatta*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21. p.31-39, 2009.

DUARTE, E. L.; DOMINGOS, M.; ALBUQUERQUE, T.; AMADO, A.; BOTELHO, A. Transmissão da tuberculose bovina entre espécies domésticas e silvestres em Portugal: primeiras evidências moleculares em isolados de *Mycobacterium bovis* de uma exploração no Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 299-303, 2007.

ENRÍQUEZ-CRUZ, C.; CRUZ-HERNÁNDEZ, N. I.; ZERTUCHE-RODRÍGUEZ, J. L.; URIGAS-GARCÍA, J. L.; TOSCANO-RUIZ, J. E.; FLORES-GUTIÉRREZ, G. H. Epidemiology of bovine tuberculosis in Mexico, bordering the United States, at establishment of controlling strategies. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1029-1035, 2010.

FERNANDES, J. O. M.; NETO, R. S.; SILVA, H. L.; SILVA, C. S. P.; SOUTELLO, R. V. G.; BORGES, J. H. R.; FARIA, R. F.; COELHO, R. V.; TANAKA, D.; SOUSA, C. H. F.; DIAS, A. E. Prevalência da tuberculose bovina determinada através de exames realizados em carcaças de bovinos abatidos no município de Andradina-SP. **Ciências Agrárias**, v. 3, n.2, p. 07-12, 2003.

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Revista Higiene Alimentar**. v. 11, p. 9-13, 1997. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0008.htm>>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.

FIGUEIREDO, S. M.; ROCHA, V. C. M.; HIGINO, S. S. S.; BATISTA, C. S. A.; ALVES, C. J.; CLEMENTINO, I. J.; AZEVEDO, S. S. Tuberculose bovina no Estado da Paraíba: estudo retrospectivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p.712-716, 2010.

FONSECA, M. A. F.; COLLARES, R. L. M.; FONSECA, P. A. F. Principais doenças diagnosticadas em matadouros frigoríficos com inspeção municipal, Bagé-RS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 11, p. 9-13, 2008.

FRÁGUAS, S. A.; CUNHA-ABREU, M. S.; FERREIRA, A. M. R.; MARASSI, C. D.; OELEMANN, W.; FONSECA, L. S.; FERREIRA, R.; LILENBAUM, W. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 15, n. 3, p. 117-121, set./dez. 2008.

FREITAS, J. A.; PANETTAB, J. C.; CURCIO, M.; UEKIC, S. Y. M. Isolamento de cepas de *Mycobacterium avium* em búfalos abatidos para consumo. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 315-317, 2001.

FURLANETTO, L. V.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE JÚNIOR, C. A.; SILVA, F. G. S.; DUARTE, R. S.; SILVA, J. T.; LILENBAUM, W.; PASCHOALIN, V. M. F. Prevalência de tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 274-280, 2012.

GARRO, C.; COBOS ROLDÁN, M.; ORIANI, S.; GARBACCIO S. Tuberculosis en terneros: resultados de un estudio prospectivo. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 12, n. 12, 2011.

GRISI FILHO, J. H. H.; ROSALES, C. A. R.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S. Análise epidemiológica das condenações de bovinos por tuberculose em abatedouros do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 175-181, abr./jun., 2011.

HAYDON, D. T.; CLEVELAND, S.; TAYLOR, L. H.; LAURENSEN, M. K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, 2002.

HOLANDA, E. D.; LOBATO, F. C. F.; MOTA, P. M. P. C.; ABREU, V. L. V. Avaliação de métodos de descontaminação para isolamento de *Mycobacterium bovis*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 54-57, 2002.

HOPE, J. C.; THOM, M. L.; MCCORMICK, P. A.; HOWARD, C. J. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, p. 187-195, 2004.

HUMBLET, M. F.; BOSCHIROLI, M. L.; SAEGERMAN, C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. **Veterinary Research**, v. 40, n. 50, 2009.

JÚNIOR, M. E. K.; SOUSA, C. L. M. Considerações sobre a tuberculose bovina no norte Fluminense e no município de Campos dos Goytacazes após o advento do PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. **Perspectivas online**, v. 2, n. 8, 2008.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 111-118, 2006.

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

LAISSE, C. J. M.; GAVIER-WIDÉN, D.; RAMIS, G.; BILA, C. G.; MACHADO, A.; QUEREDA, J. J.; ÅGREN, E. O.; HELDEN P. D. Characterization of tuberculous lesions in naturally infected African buffalo (*Syncerus caffer*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 5, p. 1022-1027, 2011.

LATINI, O.; CANAL, A. M.; FERRARA, M. E.; SEQUEIRA, M. D.; SEQUEIRA, G.; BAGNAROLI, R.; TORRES, P. Confiabilidad en la determinación de prevalência de infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomisos en frigoríficos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 29, n. 2, 1997.

LAVAGNOLI, M. R.; AMORIM, B. M.; MACHADO, G. P.; DEMONER, L. C.; ZANINI, M. S.; ANTUNES, J. M. A. P. Tuberculose em bovinos no estado do Espírito Santo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 1, p. 71-78, 2010.

LIGHTBODY, K. A.; SKUCE, R. A.; NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. **Veterinary Record**, v. 142, p. 295-300, 1998.

LILENBAUM, W.; PESSOLANI, M. C. V.; FONSECA, L. S. The use of Ag85 complex as antigen in ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 48, p. 161-166, 2001.

LILENBAUM, W.; FONSECA, L. S. The use of Elisa as a complementary tool for bovine tuberculosis control in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 256-261, 2006.

MACENTE, S.; RIBEIRO, F. H. M. Diagnóstico molecular de *M. Tuberculosis*: uma revisão de técnicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 2, p. 225-231, 2009.

MARCONDES, A. G.; SHIKAMA, M. L. M.; VASCONCELLOS, S. A.; BENITES, N. R.; MORAIS, Z. M.; ROXO, E.; DIAS, R. A.; LEÃO, S. L. P. C.; PINHEIRO, S. R. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium Bovis* em amostras de campo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 362-369, 2006.

MARTÍNEZ, H. Z.; SUAZO, F. M.; GIL, J. Q. C.; BELLO, G. C.; ESCALERA, A. M. A.; MÁRQUEZ, G. H.; CASNOVA, L. G. Spatial epidemiology of bovine tuberculosis in Mexico. **Veterinaria Italiana**, v. 43, n. 3, p. 629-634, 2007.

MARTINS, S. C. Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em cortes histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos. **Dissertação de Mestrado**. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 55 p. 2004.

MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010.

MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LEITE, J.; FERREIRA, A. M. R.; LILENBAUM, W. Assessing the histopathology to depict the different stages of bovine tuberculosis infection in a naturally infected herd. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2. p. 135-139, 2012.

MENZIES, F. D.; NEILL, S. D. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. **The Veterinary Journal**, v. 160, p. 92-106, 2000.

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

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

MOLICOTTI, P.; BUA, A.; CANNAS, S.; RUGGERI, M.; MURA, A.; ZANETTI, S. Preliminary data of different methods for the indirect diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. **New Microbiologica**, v. 34, p. 323-325, 2011.

MONOGHAN, 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.

MORRISON, W. I.; BOURNE, F. J.; COX, D. R.; DANNELLY, C. A.; GETTINBY, G.; MCLNERNEY, J. P.; WOODROFFE, R. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. **The Veterinary Record**, n. 26, 2000.

MUNYEME, M.; MUNANG'ANDU, H. M. A review of bovine tuberculosis in the Kafue Basin ecosystem. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011.

MURAKAMI, P. S.; FUVERKI, R. B. N.; NAKATANI, S. M.; FILHO, I. R. B.; BIONDO, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 12, n. 1, p. 67-74, jan./jun. 2009.

MUSTAFA, T.; WIKER, H. G.; MFINANGA, S. G. M.; MØRKVE, O. SVILAND, L. Immunohistochemistry using a *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis. **Modern Pathology**, v. 19, p. 1606-1614, 2006.

NDUKUM, J. A.; KUDI, A. C.; BRADLEY, G.; ANE-ANYANGWE, I. N.; FON-TEBUG, S.; TCHOUMBOUE, J. Prevalence of bovine tuberculosis in abattoirs of the littoral and western highland regions of Cameroon: a cause for public health concern. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, 2010.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 41-52, 1994.

NEILL, S. D.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1/2, p. 79-86, 2001.

NEILL, S. D.; SKUCE, R. A.; POLLOCK, J. M. Tuberculosis – new light from an old window. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1261-1269, 2005.

OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I. Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no Estado do Amazonas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 433-439, 2004.

OHARA, P. M. Microbiologia e histopatologia de linfonodos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo, São Paulo, 106 p. 2006.

OLIVEIRA, A. F. F.; MOREIRA, M. D.; NOMEINI, Q. S. S. Principais zoonoses detectadas em um matadouro frigorífico do triângulo mineiro e seus impactos na cadeia produtiva. **Cadernos de Pós-Graduação da FAZU**. v. 1, 2010. Disponível em: < <http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/viewFile/323/229>>. Acesso em 08 de agosto de 2012.

OLIVEIRA, I. A. S.; MELO, H. P. C.; CÂMARA, A.; DIAS, R. V. C.; SOTO-BLANCO, B. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 395-400, 2007.

OLIVEIRA, V. M.; FONSECA, A. H.; PEREIRA, M. J. S.; CARNEIRO, A. V.; JESUS, V. L. T.; ALVES, P. A. M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 574-579, 2008.

OLMSTEAD, A. L.; RHODE, P. W. An Impossible undertaking: the eradication of bovine tuberculosis in the United States. **The Journal of Economic History**, v. 64, n. 3, 2004.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 181-190, 2006.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Bovine Tuberculosis and the establishment of an eradication program in the United States: role of veterinarians. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R.; THACKER, T. C.; Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 863-874, 2007.

- PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; MORAN, J.; MENDOZA, J. H. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v. 127, p. 315-324, 2008.
- PINTO, P. S. A. Atualização em controle da tuberculose no contexto da inspeção de carnes. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, p. 115-121, 2003.
- POLETTI, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 595-595, 2004.
- POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, v. 163, n. 2, p. 115-127, 2002.
- POLLOCK, J. M.; MCNAIR, J.; BASSETT, H.; CASSIDY, J. P.; COSTELLO, E.; AGGERBECK, H.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1856-1860, may, 2003.
- POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D.; MCNAIR, J. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 37-43, 2005.
- PROAÑO-PEREZ, F.; RIGOUTS, L.; BRANDT, J.; DORNY, P.; RON, J.; CHAVEZ, M. A.; RODRIGUEZ, R.; FISSETTE, K.; AERDE, A. V. A.; PORTAELS, F.; BENITEZ-ORTIZ, W. Preliminary observations on *mycobacterium* spp. in dairy cattle in Ecuador. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 2, p. 318-323 2006.
- PROAÑO-PEREZ, F.; BENÍTEZ-ORTIZ, W.; DESMECHTD, D.; MARCO, C.; ORTIZ, J.; RON, L.; PORTAELS, F.; RIGOUTS, L.; LINDEN, A. Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 101, p. 65-72, 2011.
- PUROHIT, M. R.; MUSTAFA, T.; WIKER, H. G.; MØRKVE, O.; SVILAND, L. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen MPT64. **Diagnostic Pathology**, v. 2, n. 36, 2007.
- REDDINGTON, K.; O'GRADY, J.; DORAI-RAJ, S.; NIEMANN, S.; VAN SOOLINGEN, D.; BARRY, T. A novel multiplex Real-Time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

RIBEIRO, A. R. P.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V.; FARIA, E. S.; SILVA, J. A. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, 2003.

RIVERA, P. S.; GIMÉNEZ, J. F. La tuberculosis bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 11, n. 9, p. 1695-7504, 2010.

RODRIGUEZ, C. A. R.; ZUMÁRRAGA, M. J.; OLIVEIRA, E. M. D.; CATALDI, A. A.; ROMANO, M. I.; OTTO, H. H.; BONAFÉ, V. L.; FERREIRA NETO, J. S. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de *Spoligotyping*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 277-282, 2004.

RORING, S.; HUGHES, M. S.; SKUCE, R. A.; NEILL, S. D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 227-236, 2000.

RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A. T.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; CHRISTIANSEN, K. H.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 190-210, 2006.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

SABEDOT, M. A.; BATISTA, P. BRITO M.; POZZA, S. S.; BUSANELLO, M.; ALMEIDA, R. Z.; RODRIGUES, M. Prevalência de tuberculose bovina na região sudoeste do Paraná. In: ZOOTEC, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...**, Águas de Lindóia, São Paulo, 2009.

SALAZAR, F. H. P. Ocorrência da tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigorífico no Estado do Mato Grosso, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 73 p. 2005.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H. M.; PALMER, M. V.; HARRIS, B. N.; ORLOSKI, K. A.; BUDDLE, B. M.; THACKER, T. C.; LYASHCHENKO, K. P.; WATERS, W. R. Bovine Tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 205-220, 2010.

SILVA, M. C. P.; MULLER, E. E.; FERREIRA, F.; MOTA, A. L. A. A., KOLODA, M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P. Situação epidemiológica da tuberculose bovina no estado do Paraná. In: 1º ENCONTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA VETERINÁRIA, 2012, São Paulo, **Resumos...**, Acta Scientiae Veterinariae. 40 (Supl 2): 2012.

SOUZA, A. V.; SOUZA, C. F. A.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, A. L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Revista Higiene Alimentar**. v. 13, n. 59, p. 22-27, 1999. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0001.htm>> Acesso em 09 de novembro de 2012.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 16, n. 3, p. 463-496, 2003.

SMYTH, A. J.; WELSH, M. D.; GIRVIN, R. M.; POLLOCK, J. M. In Vitro responsiveness of $\gamma\delta$ T Cells from *Mycobacterium bovis* - infected cattle to Mycobacterial Antigens: predominant involvement of WC1⁺ Cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 89-96, 2001.

STRAIN, S. A. J.; MCNAIR, J.; MCDOWELL, S. W. J. Bovine tuberculosis: A review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in cattle. **Agri-Food and Biosciences Institute**. Disponível em: <<http://www.dardni.gov.uk/de/afbi-literature-review-tb-review-diagnostic-tests-cattle.pdf>> Acesso em 10 de outubro de 2012.

SURUJBALLI, O. P.; ROMANOWSKA, A.; SUGDEN, E. A.; TURCOTTE, C.; JOLLEY, M. E. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 149-157, 2002.

TEKLU, A.; ASSEGED, B.; YIMER, E.; GEBEYEHU, M.; WOLDESENBET, Z. Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. **Revue Scientifique et Technique Office international des Epizooties**, v. 23, n. 3, p. 957-964, 2004.

UNGER, F.; MÜNSTERMANN, S.; GOUMOU A.; APIA C. N.; KONTE M. Risk associated with *Mycobacterium bovis* infections detected in selected study herds and slaughter cattle in 4 countries of West Africa. **Animal Health Working Paper 1**. ITC (International Trypanotolerance Centre), Banjul, The Gambia, 25 p. 2003.

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 164-169, 2008.

- WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gd (WC1⁺) T cells and CD 68⁺ cells. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 223-234, 2005.
- WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; WHIPPLE, D. L.; CARLSON, M. P.; NONNECKE, B. J. Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 960-966, 2003.
- WATRELOT-VIRIEUX, D.; DREVON-GAILLOT, E.; TOUSSAINT, Y.; BELLI, P. Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in french cattle. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 53, p. 321-325, 2006.
- WEDLOCK, D. N.; SKINNER, M. A.; LISLE, G. W. D.; BUDDLE, B. M. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 471-480, 2002.
- WILDNER, L. M.; NOGUEIRA, C. L.; SOUZA, B. S.; SENNA, S. G.; SILVA, R.M.; BAZZO, M. L. Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 3, p. 207-229, 2011.
- WIKER, H. G. MPB70 and MPB83 – Major Antigens of *Mycobacterium bovis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, p. 492-499, 2009.
- WOOD, P. R.; JONES, S. L. BOVIGAMTM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1/2, p. 147-155, 2001.
- WÜRFEL, S. F. R.; ROSA, J. V.; PRATES, FONTOURA, D.; LANSINI, V.; SILVA, W. P. Prevalência de tuberculose em matadouros-frigoríficos da região de Pelotas-RS no período de 2004 a 2008. In: XVIII CIC-XI ENPOS-I MOSTRA CIENTÍFICA. **Anais...**, Pelotas, 21 a 23.10.2009.
- YEBOAH-MANU, D.; YATES, M. D.; WILSON, S. M. Application of a simple Multiplex PCR to aid in routine work of the *Mycobacterium* reference laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4166-4168, 2001.
- ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T. P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIORAVANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by Spolygotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, 2001.

ARTIGO

**Artigo submetido ao Comitê Editorial da Revista Brasileira de Saúde e
Produção Animal - RBSPA**

**Prevalência e histopatologia de lesões macroscópicas sugestivas de
tuberculose em bovinos abatidos no sudoeste da Bahia**

*Prevalence and histopathology of suggestive macroscopic lesions of
tuberculosis in slaughtered cattle in Southwest Bahia*

FRANÇA, Leonardo Rosa da^{1*}; CRUZ, Jurandir Ferreira da²; PEDROSO,
Pedro Miguel Ocampos³; CERQUEIRA, Robson Bahia⁴

Prevalência e histopatologia de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no Sudoeste da Bahia

Prevalence and histopathology of macroscopic lesions suggestive of tuberculosis in slaughtered cattle in Southwestern Bahia

FRANÇA, Leonardo Rosa da^{1*}; CRUZ, Jurandir Ferreira da²; PEDROSO, Pedro Miguel Ocampos³; CERQUEIRA, Robson Bahia⁴

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

²Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Curso de Agronomia, Departamento de Fitotecnia e Zootecnia, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil.

³Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Curso de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

⁴Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Curso de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

*Endereço para correspondência: leonardorf@bol.com.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia dos procedimentos de inspeção na detecção de lesões sugestivas de tuberculose e determinar a prevalência dessas lesões em bovinos abatidos na região Sudoeste da Bahia. No período de março a novembro de 2012 foram inspecionados 58.268 bovinos abatidos em um matadouro frigorífico em Vitória da Conquista. A inspeção consistiu na avaliação sistemática dos gânglios linfáticos e órgãos em busca das lesões sugestivas, por meio de exame visual e tátil com posterior incisão dos gânglios linfáticos. Setenta (0,12%) animais abatidos apresentaram 99 linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose. Ao exame histopatológico, 60,6% das amostras apresentaram lesões histológicas características de processo inflamatório do tipo granulomatoso, sugestivas de micobactérias. Das amostras coradas com Ziehl-Neelsen, 10,01% apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes, sendo, portanto, positivas para micobactérias. Em conclusão, a prevalência de carcaças bovinas com tuberculose no Sudoeste da Bahia é baixa e os procedimentos na rotina de inspeção *post mortem* são satisfatórios para detectar lesões sugestivas dessa zoonose.

Palavras-chave: Diagnóstico, granuloma, inspeção, *Mycobacterium spp*

SUMMARY

The aim of this study was to verify the effectiveness of inspection procedures for the detection of suggestive tuberculosis lesions and determine the prevalence those lesions in cattle slaughtered in Southwestern Bahia. From March to November 2012, 58,268

slaughtered animals were inspected in a slaughterhouse in Vitoria da Conquista. The inspection consisted in a systematic evaluation of the lymph nodes and organs searching for suggestive lesions, through visual and tactile examination with subsequent incision of the lymph nodes. Seventy (0.12%) slaughtered animals presented 99 lymph nodes with suggestive lesions of tuberculosis. To histopathology, 60.6% of the samples had histological lesions characteristic of inflammatory granulomatous process, suggestive of mycobacteria. From samples stained with Ziehl-Neelsen, 10.01% had acid-fast bacilli resistant, and therefore positive for mycobacteria. In conclusion, the prevalence of cattle carcasses with tuberculosis in Southwestern Bahia is low and the procedures in routine post mortem inspection are satisfactory for detecting lesions suggestive of this zoonosis.

Keywords: Diagnosis, granuloma, inspection, Mycobacterium spp

INTRODUÇÃO

Historicamente, os matadouros frigoríficos têm sido utilizados como um instrumento de fiscalização e diagnóstico das doenças transmissíveis, constituindo-se em relevantes ferramentas de vigilância epidemiológica de enfermidades, em especial daquelas de caráter zoonótico (FUKUDA et al., 2003).

Dentre as zoonoses alimentares detectadas durante o exame *post mortem* nos matadouros frigoríficos de bovinos, destaca-se a tuberculose, enfermidade grave que apresenta grande impacto econômico e na saúde pública, sendo considerada como uma das doenças zoonóticas mais importantes para os seres humanos (PINTO, 2003).

O diagnóstico da tuberculose bovina, nos matadouros frigoríficos é realizado com base na observação de lesões típicas macroscópicas em carcaças e órgãos durante a inspeção de carnes (DIGUIMBAYE-DJAIBÉ et al., 2006). No entanto, apesar da importância que representa para a prevenção da tuberculose, a avaliação baseada no diagnóstico anatomopatológico, é muitas vezes posta em dúvida, pois além do fato de que muitos animais condenados por tuberculose apresentam-se aparentemente saudáveis, outras lesões podem, macroscopicamente, serem confundidas com

tuberculose e em alguns animais infectados por *Mycobacterium bovis*, as lesões macroscópicas podem não ser visíveis nos tecidos examinados (TEKLU et al., 2004).

Os exames histológicos, além de permitir a identificação das lesões micobacterianas típicas e a diferenciação de outras causas (VARELLO et al., 2008), se constituem em importante instrumento de diagnóstico conclusivo da tuberculose pela sua praticidade, rapidez e baixo custo (WATRELOT-VIRIEUX et al., 2006).

A realização de inquéritos epidemiológicos em matadouros é um indicador da prevalência da enfermidade nos animais destinados ao abate e, portanto da probabilidade da exposição humana através do consumo de carne infectada, bem como, fornece dados que podem ajudar na definição do modelo de programa estatístico a ser utilizado para se averiguar a prevalência nos rebanhos (DEMELASH et al., 2010). Estudos realizados em diversos estados do Brasil revelam uma ampla variação na prevalência de lesões de tuberculose em bovinos abatidos (FERNANDES et al., 2003; BAPTISTA et al., 2004; CRETELLA et al., 2006; DELGADO et al., 2011; FURLANETTO et al., 2012).

Na Bahia, os inquéritos epidemiológicos sobre a prevalência da tuberculose foram executados apenas em propriedades rurais, utilizando o exame *in vivo* da tuberculinização comparada, sendo que em dois levantamentos realizados no município de Ilhéus (RIBEIRO et al., 2003) e de Alagoinhas (COSTA et al., 1996), 2,8% e 5,5%, respectivamente, dos animais foram identificados como positivos para tuberculose e em um estudo epidemiológico estadual, realizado pela Agência de Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), no período entre 2008 a 2010, foi constatada a prevalência de focos e de animais reagentes a tuberculose de 1,6% e 0,21%, respectivamente (ÁVILA et al., 2012).

O presente estudo teve como objetivo verificar a eficácia dos procedimentos de inspeção na detecção de lesões sugestivas de tuberculose e determinar a prevalência dessas lesões em bovinos abatidos na região Sudoeste da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no matadouro-frigorífico CONFRIGO, localizado na Rodovia BR 116, Km 867, Vitória da Conquista - BA (14°53'00" S, 40°48'00" O). O estabelecimento, sob Serviço de Inspeção Estadual (ADAB/DIPA), funciona como um pólo regional de abate de bovinos prestando serviços a diversos municípios da região Sudoeste da Bahia.

As amostras foram coletadas no período de março a novembro de 2012, quando foram abatidos 58.268 bovinos procedentes de 76 municípios baianos (Figura 1). Todos os animais apresentavam-se sadios ao exame *ante mortem*.

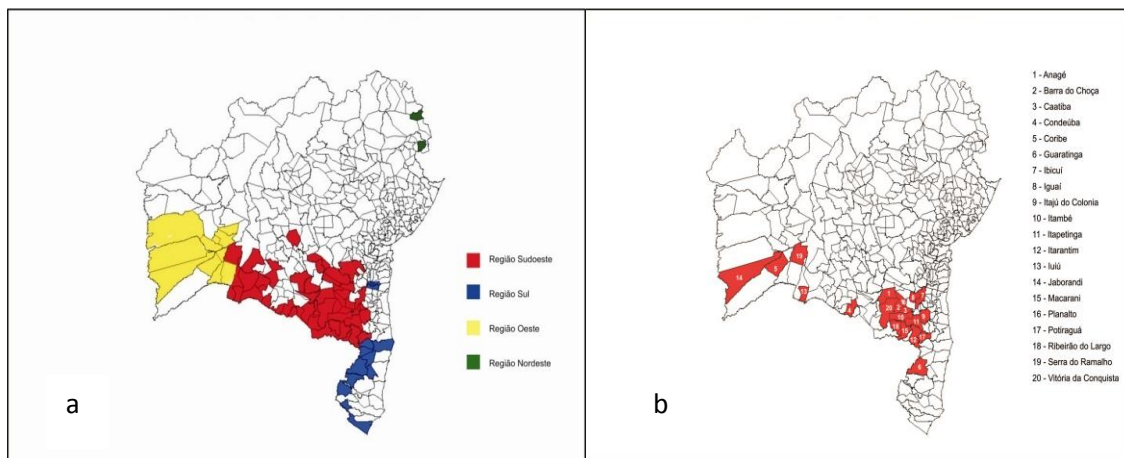


Figura 1. Municípios de procedência (a) e com lesões sugestivas tuberculose (b), em bovinos abatidos em Vitória da Conquista-BA

O material biológico foi coletado de 70 bovinos procedentes de 20 municípios (Figura 1), submetidos a exames de carcaças e vísceras durante a inspeção sanitária *post*

mortem. As carcaças suspeitas foram desviadas para o Departamento de Inspeção Final (DIF) por apresentarem, macroscopicamente, alterações sugestivas de tuberculose.

A inspeção consistiu em avaliação sistemática dos gânglios linfáticos e órgãos dos animais abatidos em busca das lesões sugestivas, realizando-se exames visuais e táteis com posterior incisão longitudinal profunda dos gânglios linfáticos divididos através das seguintes linhas de inspeção: Linha B: Atloídiano, parotídiano, retrofaríngeo, e sublingual; Linha D: Mesentérico; Linha E: Hepático; Linha F: Apical, traqueobrônquial, esofágica e mediastinal; Linha H: pré-crural, inguinais ou retromamário, ilíacos e isquiáticos; Linha I: pré-escapular. As carcaças e órgãos que apresentaram lesões sugestivas de tuberculose foram destinados a condenação total, rejeição parcial ou esterilização pelo calor de acordo com gravidade e a extensão das lesões encontradas, conforme preconizado pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de origem Animal (RIISPOA), Artigo 196 (BRASIL, 1997).

Foram retiradas de lesões nodulares, hemorrágicas ou não, amostras de tamanhos e formas variadas, contendo exudato purulento, caseoso ou calcificado. Fragmentos das lesões com tamanho aproximado de 2x2 cm, abrangendo a zona de transição entre a área lesada e a área aparentemente normal, foram coletados e acondicionados em frascos plásticos de boca larga, contendo formol a 10%, na proporção de 5 a 10 partes de fixador para cada parte de material colhido. Os recipientes contendo as amostras, devidamente identificados, foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

As amostras foram fotografadas e examinadas para a descrição das alterações macroscópicas. Posteriormente, foram recortadas com no máximo 8,0 mm de espessura

de forma que o fragmento de lesão contivesse a zona de transição entre a lesão e o tecido normal, a cápsula e o material necrótico. Depois de clivados, os fragmentos foram processados, conforme sugerido por Behmer et al. (1976), para o diagnóstico histopatológico por coloração com Hematoxilina-Eosina . Os achados histopatológicos foram interpretados como sugestivo ou negativo para micobactéria com base nas classificações descritas por Ohara (2006) e Varello et al. (2008).

Foram consideradas sugestivas para micobactérias as amostras que apresentavam pelo menos uma das três condições: a) granuloma tuberculoso exibindo necrose, com ou sem calcificação, inflamação crônica e células gigantes de Langerhans; b) presença de necrose, calcificação e inflamação crônica; c) presença de células gigantes. Por outro lado foram consideradas negativas para micobactérias as amostras com: a) alterações isoladas: necrose ou calcificação ou inflamação crônica; b) necrose e calcificação; c) alterações patológicas não condizentes com granuloma tuberculoso, incluindo, significativo infiltrado eosinofílico, hiperplasia linfóide, presença de colônias de bactérias dentro da área necrótica e tumores; d) ausência de quaisquer alterações patológicas.

Todas as amostras foram destinadas a coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) para a identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) com a finalidade de se obter diagnóstico definitivo, conforme sugerido por Behmer et al. (1976). As lâminas coradas pelo método ZN foram avaliadas em microscópio óptico de luz, sendo que aquelas que apresentavam bacilos evidenciados foram fotomicrografadas.

Os achados histopatológicos foram interpretados como positivo ou negativo para micobactéria, conforme sugerido por Varello et al. (2008). Foram consideradas positivas para micobactérias as amostras que apresentaram um ou mais BAAR, em pelo

menos uma seção da amostra. As amostras, cujos cortes não apresentaram pelo menos um BAAR foram consideradas negativas.

As frequências dos linfonodos com alterações sugestivas de tuberculose, por região anatômica (cabeça-pescoço, carcaça e cavidades) identificados nos exames anatômopatológico e histopatológico foram comparados pelo teste qui-quadrado em nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao exame *post mortem*, 70 bovinos de um total de 58.268 abatidos apresentaram lesões sugestivas de tuberculose, correspondendo à prevalência de 0,12%. Os municípios de Condeúba, Jaborandi e Guaratinga, a despeito do pequeno número de animais abatidos (201/58.268), foram os que apresentaram as maiores prevalências de animais suspeitos (Tabela 1).

Os municípios de Vitória da Conquista, Itambé e Itapetinga, que juntos totalizaram 24,74% dos animais abatidos no período, foram responsáveis por 58,57% dos bovinos com lesões sugestivas de tuberculose (25,71%, 21,42% e 11,42%, respectivamente). No entanto, a prevalência de animais suspeitos nesses três municípios foi $\leq 0,20\%$ (Tabela 1).

A prevalência de animais com lesões sugestivas de tuberculose encontrada na rotina de inspeção *post mortem*, em bovinos abatidos no sudoeste da Bahia foi inferior à descrita em países africanos, 10,1% na Etiópia (DEMELASH et al., 2009), 0,18-4,25% em Camarões (NDUKUM et al., 2010). No Brasil, a prevalência varia em função do estado considerado, sendo de 0,007% no Mato Grosso (FURLANETTO et al., 2012), 0,21-0,81% em São Paulo (FERNANDES et al., 2003; CRETILLA et al., 2006),

0,82% no Pará (DELGADO et al., 2011) e 0,7% em Minas Gerais (BAPTISTA et al., 2004).

Tabela 1. Prevalência de bovinos abatidos com lesões sugestivas de tuberculose observadas ao exame *post mortem* em Vitória da Conquista-BA

Município	Bovinos abatidos	Prevalência de bovinos com lesão presuntiva de tuberculose	
		nº	%
Anagé	1224	3	0,25
Barra do Choça	2717	2	0,07
Caatiba	1408	1	0,07
Condeúba	70	3	4,29
Coribe	328	1	0,30
Guaratinga	88	1	1,14
Ibicuí	324	3	0,93
Iguaí	889	1	0,11
Itajú do Colônia	116	1	0,86
Itambé	7602	15	0,20
Itapetinga	4886	8	0,16
Itarantim	3417	1	0,03
Iuiu	538	2	0,37
Jaborandi	43	1	2,33
Macarani	2832	2	0,07
Planalto	1633	1	0,06
Potiraguá	1851	1	0,05
Ribeirão do Largo	1747	3	0,17
Serra do Ramalho	229	2	0,87
Vitória da Conquista	9459	18	0,19
Total	58268	70	0,12

Em levantamento recente realizado em propriedades rurais, utilizando a tuberculinização comparada, Ávila et al. (2012) encontraram prevalência de 0,21% para animais positivos no Estado da Bahia, portanto, superior aos achados do presente estudo. Essa diferença pode ser devida ao fato da inspeção de rotina *post mortem* não identificar todos os animais doentes, além disto, eventos extrínsecos a inspeção tais como a canalização dos animais de descarte para o abate clandestino ou a eliminação de bovinos positivos na unidade de criação, podem interferir na estimativa

(FURLANETTO et al., 2012). Contudo, a prevalência de lesões de tuberculose encontrada em animais abatidos no Sudoeste da Bahia é um indicativo da realidade sanitária da doença nos rebanhos baianos.

Em regiões onde o *status* sanitário é de baixa prevalência da tuberculose, como a encontrada na Bahia, a implantação de eficientes sistemas de vigilância, integrando os serviços de inspeção oficiais com os de defesa sanitária, pode ser de grande valia na detecção de focos remanescentes (FURLANETTO et al., 2012). A determinação da prevalência e a descrição anatômica e histopatológica das lesões tuberculosas, em inquérito realizado em matadouro regional contribuem para o delineamento de ações para o controle e/ou erradicação da doença no Estado da Bahia.

Durante os exames *post mortem*, foram identificados e coletados, dos 70 animais suspeitos, 99 linfonodos com lesões presuntivas de tuberculose. Os linfonodos mais acometidos foram pré-escapulares (51,5%) traqueobronquiais (19,2%) e isquiáticos (11,1%).

As alterações histopatológicas observadas nos fragmentos analisados consistiram de nodulações com estrutura discretamente diferente do tecido adjacente e nódulos com massa amorfa repleta de material caseoso encapsulado, por vezes sendo observadas áreas multifocais coalescentes. As lesões macroscópicas dentro dos linfonodos variaram em coloração (de branca a branco-amarelada), número e dimensões. Em geral, as lesões eram bem delimitadas, sendo que algumas apresentaram contorno irregular. Ao corte, embora macias, sentiu-se o ranger da lâmina na maioria das lesões, sugerindo a ocorrência de mineralização (Figura 2).



Figura 2. Linfonodo peitoral com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, com forma arredondada, bem delimitada, cor amarelada e consistência firme

Considerando a localização por região anatômica, dentre os linfonodos acometidos da cabeça-pescoço, 96,22% pré-escapulares e 3,78% parotídeos. Dos linfonodos localizadas nas cavidades torácica e abdominal, 63,3% traqueobrônquiais, 20,0% hepáticos e 16,7% mediastínicos. Na carcaça, 68,75% isquiáticos, 18,75% peitorais e 6,25% Ilíacos e pré-crurais (Tabela 2).

O elevado percentual de lesões sugestivas de tuberculose identificadas na região da cabeça e pescoço pode estar relacionado à maior atenção dispensada ao linfonodo pré-escapular, na rotina de inspeção, além disto, algumas lesões diagnosticadas como granulomatosas, podem ser confundidas com a reação vacinal, provocada pela aplicação de vacinas na região da paleta e pescoço, cujos adjuvantes minerais, quando drenados para os linfonodos regionais, podem provocar lesões macroscopicamente semelhantes (FURLANETTO et al., 2012).

Tabela 2. Distribuição de lesões sugestivas de tuberculose em linfonodos de bovinos abatidos em Vitória da Conquista-BA

Localização anatômica	Lesão sugestiva de tuberculose	
	n	%
Linfonodos da cabeça/pescoço (parotídeo e pré-escapular)	53	53,5
Linfonodos da cavidade torácica e abdominal (traqueobronquial, mediastínico e hepático)	30	30,3
Linfonodos da carcaça (pré- crural, isquiático, ilíaco e peitoral)	16	16,2
Total	99	100,00

A elevada presença de lesões sugestivas de tuberculose encontradas na região da cabeça-pescoço (73,2%) foi verificada também por Furlanetto et al. (2012). No entanto, há relatos de maior prevalência lesões sugestivas de tuberculose (60,6% a 84,0%) nos linfonodos da cavidade torácica (Freitas et al., 2001; Teklu et al., 2004). Esses achados, analisados de forma conjunta com o presente estudo, mostram que os linfonodos das regiões da cabeça-pescoço e cavidade torácica são de fato os mais frequentemente acometidos.

No presente estudo não foram detectadas lesões sugestivas de tuberculose nos linfonodos mesentéricos. Esta não ocorrência pode ser atribuída ao fato da via oral ser uma forma de propagação secundária à respiratória, justificando maior frequência de lesões nos linfonodos da cavidade torácica (PALMER & WALTERS, 2006). Por outro lado, a baixa atenção dispensada aos linfonodos mesentéricos pode ser um fator de falhas no exame *post mortem*, uma vez que quando estes são examinados mais detalhadamente ocorre aumento considerável no número de carcaças identificadas com lesões sugestivas de tuberculose (CORNER et al., 1990).

Evidencia-se então a necessidade de melhoria nos atuais procedimentos de inspeção, sendo recomendável o exame de maior número de linfonodos, incluindo

aqueles que se localizam em regiões ainda não previstas na legislação, bem como, que seja dispensada a mesma atenção a todos os linfonodos inspecionados, independente da região anatômica.

Das amostras de linfonodos corados pela HE, 60,6% (60/99) foram sugestivas para micobactérias, apresentando lesões histológicas características de um processo inflamatório do tipo granulomatoso típico de tuberculose com necrose, calcificação, células gigantes e inflamação crônica (Tabela 3). Esses achados foram bastante semelhantes aos verificados por Varello et al. (2008), os quais relatam que, das amostras oriundas de linfonodos acometidos, 67,63% apresentaram lesões compatíveis com granuloma tuberculoso.

Tabela 3. Número de lesões características de granuloma por linfonodo em bovinos abatidos em Vitória da Conquista-BA

Linfonodo	Número relativo de lesões (%)				
	4 lesões	3 lesões	2 lesões	1 lesão	Sem lesão
Pré-escapular	45,1 (23/51)	21,6 (11/51)	3,9 (2/51)	11,7 (6/51)	17,7 (9/51)
Parotídeo	-	-	-	50 (1/2)	50 (1/2)
Traquebrônquico	26,3 (5/19)	21,1 (4/19)	10,5 (2/19)	15,8 (3/19)	26,3 (5/19)
Hepático	33,3 (2/6)	16,7 (1/6)	16,7 (1/6)	16,7 (1/6)	16,6 (1/6)
Mediastínico	60 (3/5)	20 (1/5)	-	20 (1/5)	-
Isquiático	18,1 (2/11)	36,4 (4/11)	9,1 (1/11)	9,1 (1/11)	27,3 (3/11)
Peitoral	33,3 (1/3)	-	33,3 (1/3)	-	33,3 (1/3)
Ilíaco	-	-	-	-	100 (1/1)
Pré-crural	-	-	-	-	100 (1/1)
Total	36,4 (36/99)	21,2 (21/99)	7,1 (7/99)	13,1 (13/99)	22,2 (22/99)

Nas lesões encontradas no presente estudo foram observados múltiplos granulomas, caracterizados por uma área central com intensa necrose caseosa, fortemente corada pela eosina (deposição de material violáceo), em cujo centro, por vezes, havia material amorfo basofílico correspondente a calcificação distrófica com focos de mineralização, circundado por intenso infiltrado inflamatório composto por

neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células epitelioides. Também foram observadas células multinucleadas, com núcleos disposto periféricamente, resultantes da fusão de células epitelioides, denominadas células gigantes do tipo Langerhans (Figura 3).

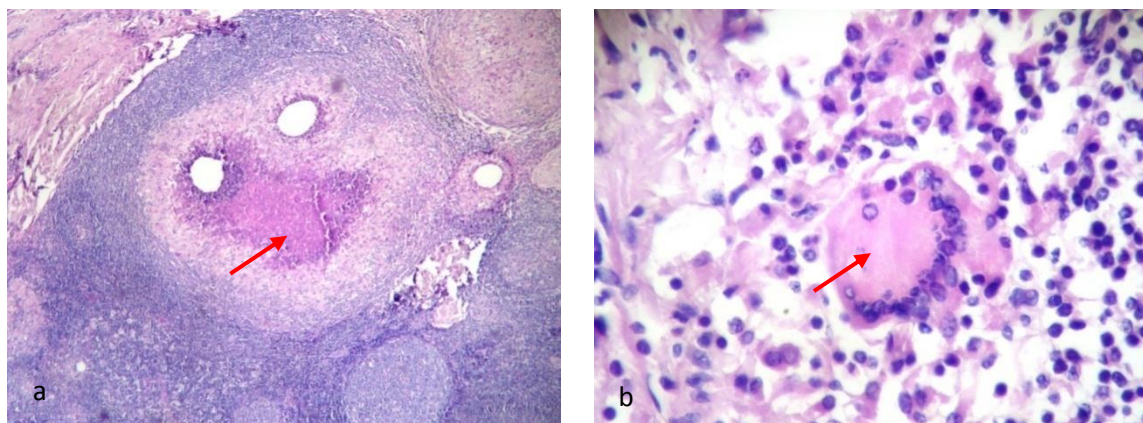


Figura 3. Fotomicrografias: a) Linfonodo classificado como sugestivo. Apresenta área central de necrose circundada por infiltrado inflamatório composto principalmente por macrófagos. Coloração HE, obj. 4x. b) Evidência de célula gigante tipo Langerhans. Coloração HE, obj. 40x

As presenças de necrose central com mineralização, células epitelioides, macrófagos e células gigantes de Langerhans, têm sido utilizada para caracterizar as lesões granulomatosas típicas de tuberculose (WANGO et al., 2005). Estudos sobre a eficiência do exame histopatológico demonstraram alta precisão e bons valores preditivos positivos e negativos na coloração por HE (VARELLO et al., 2008). O exame histopatológico apresenta elevada sensibilidade e especificidade, mostrando ser uma ferramenta confiável e de resultado rápido, podendo ser uma aliada no diagnóstico *post mortem* realizado em frigoríficos.

Ao exame histopatológico pela coloração por HE, os linfonodos da cabeça-pescoço foram os mais acometidos ($p < 0,05$), sendo 100% pré-escapulares. Daqueles localizados nas cavidades torácica e abdominal, 57,9% foram traquebrônquiais, 21,05% hepáticos e 21,05% mediastínicos. Na carcaça, 85,71% foram isquiáticos e 14,29%

peitorais (Tabela 4). Ao considerar as regiões anatômicas, verificou-se que a maioria dos linfonodos com lesões sugestivas foi oriunda da região da cabeça-pescoço. Em segundo plano ficaram os linfonodos das cavidades (torácica e abdominal) e, por último, os linfonodos da carcaça, sendo essa ordem de prevalência semelhante ao verificado no exame anatomopatológico (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de linfonodos, por região anatômica, com lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos em Vitória da Conquista-BA

Região anatômica	Anatomopatológico (%)	Histopatológico	
		HE (%)	ZN (%)
Cabeça e pescoço ¹	53,5 (53/99) ^A	56,7 (34/60) ^A	30,0 (3/10) ^A
Cavidade ²	30,3 (30/99) ^B	31,7 (19/60) ^B	50,0 (5/10) ^A
Carcaça ³	16,2 (16/99) ^C	11,7 (7/60) ^C	20,0 (2/10) ^A

¹Parotídeo e Pré-escapular; ² Brônquico, Mediastínico e Hepático; ³ Pré-crural, Isquiático, Ilíaco e Peitoral
Valores com letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste qui-quadrado (p<0,05)

A coincidência de resultados do exame histopatológico (HE) com os achados macroscópicos demonstra que os exames anatomopatológicos realizados na rotina de inspeção foram executados de maneira adequada para detecção da prevalência de lesões sugestivas de tuberculose. Por outro lado, a maior frequência de linfonodos com lesões sugestivas na região da cabeça-pescoço e cavidades também ao exame histopatológico sugere que a via respiratória é a principal via de contaminação por micobactérias, mostrando que o exame desses linfonodos é imprescindível na rotina de inspeção.

Em 22,2% das amostras não foram verificadas quaisquer alterações sugestivas de granuloma tuberculoso. Em três amostras, foi observada necrose eosinofílica multifocal; em outras três amostras, observou-se metástase de carcinoma; em duas amostras fibrose; em uma encontrou-se área central de necrose circundada por neutrófilos, com vacúolo central e reação inflamatória granulomatosa com macrófagos, plasmócitos e

fibroblastos; e em outra amostra infiltrado histiocítico na cortical. Do total de amostras examinadas, 12,1% não apresentaram alterações de nenhuma natureza.

Considerando que as lesões granulomatosas poderem ter causas diversas, tais como fungos, *Staphylococcus*, *Actinomyces*, e *Actinobacillus* spp. e até mesmo por corpos estranhos (BIFFA et al., 2010), tem sido proposta uma padronização na descrição de lesões tuberculosas em gânglios linfáticos de bovinos. A descrição deve fornecer o contexto espacial sobre as fases de desenvolvimento do granuloma, permitindo inferências quanto à cronicidade da lesão, e dessa forma, melhorar a compreensão da patogênese da tuberculose bovina e facilitar seu diagnóstico pelo exame histopatológico.

De acordo com Wangoo et al. (2005), o granuloma tuberculoso é caracterizado por acúmulo focal de células inflamatórias com predomínio de macrófagos, macrófagos epitelióides, células gigantes multinucleadas e linfócitos. No presente estudo, essas características foram observadas, sendo inclusive coincidentes com aquelas descritas em bovinos reagentes naturalmente infectados (MEDEIROS et al., 2012) e em bovinos inoculados experimentalmente por *M. bovis* (PALMER et al., 2007).

A coloração pelo método ZN revelou a presença de BAAR distribuídos difusamente ou no interior de macrófagos em 10,1% (10/99) das amostras (Figura 4). Das amostras com BAAR, 30% eram de linfonodos pré-escapulares, 20% mediastínicos, 20% traqueobrônquicos, 10% hepáticos e 20% de linfonodos isquiáticos. Essa baixa frequência de BAAR em relação ao número de lesões sugestivas ao exame histopatológico pode ser consequência: i) da baixa taxa de sobrevivência das micobactérias; ii) da perda de estrutura bacteriana em razão das respostas imunitárias (ANDRADE et al., 1991), ou iii) da baixa concentração de bacilos na lesão examinada

(PALMER et al., 2007). Esses aspectos, provavelmente, foram responsáveis pela expressiva variação de 2,73% (OHARA, 2006), 17,9% (VARELLO et al., 2008), 36,8% (LAISSE et al., 2011) até 50,0% (PINTO et al., 2002) no número de amostras positivas para ZN em diferentes estudos.

Por outro lado, apesar da baixa frequência de amostras positivas pela coloração ZN, normalmente verificada em estudos dessa natureza, a elevada especificidade deste método (VARELLO et al., 2008) é fundamental para a confirmação definitiva da presença de micobactérias.

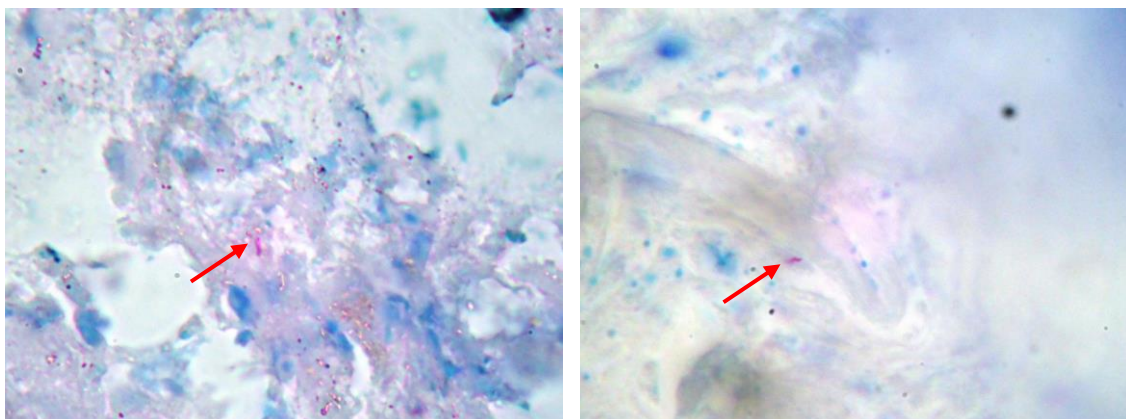


Figura 4. Fotomicrografias: Evidencia BAAR em coloração Ziehl-Nielsen

Conclui-se que a prevalência de carcaças bovinas com tuberculose no Sudoeste da Bahia é baixa e os procedimentos na rotina de inspeção *post mortem* são satisfatórios para detectar as lesões sugestivas dessa zoonose. Entretanto, a identificação dessas lesões em carcaças é um indicativo da realidade sanitária da doença nos rebanhos e remete a necessidade de intensificação das ações para o controle e erradicação da tuberculose bovina no Estado da Bahia.

REFERÊNCIAS

ÁVILA, L.N.; BAHIENSE, L.C.; PEREZ A.M.; GONÇALVES, V.S.P.; BAVIA, M.E.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F.; TELLES, E.; DIAS, R.; AMAKU, M. Prevalência e análise espacial da tuberculose bovina no estado da Bahia. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, p. 66, 2012, Supl. 2.

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P.V.; MÉNDEZ, M.D.C.; SCHILD, A.L. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, n.3/4, p. 81 - 86, 1991.

BAPTISTA, F.; MOREIRA, E.C.; SANTOS, W.L.M.; NAVEDA, L.A.B. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p.577 - 580, 2004.

BEHMER, O.P.; TALOSA, E.M.C.; FREITAS, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976.256 p.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 1997.

COSTA, J.N.; FERREIRA, M.M.; TEIXEIRA, L.L.; MENEZES, R.V.; RAMALHO, E.J. Tuberculose bovina: estudo preliminar da bacia leiteira de Alagoinhas-Ba. **Arquivo da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia**, v.18, p.141 - 148, 1995/1996.

CORNER, L.A.; MELVILLE, L.; McCUBBIN, K.; SMALL, K.J.; McCORMICK, B.S.; WOOD, P.R.; ROTHEL, J.S. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, n. 11, p. 389 - 392, 1990.

CRETELLA, R.V.; MARTINS, R.L.G.; PINHEIRO JUNIOR, O.A. Incidência e destino de carcaças de bovinos acometidos por tuberculose na região centro oeste paulista no período de julho à dezembro de 2004. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 6, 2006.

DELGADO, E.M.; ABRANTES, M.R.; SOUSA, I.K.F.; NEVES, K.A.L.; MOREIRA, T.R.; VINHOLTE, B.P.; CASTRO, A.N.; SILVA, J.B.A. Condenação de carcaças acometidas de lesões sugestivas de tuberculose em abatedouro na região oeste do Pará, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, 2011.

DEMELASH, B.; INANGOLET, F.; OLOYA, J.; ASSEGED, B.; BADASO, M.; YILKAL, A.; SKJERVE, E. Prevalence of Bovine tuberculosis in Ethiopian slaughter cattle based on post-mortem examination. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 755 - 765, 2009.

DEMELASH, B.; ASSEGED, B.; SKJERVE, E. Diagnostic efficiency of abattoir meat inspection service in Ethiopia to detect carcasses infected with *Mycobacterium bovis*: Implications for public health. **BMC Public Health**, v. 10, p.462, 2010.

DIGUIMBAYE-DJAIBÉ, C.; HILTY, M.; NGANDOLO, R.; MAHAMAT, H.H.; PFYFFER, G.E.; BAGGI, F.; HEWINSON, G.; TANNER, M.; ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E. *Mycobacterium bovis* Isolates from Tuberculous Lesions in Chadian Zebu Carcasses. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.5, 2006.

FERNANDES, J.O. M.; NETO, R.S.; SILVA, H.L.; SILVA, C.S.P.; SOUTELLO, R.V.G.; BORGES, J.H.R.; FARIA, R.F.; COELHO, R.V.; TANAKA, D.; SOUSA, C.H.F.; DIAS, A.E. Prevalência da tuberculose bovina determinada através de exames realizados em carcaças de bovinos abatidos no município de Andradina-SP. **Ciências Agrárias**, v. 3, n.2, p. 07 - 12, 2003.

FREITAS, J.A.; PANETTAB, J.C.; CURCIO, M.; UEKIC, S.Y.M. Isolamento de cepas de *Mycobacterium avium* em búfalos abatidos para consumo. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 315 - 317, 2001.

FURLANETTO, L.V.; FIGUEIREDO, E.E.S.; CONTE JÚNIOR, C.A.; SILVA, F.G.S.; DUARTE, R.S.; SILVA, J.T.; LILENBAUM, W.; PASCHOALIN, V.M.F. Prevalência de tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 274 - 280, 2012.

FURLANETTO, L.V.; FIGUEIREDO, E.E.S.; CONTE JÚNIOR, C.A.; CARVALHO, R.C.T.; SILVA, F.G.S.; SILVA, J.T.; LILENBAUM, W.; PASCHOALIN, V.M.F. Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1138 - 1144, 2012.

FUKUDA, R.T.; PRATA, L.F.; VERARDINO, H.; ALMEIDA, L.A.M. Evolução da cisticercose bovina em animais abatidos no Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.17, n.108, p.21 - 23, 2003.

LAISSE, C.J.M.; GAVIER-WIDÉN, D.; RAMIS, G.; BILA, C.G.; MACHADO, A.; QUEREDA, J.J.; ÅGREN, E.O.; HELDEN P.D. Characterization of tuberculous lesions in naturally infected African buffalo (*Syncerus caffer*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 5, p. 1022 - 1027, 2011.

MEDEIROS, L.S.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E.E.S.; LEITE, J.; FERREIRA, A.M.R.; LILENBAUM, W. Assessing the histopathology to depict the different stages of bovine tuberculosis infection in a naturally infected herd. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2. p. 135 - 139, 2012.

NDUKUM, J.A.; KUDI, A.C.; BRADLEY, G.; ANE-ANYANGWE, I.N.; FONTEBUG, S.; TCHOUMBOUE, J. Prevalence of bovine tuberculosis in abattoirs of the littoral and western highland regions of Cameroon: a cause for public health concern. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, 2010.

OHARA, P.M. Microbiologia e histopatologia de linfonodos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo, São Paulo, 106 p. 2006.

PALMER, M.V.; WATERS, W.R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 181 - 190, 2006.

PALMER, M.V.; WATERS, W.R.; THACKER, T.C.; Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 863 - 874, 2007.

PINTO, P.S.A. Atualização em controle da tuberculose no contexto da inspeção de carnes. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p.115 - 121, 2003.

PINTO, P.S.A.; FARIA, J.E.; VILORIA, M.I.V.; BEVILACQUA P.D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 3, n. 1, p. 10 - 15, 2002.

RIBEIRO, A.R.P.; LOBATO, F.C.F.; ABREU, V.L.V.; FARIA, E.S.; SILVA, J.A. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, 2003.

TEKLU, A.; ASSEGED, B.; YIMER, E.; GEBEYEHU, M.; WOLDESENBET, Z. Tuberculous lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. **Revue Scientifique et Technique Office international des Epizooties**, v.23, n.3, p.957 - 964, 2004.

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.164 - 169, 2008.

WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gd (WC1⁺) T cells and CD 68⁺ cells. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 223 - 234, 2005.

WATRELOT-VIRIEUX, D.; DREVON-GAILLOT, E.; TOUSSAINT, Y.; BELLI, P. Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in french cattle. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.53, p.321 - 325, 2006.