

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM BOVINOS LEITEIROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LEONARDO LUIZ DAMETTO

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM BOVINOS LEITEIROS

Leonardo Luiz Dametto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**.

Orientador: Prof. Dr. Elci Lotar Dickel

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM BOVINOS LEITEIROS

Elaborada por
Leonardo Luiz Dametto

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Elci Lotar Dickel, Prof., Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**

Luciana Ruschel dos Santos, Profa., Dra., UPF

Fernando Pilotto, Prof., Dr. UPF

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, e sem ele não somos nada.

Agradeço a minha mãe Sandra pela dedicação, por tudo que fez e faz por mim e meus irmãos. Ao meu Pai Gilberto “in memorian”, onde você estiver sei que está torcendo por mim, aos meus irmãos Fernanda e João Henrique, muito obrigado.

Agradeço, especialmente, a minha esposa Cristina Pedruzzi e minhas filhas Valentina Pedruzzi Dametto e Sophia Pedruzzi Dametto, pelo amor, carinho e pela compreensão na minha ausência, em vários momentos, vocês são o meu alicerce.

Ao Professor Doutor Elci Lotar Dickel, meu muito obrigado por aceitar ser meu orientador, você é um espelho de profissional e pessoa a ser seguido, tenho orgulho de ser seu orientado.

A minha amiga, Mestre Aline dos Santos Peixoto, pelo auxílio e ensinamentos, e também pelas palavras de “não desista” nos momentos mais difíceis, a você um muito obrigado especial.

Aos colegas da LMS Veterinária, Sergio, Miguel, Vinícios e Simone, a ajuda de vocês foi imprescindível.

Ao colega médico veterinário e de mestrado, Ezequiel Davi dos Santos, você é um amigo, colega e grande pessoa que me auxiliou e organizou os dados produzidos neste trabalho, a minha admiração por você.

Aos Professores Doutores, Rogério Carvalho Souza e Rafahel Carvalho de Souza, vocês são os principais causadores desta dissertação, não poderia deixar de agradecer pelas palavras de apoio e estímulo, quando crescer gostaria de ser igual a vocês.

Aos amigos, Ismael Scariott e Reinaldo Alves, vocês também fazem parte desta construção, com palavras otimistas e de siga em frente, a vocês muito obrigado. Oss.

Aos amigos da Tropolha Serrana, obrigado pela compreensão dos finais de semana não ir aos rodeios, estudar é importante e vocês sempre me apoiaram nesta caminhada.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-graduação em Bioexperimentação da UPF, muito obrigado pelas palavras de incentivo e apoio durante esta jornada.

A EMBRAPA Gado de corte, na pessoa do Doutor Flávio Ribeiro de Araújo, pela ajuda na parte de biologia molecular e cultivo das amostras, além das orientações e informações sobre a tuberculose bovina.

A Doutora Elaine Cristina Fernandes Baez Sarti, Professora da UFMS, meu muito obrigado pela dedicação no processamento das amostras e as orientações para que esta dissertação pudesse acontecer.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família, Cristina, Valentina e Sophia, vocês mudaram e moldaram a minha vida, sempre acreditaram no meu trabalho e deram apoio, principalmente quando saia de casa com um beijo e abraço com uma boa sorte, até a noite pai.

Deus colocou as pessoas certas na minha vida, Beijos o papai ama vocês.

EPIGRAFE

“Faça o seu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores,
para fazer melhor ainda!”

Mário Sergio Cortella

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. ETIOLOGIA.....	14
2.2. TRANSMISSÃO	15
2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	16
2.4. DIAGNÓSTICO	17
2.4.1. Diagnóstico alérgico-cutâneo ou teste tuberculínico.....	17
2.4.2. Inspeção ao abate.....	19
2.4.3. Histopatológico de lesões suspeitas.....	20
2.4.4. Cultivo para micobactérias.....	21
2.4.5. PCR para micobactérias.....	22
2.5. PROFILAXIA.....	23
3. CAPITULO 1.....	24
Tuberculose bovina: diagnóstico em bovinos leiteiros através de quatro ferramentas de análise.....	24
4. CONCLUSÕES	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
6. REFERÊNCIAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conjunto de bactérias da espécie <i>Mycobacterium tuberculosis</i> visualizadas em microscopia eletrônica de varredura.....	14
Figura 2 - Ciclo de transmissão da tuberculose zoonótica.....	15
Figura 3 - Manifestações clínicas da tuberculose em humanos. A) Comprometimento pulmonar e emaciação em um paciente tuberculoso. B) Paciente com tuberculose extrapulmonar.....	16
Figura 4 - Manifestações clínicas da tuberculose em bovinos. A) Comprometimento respiratório e emaciação em um bovino tuberculoso. B) Linfonodo bovino com lesões granulomatosas e calcificadas, características de tuberculose	17
Figura 5 - subcutânea do derivado proteico purificado (PPD) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . B) Resposta imune celular aos antígenos de <i>M. tuberculosis</i> e mensuração da extensão da reação inflamatória. C) Teste tuberculínico simples para <i>M. bovis</i> em região cervical de um bovino. D) Teste tuberculínico comparado para <i>M. bovis</i> e <i>M. avium</i> em região cervical de um bovino. E) Teste tuberculínico para <i>M. bovis</i> em prega caudal de um bovino.....	18
Figura 6 - Lesões típicas de tuberculose em carcaça e órgãos de bovinos positivos no teste cervical comparativo. A) Carcaça com aspecto de tuberculose generalizada, apresentando lesões nodulares por toda sua extensão. B) Linfonodo mediastínico com processo aumento de volume e processo inflamatório granulomatoso contendo exsudato de aspecto caseoso a purulento em seu interior. C) Pulmão apresentando lesão nodular com cerca de 3,0 cm de diâmetro, de cor amarelada, envolvido por cápsula fibrosa e contendo exsudato com aspecto caseoso em seu interior. D) Fígado com nódulos superficiais, de 1 a 3 cm de diâmetro.....	19
Figura 7 - Caracterização de lesões causadas por <i>Mycobacterium spp.</i> em bovinos. (A) Linfonodo apresentando inflamação granulomatosa acentuada com macrófagos epitelioides, abundantes células gigantes multinucleadas e focos de necrose caseosa contendo mineralização multifocal. HE, obj.10x. B) Bacilos álcool-ácido resistentes (seta) no citoplasma de célula gigante em lesão de linfonodo bovino com tuberculose. Coloração de Ziehl-Neelsen, obj.40x.....	20
Figura 8 - Cultivo bacteriológico. A) Placa de Petri contendo colônias de <i>Mycobacterium spp.</i> em meio de crescimento Lowenstein-Jensen. B) A) Placa de Petri com colônias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio de crescimento Lowenstein-Jensen	21
Figura 9 - Identificação de isolados bacterianos por meio de PCR. O DNA foi extraído de dezessete isolados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) oriundos de lesões sugestivas de tuberculose, e foi realizada a amplificação das sequências RvD1Rv2031c e IS6110. Na coluna M encontra-se uma escada de DNA com 100 pb cada, as colunas 1-17 representam os isolados BAAR sugestivos de tuberculose e, a coluna 18 representa o controle negativo. As setas indicam o fragmento de 500 pb que confirma o diagnóstico para <i>M. bovis</i> e o fragmento de 245 pb que indica que o isolado é membro do Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR	Bacilos Álcool-ácido Resistentes
CMBT	Complexo <i>Mycobacterium tubertulosis</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
MNTB	Micobactérias Não Tuberculosas
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PPD	Purified Protein Derivative
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose
TTCC	Teste Tuberculínico Cervical Comparativo
WHO	World Health Organization
µg	Microgramas
mL	Militros
µm	Micrometros
cm	Centímetros
°C	Graus Célsius

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM BOVINOS LEITEIROS

Autor: Leonardo Luiz Dametto

Orientador: Elci Lotar Dickel

Passo Fundo, 18 de Setembro de 2018.

A tuberculose é uma antropozoonose crônica de ocorrência mundial, cujo agente etiológico pertence ao gênero *Mycobacterium*. Nos animais, a enfermidade gera grandes prejuízos econômicos à cadeia produtiva da carne e do leite. A infecção humana se dá, principalmente, através do contato direto com animais contaminados e pela ingestão de leite cru e derivados fabricados com leite cru, tal como os queijos. No Brasil, existe o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose e, também, o Serviço de Inspeção Sanitária e a Vigilância Sanitária, os quais estabelecem medidas e critérios que visam resguardar a saúde animal e pública. Entretanto, o maior desafio para o controle da tuberculose humana está na sensibilização da população quanto aos riscos de infecção ao adquirirem carne ou leite cru e seus derivados, como os queijos, diretamente de produtores, feiras e/ou locais ao ar livre, sem controle higiênico-sanitário e de inspeção. O presente trabalho descreve a utilização de quatro ferramentas para o diagnóstico de micobactérias, compreendendo o teste tuberculínico cervical comparativo, os achados macroscópicos durante o abate sanitário, histopatologia dos tecidos lesados seguido de histoquímica. O estudo avaliou um total de 211 bovinos leiteiros, onde 74 (35%) apresentaram reatividade no teste tuberculínico cervical comparativo, considerando os resultados positivos e inconclusivos. Do total de animais, 143 (67,8%) foram encaminhados para abate sanitário devido a questões legais e de controle nos focos da doença. No acompanhamento do abate e inspeção sanitária de vísceras e carcaças foi verificado que 74 (51,8%) apresentavam lesões macroscópicas compatíveis com tuberculose bovina, enquanto 69 (48,2%) não apresentavam alterações visíveis. Durante a inspeção foram coletadas amostras teciduais de cinco bovinos tuberculina-positivos e com lesões macroscópicas, e de cinco tuberculina-positivos sem lesões. Na análise histopatológica todos apresentaram numerosas áreas de necrose caseosa e reação inflamatória crônica com ou sem calcificação central e, na coloração especial de Ziehl-Neelsen foram evidenciados numerosos bacilos álcool-ácido resistentes em todos os casos examinados. Assim, diante dos resultados obtidos, as quatro ferramentas de análise empregadas no presente estudo se mostraram muito úteis para o diagnóstico definitivo de tuberculose bovina. Os achados no rebanho leiteiro estudado também demonstrou que a doença está circulando entre essa categoria de animais, representando uma séria ameaça aos demais bovinos, aos seres humanos que entram em contato direto com esses bovinos e/ou que consomem ou manuseiam produtos de origem animal infectados.

Palavras-chave: tuberculose, zoonose, bovinos leiteiros, teste tuberculínico, histopatologia, histoquímica, zoonose.

ABSTRACT

**Master's dissertation
Post-Graduation Program in Bioexperimentation
University of Passo Fundo**

DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS IN DAIRY CATTLE

Author: Leonardo Luiz Dametto

Advisor: Elci Lotar Dickel

Passo Fundo, 18 de Setembro de 2018.

Tuberculosis is a chronic anthroponosis of worldwide occurrence, whose etiological agent belongs to the genus *Mycobacterium*. In animals, the disease generates great economic damages to the productive chain of meat and milk. The human infection occurs mainly through direct contact with contaminated animals and by the ingestion of raw milk and derivatives made from raw milk, such as cheeses. In Brazil, there is the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis, as well as the Sanitary Inspection Service and Sanitary Surveillance, which establish measures and criteria to protect animal and public health. However, the greatest challenge for the control of human tuberculosis is in the population's awareness of the risks of infection when purchasing meat or raw milk and its derivatives, such as cheeses, directly from producers, fairs and / or outdoors, without control hygienic-sanitary and inspection. The present work describes the use of four tools for the diagnosis of mycobacteria, including the comparative cervical tuberculin test, macroscopic findings during sanitary slaughter, histopathology of injured tissues followed by histochemistry. The study evaluated a total of 211 dairy cattle, where 74 (35%) showed reactivity in the comparative cervical tuberculin test, considering the positive and inconclusive results. Of the total number of animals, 143 (67,8%) were referred for sanitary slaughter due to legal and control issues in the foci of the disease. In the follow up of slaughtering and inspection of viscera and carcasses, 74 (51,8%) had macroscopic lesions compatible with bovine tuberculosis, while 69 (48,2%) showed no visible changes. During the inspection tissue samples were collected from five tuberculin-positive bovines with macroscopic lesions and five tuberculin-positive without lesions. In the histopathological analysis, all of them presented numerous areas of caseous necrosis and chronic inflammatory reaction with or without central calcification and in the special staining of Ziehl-Neelsen, numerous alcohol-acid resistant bacilli were evidenced in all the cases examined. Thus, given the results obtained, the four analysis tools used in the present study proved to be very useful for the definitive diagnosis of bovine tuberculosis. The findings in the dairy herd also showed that the disease is circulating among this category of animals, posing a serious threat to the other cattle, to humans that come in direct contact with these cattle and / or who consume or handle infected animal products.

Key words: tuberculosis, zoonosis, dairy cattle, tuberculin test, histopathology, histochemistry, zoonosis.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira exerce um papel significativo na economia nacional e, sobretudo na economia regional de Estados onde predominam as atividades agropecuárias. De acordo com o IBGE (1), o Brasil possui o segundo maior efetivo total de bovinos, sendo cerca de 218 milhões de animais. Além disso, detém o terceiro maior rebanho de vacas leiteiras do mundo sendo quase 20 milhões de vacas ordenhadas/ano, e ocupa a quinta posição no ranking dos maiores produtores mundiais de leite.

O IBGE (1) também destaca que quando comparada a produção nacional com a quantidade de leite cru adquirido pelos laticínios sob serviço de inspeção sanitária, os dados demonstram que apenas 23,17 bilhões de litros de leite (69%) são inspecionados antes de chegarem ao consumidor. Assim, 10,45 bilhões de litros de leite (31%) produzido no Brasil chega clandestinamente ao consumidor na forma de leite e/ou derivados, o que constitui um sério risco à saúde pública. A baixa sanidade dos rebanhos também tem repercussão na indústria da carne, onde numerosas doenças infectocontagiosas, e muitas de caráter zoonótico, são responsáveis pela depreciação de muitas carcaças bovinas (2). Dentre as enfermidades de importância destaca-se a tuberculose bovina, a qual é caracterizada como uma enfermidade infectocontagiosa e zoonótica de grande impacto para a saúde animal e saúde pública, ocasionando perdas não só na produtividade do plantel como nos rendimentos da atividade envolvida (3).

A tuberculose bovina é uma doença bacteriana causada pelo *Mycobacterium bovis*, que afeta bovinos e bubalinos. Ela é uma zoonose de distribuição universal, a qual acomete o homem através da ingestão de leite cru e seus derivados, consumo de carne contaminada ou também por contato com animais enfermos. A tuberculose é disseminada entre bovinos principalmente por via respiratória, caracteriza-se pelo desenvolvimento progressivo de lesões granulomas nodulares, que podem se localizar em qualquer órgão ou tecido (4). Devido a sua resistência a fatores ambientais, pode permanecer viável nas fezes por 13 dias, em esterco dessecado em estábulos por 100 dias, entretanto se colocadas ao alcance da luz solar, tornam-se inviáveis após 5 horas. No leite podem permanecer sobre refrigeração por 15 dias viáveis, e inviáveis somente através de tratamento térmico ou pasteurização (5).

A enfermidade apresenta uma grande diversidade de sinais clínicos aparentes tanto em bovinos quanto em seres humanos. As manifestações dependem do local das lesões causadas pelo *Mycobacterium bovis*. Em bovinos a doença é imperceptível, na maioria dos casos, sua

presença é detectada somente através de testes ou durante o abate e inspeção. A lesão, na sua maioria em bovinos, encontra-se nos pulmões, linfonodos pulmonares e linfonodos craniais. Em casos avançados a manifestação de dispnéia, devido às lesões extensas pulmonares pode ser evidenciada (6). Entretanto se a infecção tiver origem através da mucosa oral podem ser observadas lesões no trato gastrointestinal. Em humanos imunocomprometidos, causa principalmente linfadenite e lesões cutâneas e subcutâneas, chamadas extrapulmonares (7).

Em 2016 a WHO estimou que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo causador da tuberculose e que ocorreram 10,4 milhões de casos novos só em 2015, além de 1,8 milhão de óbitos. Devido a esses altos números de pessoas infectadas, a doença configura-se como uma emergência global (8). Com o objetivo de alertar a população sobre o risco de infecção, numerosos estudos têm sido realizados para elucidar as formas de infecção. Um dos estudos verificou que o leite cru é responsável pela veiculação de 07 doenças viróticas e de 16 doenças bacterinas, dentre elas a tuberculose (9).

No Brasil, existe o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose e, também, o Serviço de Inspeção Sanitária e a Vigilância Sanitária, os quais estabelecem medidas e critérios que visam resguardar a saúde animal e pública. Entretanto, sabe-se que ainda há muitos bovinos portadores da tuberculose, cuja carne ou leite oferecem risco de infecção aos consumidores, sendo de fundamental importância a realização de diagnóstico nos rebanhos e a monitoração dos produtos de origem animal. Assim, o presente trabalho descreve e discute a utilização de quatro ferramentas empregadas para o diagnóstico de micobactérias em bovinos leiteiros de três municípios do Norte do Rio Grande do Sul, compreendendo o teste tuberculínico cervical comparativo, os achados macroscópicos durante o abate sanitário, a histopatologia dos tecidos lesados e a histoquímica.

A presente dissertação compreende a introdução acima apresentada, uma breve revisão da literatura sobre *Mycobacterium* spp. como causa de tuberculose e, seus riscos para a saúde pública e, um capítulo na forma de artigo científico. O Capítulo 1 intitulado “**Tuberculose bovina: Diagnóstico em bovinos leiteiros através de quatro ferramentas de análise**” descreve e discute os achados em cada uma das ferramentas diagnósticas utilizadas no estudo. O artigo será submetido para publicação no periódico Pesquisa Veterinária Brasileira. As considerações finais, conclusões e referências bibliográficas compõem a última parte desta dissertação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ETIOLOGIA

As micobactérias pertencem à família Mycobacteriaceae e ao gênero *Mycobacterium* (10). São microrganismos de forma bacilar com dimensões entre 0,2 μ m a 0,6 μ m de largura e 1 μ m a 10 μ m de comprimento (Figura 1). Os bacilos são delgados, retos ou ligeiramente curvos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e incapazes de formar esporos, conídeos ou cápsulas (11). A sua multiplicação é lenta, ocorrendo a cada 18-20 horas, porém apresenta variação dentro do gênero, o que permite dividi-las em micobactérias de crescimento rápido (menos de sete dias) e em micobactérias de crescimento lento (mais de sete dias) (12, 13).

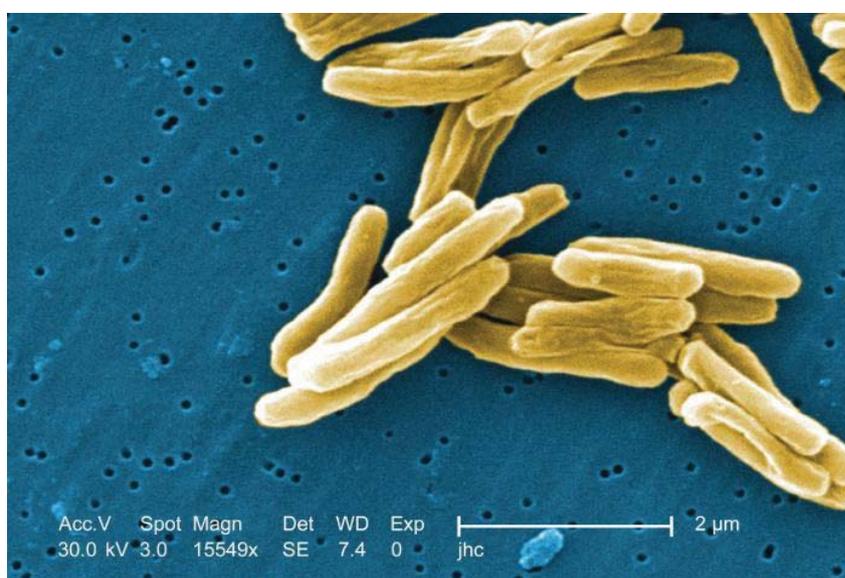


FIGURA 1. Conjunto de bactérias da espécie *Mycobacterium tuberculosis* visualizadas em microscopia eletrônica de varredura (14).

As micobactérias são classificadas como Gram-positivas, entretanto o método de Gram não imprime uma boa coloração ao gênero *Mycobacterium*. Para a sua caracterização tintorial é utilizada a coloração de Ziehl-Neelsen, a qual utiliza fucsina como corante. Nessa coloração, após o emprego da fucsina, é realizada a descoloração com solução álcool-ácida (ácido clorídrico), onde as micobactérias permanecem coradas em cor vermelha, recebendo a designação de Bacilos-Álcool-Ácido-Resistentes “BAAR” (15, 16). Até pouco tempo, a coloração era um ponto chave na identificação de micobactérias. Entretanto, com o uso de modernas técnicas bioquímicas e moleculares no seu diagnóstico e identificação, o número de micobactérias descritas tem aumentado constantemente. Até o momento existem 196 espécies e 13 subespécies descritas no gênero *Mycobacterium* (17).

De acordo com sua patogenicidade em seres humanos, as micobactérias são classificadas em três grupos: patogênicas, potencialmente patogênicas (oportunistas) e raramente patogênicas ou saprófitas (11). As patogênicas incluem a espécie *M. leprae* e as que compõem o Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, compreendendo as espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. Canetti* (11). Entre as micobactérias causadoras da tuberculose, o *Mycobacterium bovis* é a espécie de maior importância, visto que é o agente capaz de infectar um grande espectro de hospedeiros diferentes, incluindo animais e humanos (18, 19). Além disso, constitui um patógeno de alta relevância e repercussão econômica em animais de produção, principalmente bovinos, pois a infecção reduz a produção de leite e carne e também compromete a reprodução (20).

2.2. TRANSMISSÃO

O *Mycobacterium bovis*, agente da tuberculose bovina e que possui caráter zoonótico, pode ser transmitido ao homem pelo consumo de leite cru e seus derivados, contato direto com animais infectados ou água contaminada (Figura 2). A legislação brasileira permite a fabricação de queijo com leite cru, sendo que os rebanhos devem gozar de bom status sanitário, serem testados para brucelose e tuberculose e, que o período mínimo de maturação exigido para esses produtos (60 dias) seja respeitado (21, 22). Se não respeitado, esse tempo de maturação pode ter influência nas transformações bioquímicas que deveriam ocorrer nos queijos, as quais não são suficientes para inviabilizarem a sobrevivência do *M. bovis* e, em decorrência disso o consumo desse produto poderá conferir risco de infecção (23, 24).

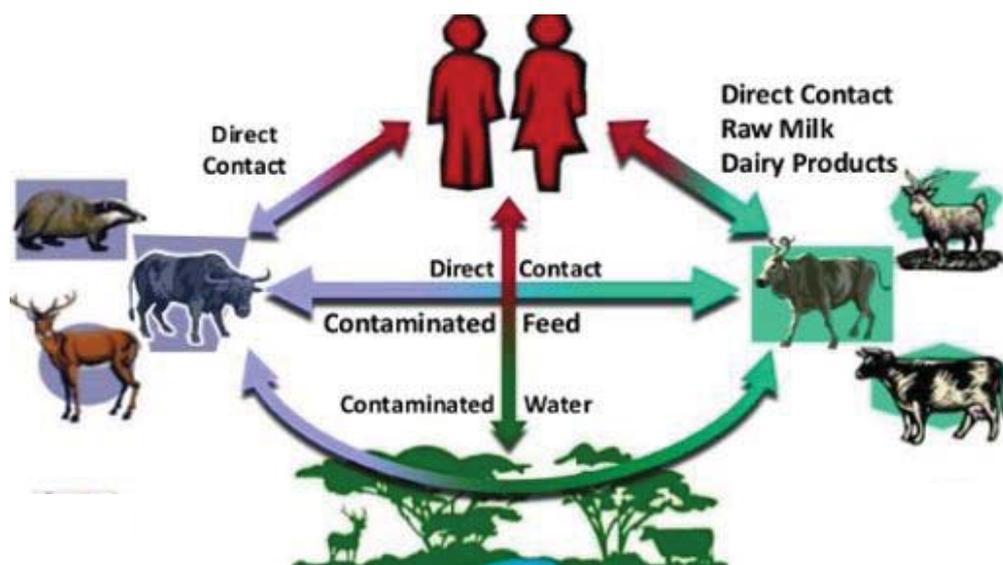


FIGURA 2. Ciclo de transmissão da tuberculose zoonótica (25).

Além da excreção de *Mycobacterium* pela glândula mamária da vaca e necessidade de ingestão desse leite pelos animais ou humanos, existem outras maneiras de ocorrer a transmissão do agente, tal como o contato direto entre e/ou com os animais e suas secreções, a inalação de aerossóis e a ingestão de água contaminada (26, 27). Também é possível a contaminação exógena do leite através de excretas de bovinos (fezes, urina, secreções vaginais e uterinas) infectados e que estão eliminando a bactéria (4, 28, 29), pela contaminação pós-ordenha, durante o processo de envazamento do produto (30) e pelo contato com bacilos provenientes de equipamentos de ordenha sujos ou mal lavados (9).

2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas em humanos infectados com *M. bovis* ou pelo *M. tuberculosis* são muito semelhantes (31). A sintomatologia clínica, as lesões patológicas e o tratamento da doença não divergem em nenhum quesito, o que é, inclusive, considerado um empecilho na caracterização específica do agente causador da tuberculose (19, 32). Quando a tuberculose acomete o sistema respiratório, sobretudo o pulmão, os sintomas cursam com tosse na forma seca ou produtiva, febre vespertina, sudorese noturna, emagrecimento e cansaço/fadiga (Figura 3 A). Entretanto, tem-se observado um aumento na incidência da localização extrapulmonar de micobactérias (Figura 3 B), tanto em países desenvolvidos como nos não desenvolvidos (33).



FIGURA 3. Manifestações clínicas da tuberculose em humanos. A) Comprometimento pulmonar e emaciação em um paciente tuberculoso. B) Paciente com tuberculose extrapulmonar (34, 35).

Nos bovinos, é sabido que a infecção primária da tuberculose dá-se pelos tratos respiratório e intestinal, íleo, jejuno e linfonodos drenantes (36). É uma doença significativamente mais prevalente e com maior severidade de lesões nos bovinos de raças leiteiras do que em zebuínos ou mestiços, mesmo sob condições idênticas de criação encontradas. Os sinais clínicos mais frequentes são a caquexia progressiva, a queda na produção de leite e as falhas reprodutivas (Figura 4 A). Animais tuberculosos, quando submetidos à marcha forçada, tendem a posicionar-se atrás dos demais, demonstrando cansaço e baixa capacidade respiratória. Também pode ocorrer linfadenomegalia localizada ou generalizada (36). As lesões nos nódulos linfáticos são encontradas durante o exame *post mortem* desses animais (Figura 4 B), quando eles são abatidos em estabelecimentos com serviço de inspeção (4).

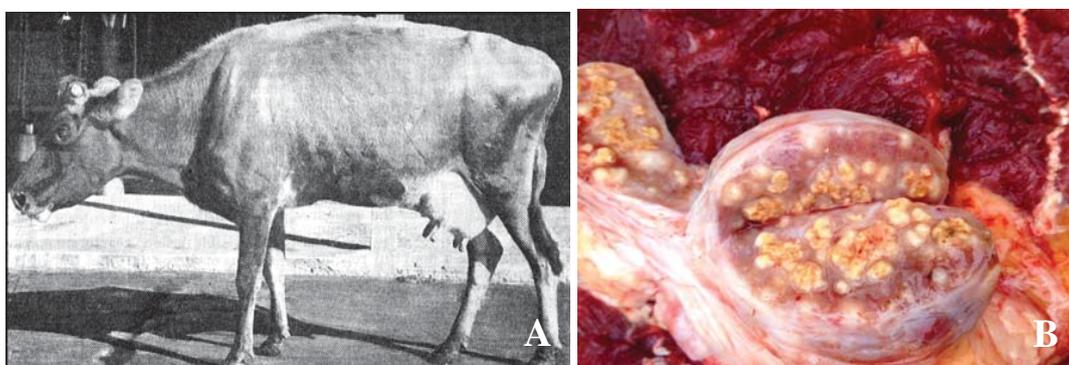


FIGURA 4. Manifestações clínicas da tuberculose em bovinos. A) Comprometimento respiratório e emaciação em um bovino tuberculoso. B) Linfonodo bovino com lesões granulomatosas e calcificadas, características de tuberculose (37, 38).

2.4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da infecção é de extrema importância para o controle da doença em rebanhos e também para o efetivo tratamento nos pacientes humanos. Além disso, o diagnóstico ou monitoração para micobactérias diretamente em produtos de origem animal também se mostra de extrema relevância, no sentido de dar maior garantia ao consumidor.

2.4.1. Diagnóstico alérgico-cutâneo ou teste tuberculínico

Na medicina, essa prova conhecida como teste tuberculínico ou de Mantoux, que consiste na inoculação intradérmica da tuberculina em uma pessoa (Figura 5 A-B), a fim de conhecer se ela está ou não infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (39). Na medicina veterinária, é o método diagnóstico oficial utilizado pelo PNCEBT para encontrar bovinos

tuberculose positivos (Figura 5 C-D-E). O teste pode revelar infecções incipientes a partir de 3 a 8 semanas da exposição ao *Mycobacterium*, tem boa sensibilidade e especificidade, além de ser considerado pela OIE como técnica de referência (4).



FIGURA 5. Diagnóstico alérgico-cutâneo ou teste tuberculínico em humanos e bovinos. A) Aplicação subcutânea do derivado proteico purificado (PPD) de *Mycobacterium tuberculosis*. B) Resposta imune celular aos antígenos de *M. tuberculosis* e mensuração da extensão da reação inflamatória. C) Teste tuberculínico simples para *M. bovis* em região cervical de um bovino. D) Teste tuberculínico comparado para *M. bovis* e *M. avium* em região cervical de um bovino. E) Teste tuberculínico para *M. bovis* em prega caudal de um bovino (40, 41).

No Brasil o teste pode ser realizado de três formas: teste na prega caudal (TPC), teste cervical simples (TCS) e teste cervical comparativo (TCC). Para estabelecimentos de criação de bovinos de corte o teste indicado é o da prega caudal de execução simples e prático, bovinos leiteiros podem ser utilizados o teste cervical simples, que consiste na aplicação de único antígeno na paleta do animal, ou o teste cervical comparativo, consiste na aplicação de dois antígenos, este segundo teste é utilizado para eliminar falso-positivos, este teste deve ser aplicado em rebanhos com alta frequência de reações inespecíficas (42).

Animais reagentes positivos ao teste diagnóstico para brucelose ou tuberculose serão marcados pelo médico veterinário responsável pelo exame com ferro candente ou nitrogênio líquido. A marcação ocorre no lado direito da face com um "P" contido num círculo de oito centímetros de diâmetro. Os animais reagentes positivos deverão ser isolados do rebanho, afastados da produção leiteira e encaminhados para abate sanitário no prazo máximo de trinta dias após o diagnóstico. O abate deve ser realizado em estabelecimento sob serviço de inspeção oficial (42).

2.4.2. Inspeção ao abate

A inspeção sanitária no *post mortem* de bovinos é de extrema importância, pois além de lesões suspeitas de tuberculose também poderão ser observadas alterações de muitas outras enfermidades. Tal exame permite que seja dado o destino mais oportuno à carcaça e vísceras do animal suspeito, minimizando o risco de que carne chegue *in natura* ao consumidor (43).

O conhecimento dos locais a serem examinados é de fundamental importância para uma boa inspeção. Nos bovinos, as lesões de tuberculose podem ser sugeridas com a detecção de lesões granulomatosas e/ou calcificadas nos linfonodos da cavidade torácica, seguido pelos linfonodos da cabeça e pelo parênquima pulmonar e hepático (43, 44), Figura 6. O exame de sete pares de linfonodos (mediastinais, bronquiais, retrofaríngeos, parotídeos, mandibulares, mesentéricos e hepáticos) mais o pulmão e o fígado são suficientes para detectar aproximadamente 95% dos animais com lesões macroscópicas de tuberculose (44).

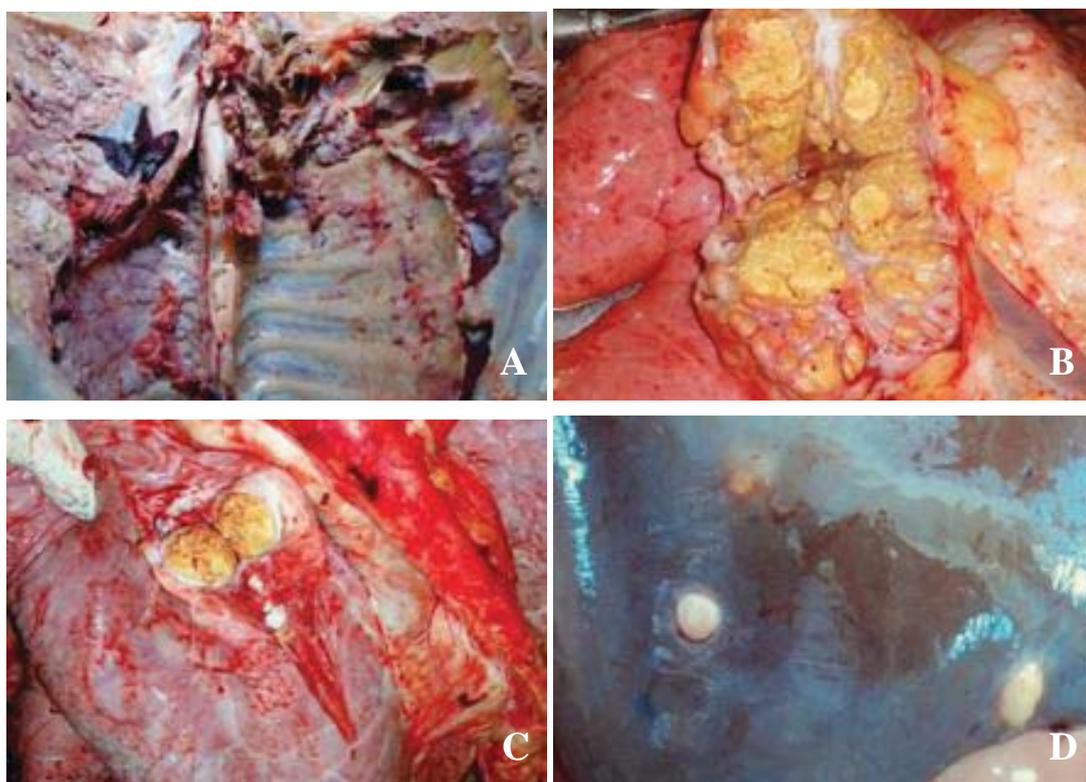


FIGURA 6. Lesões típicas de tuberculose em carcaça e órgãos de bovinos positivos no teste cervical comparativo. A) Carcaça com aspecto de tuberculose generalizada, apresentando lesões nodulares por toda sua extensão. B) Linfonodo mediastínico com processo aumento de volume e processo inflamatório granulomatoso contendo exsudato de aspecto caseoso a purulento em seu interior. C) Pulmão apresentando lesão nodular com cerca de 3,0 cm de diâmetro, de cor amarelada, envolvido por cápsula fibrosa e contendo exsudato com aspecto caseoso em seu interior. D) Fígado com nódulos superficiais, de 1 a 3 cm de diâmetro (45).

A inspeção visual associada à palpação e recorte seriado dos linfonodos favorece a detecção das lesões macroscópicas (43). Os cortes seriados dos linfonodos são importantes para detectar pequenas lesões localizadas internamente no parênquima que não são visíveis externamente (44). Na cabeça, deve-se examinar trato respiratório superior (cavidade nasal, nasofaringe, traquéia), tonsilas, linfonodos parotídeos, mandibulares e retrofaríngeos. No tórax, pulmões, pleura, linfonodos bronquiais e mediastinais. No abdômen, fígado, baço, rins, peritônio, útero, linfonodos hepático e mesentéricos. E na carcaça, linfonodos sub-ilíacos, inguinais, sacrais, glândula mamária, testículo e epidídimo. Nos casos suspeitos de tuberculose é preconizado um exame sistemático de todas as vísceras (44, 46).

2.4.3. Histopatológico de lesões suspeitas

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser sugerido durante um minucioso exame *post mortem* através da detecção de lesões granulomatosas, típicas da doença, no sistema linfático dos bovinos. Entretanto, deve ser realizado diagnóstico diferencial para outros processos patológicos que apresentam lesões macroscópicas semelhantes, principalmente localizadas em linfonodos e pulmões. Essas patologias podem ser diferenciadas através de exame histológico (Figura 7 A), sendo necessária a coleta e encaminhamento de lesões suspeitas para um laboratório de patologia (4, 47). Para alguns casos a cultura microbiológica também é necessária e/ou fundamental (44).

O exame *post mortem* associado ao diagnóstico histopatológico das lesões suspeitas são procedimentos importantes no diagnóstico de tuberculose bovina. Embora para o diagnóstico definitivo o padrão ouro seja a cultura bacteriologia, no exame histopatológico é possível realizar a coloração especial de Ziehl-Neelsen nas lesões granulomatosas suspeitas (44, 47). Essa coloração identifica bactérias álcool-ácido resistentes (Figura 7 B) como as pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (48).

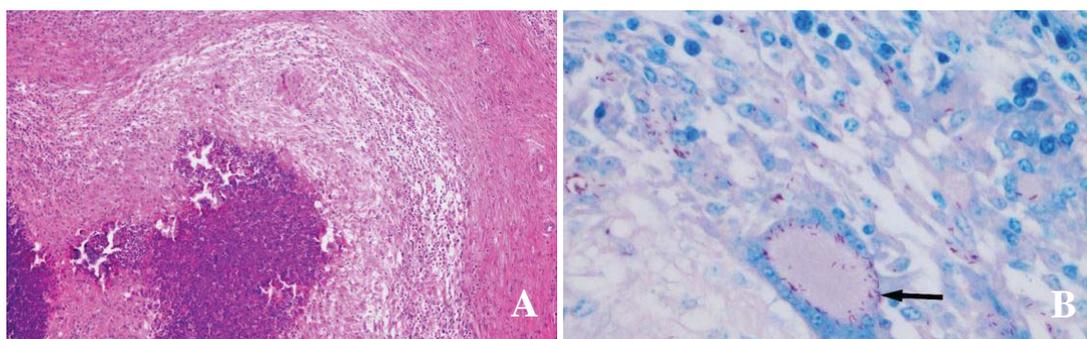


FIGURA 7. Caracterização de lesões causadas por *Mycobacterium* spp. em bovinos. (A) Linfonodo apresentando inflamação granulomatosa acentuada com macrófagos epitelióides, abundantes células gigantes multinucleadas e focos de necrose caseosa contendo mineralização multifocal. HE, obj.10x. B) Bacilos álcool-ácido resistentes (seta) no citoplasma de célula gigante em lesão de linfonodo bovino com tuberculose. Coloração de Ziehl-Neelsen, obj.40x (49).

2.4.4. Cultivo para micobactérias

O isolamento de micobactérias a partir de amostras clínicas pode ser realizado em diversos meios de cultura (50). Essa variedade de meios e métodos existentes permite que os laboratórios façam a melhor escolha, adequando-a com suas necessidades econômicas e de demanda de serviço (11). Existem meios de cultura à base de ovos (também ditos não seletivos), à base de ágar, meios seletivos (que possuem antimicrobianos) entre outros (11, 50). Os meios à base de ovos possuem boa capacidade tamponante e permitem o crescimento da maioria das micobactérias. Esses meios são compostos de ovos inteiros ou gema de ovo, fécula de batata, sais e glicerol ou piruvato, além de um corante capaz de inibir a flora contaminante, o verde malaquita (11).

Para a pesquisa do agente em amostras de alimentos, como o leite e seus derivados, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomenda a semeadura concomitante nos meios de cultura Löwenstein-Jensen e Stonebrink-Leslie para o isolamento de qualquer bactéria do gênero *Mycobacterium* (4). No entanto, sabe-se que o meio mais favorável para o crescimento de *M. bovis* contém piruvato e não contém glicerol, como é o caso do meio Lowenstein-Jensen (50). Apesar de existirem meios líquidos bastante utilizados por melhorarem a rapidez do resultado, como o Middlebrook, sabe-se que, ainda é necessária a incubação complementar em meio sólido, visto que esse procedimento fornece informações sobre a morfologia da colônia (Figura 8 A-B), além de permitir o crescimento de espécies que não crescem nos meios líquidos (50). Apesar de a cultura bacteriológica ser o método de referência e o teste definitivo para a confirmação da presença das micobactérias, esse é um procedimento extremamente lento que pode levar até três meses para sua conclusão, e cuja sensibilidade é baixa, podendo ocorrer culturas falso-negativas (30, 51, 52).



FIGURA 8. Cultivo bacteriológico. A) Placa de Petri contendo colônias de *Mycobacterium* spp. em meio de crescimento Lowenstein-Jensen. B) A) Placa de Petri contendo colônias de *Mycobacterium tuberculosis* em meio de crescimento Lowenstein-Jensen (53, 54).

2.4.5. PCR para micobactérias

Considerando que os métodos tradicionais de isolamento podem ser demorados, tem-se utilizado cada vez mais os métodos moleculares como diagnóstico primário da presença de micobactérias, embora o cultivo ainda seja considerado o padrão ouro (55). A principal vantagem desses métodos é a redução do tempo de diagnóstico, onde de semanas (como no caso dos cultivos), passa a ser de horas ou dias (56).

A reação de polimerização em cadeia (PCR) é uma técnica altamente sensível através da qual pequenas quantidades de DNA ou RNA do agente a ser pesquisado podem ser amplificadas a uma quantidade que permita que esse material genético alcance um limiar de detecção (57, 58). Além do seu uso no diagnóstico de amostras, a técnica de PCR também é empregada em muitos laboratórios para determinar ou confirmar a identificação das espécies após a cultura (Figura 9).

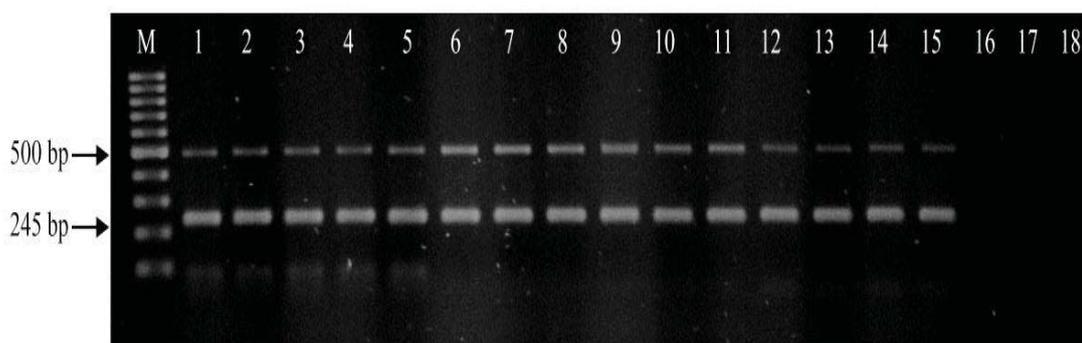


FIGURA 9. Identificação de isolados bacterianos por meio de PCR. O DNA foi extraído de dezessete isolados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) oriundos de lesões sugestivas de tuberculose, e foi realizada a amplificação das sequências RvD1Rv2031c e IS6110. Na coluna M encontra-se uma escada de DNA com 100 pb cada, as colunas 1-17 representam os isolados BAAR sugestivos de tuberculose e, a coluna 18 representa o controle negativo. As setas indicam o fragmento de 500 pb que confirma o diagnóstico para *M. bovis* e o fragmento de 245 pb que indica que o isolado é membro do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (59).

Atualmente, várias modificações da técnica de PCR encontram-se disponíveis. Uma delas é a PCR multiplex, técnica na qual são inseridos múltiplos pares de *primers* para diferentes agentes e/ou regiões-alvo do DNA, durante uma mesma reação (50, 60). A técnica de PCR multiplex é utilizada em muitos campos da microbiologia para se obter a rápida diferenciação das espécies de microrganismos, sem comprometer a precisão (60). Geralmente essa técnica utiliza como alvo o gene 16S rRNA, que é o mais utilizado para inferir proximidade filogenética entre bactérias (50, 61).

2.5. PROFILAXIA

A situação epidemiológica da tuberculose bovina é bem conhecida na maior parte do país, como já foi demonstrado. No entanto, o progresso no seu controle e na sua erradicação tem sido limitado pela dificuldade em engajar as cadeias produtivas de carne bovina e laticínios como verdadeiras parceiras nesse processo. Fatidicamente, o combate à tuberculose tem sido motivo de preocupação e incessantes esforços apenas dos serviços veterinários oficiais brasileiros, mas deveria ser uma importante preocupação de todos os elos das cadeias produtivas (62).

Considerando que o consumo de leite cru está entre as principais fontes de infecção humana por *M. bovis*, a idéia de consumir apenas leite pasteurizado e/ou derivados lácteos oriundos de leite pasteurizado já seria suficiente para diminuir drasticamente o número de pacientes infectados (4). Entretanto, existem muitas formas de infecção, entre elas o consumo de carne crua ou mal cozida e o contato direto com animais infectados, seja durante a sua vida produtiva ou durante o seu abate (63). Além disso, a detecção de lesões tuberculosas, realizado pelo serviço de inspeção de carcaças quando do abate dos animais, e o controle de trânsito e de participação em exposições, feiras e leilões também constituem medidas importantes. As ações previstas no PNCEBT são de extrema relevância e necessidade para que de fato se possa realizar o controle e futura erradicação da tuberculose bovina no país, e por consequência minimizar o número de humanos infectados pelo agente da tuberculose bovina (4, 42).

3. CAPITULO 1

TUBERCULOSE BOVINA: DIAGNÓSTICO EM BOVINOS LEITEIROS ATRAVÉS DE QUATRO FERRAMENTAS DE ANÁLISE

Leonardo Luiz Dametto¹, Ezequiel Davi dos Santos¹, Luciana Ruschel dos Santos¹ &
Elci Lotar Dickel^{1*}

O manuscrito a seguir a seguir contempla as diretrizes para autores e as regras de formatação preconizadas para submissão ao periódico **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA**. O referido periódico está inscrito no International Standard Serial Number (ISSN) sob o código numérico ISSN: 0100-736X e possui classificação Qualis: A2.

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.

* Autor para correspondência: E.L.Dickel, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo. Campus I, Bairro São José. 99052-900 – Passo Fundo, RS, Brazil. Telephone +55 54 3316 8485. E-mail: elcidickel@upf.br

TUBERCULOSE BOVINA: DIAGNÓSTICO EM BOVINOS LEITEIROS ATRAVÉS DE QUATRO FERRAMENTAS DE ANÁLISE¹

Leonardo Luiz Dametto², Ezequiel Davi dos Santos², Luciana Ruschel dos Santos² & Elci Lotar Dickel^{2*}

ABSTRACT.- Dametto L.L., Santos E.D., Santos L.R. & Dickel E.L. 2018. **Bovine tuberculosis: Diagnosis in dairy cattle through four analysis tools.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, BR-285, Bairro São José, Passo Fundo, RS, CEP 99052-900, Brazil. E-mail: lldametto@yahoo.com.br

Tuberculosis is a chronic anthroponosis of worldwide occurrence, caused by *Mycobacterium tuberculosis*. In Brazil, there is the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis in cattle, which makes possible the diagnosis and the correct allocation of positive animals, but there is still a lack of diagnosis of the disease. Thus, this paper describes the use of four diagnostic tools for the confirmation of suspected cases of tuberculosis. The tools used included the comparative cervical tuberculin test, the macroscopic findings during sanitary slaughter and the histopathology of the damaged tissues followed by histochemistry. The study evaluated a total of 211 dairy cattle, of which 35% (74/211) presented reactivity in the comparative cervical tuberculin test, and 143 animals (67.8%) were referred for sanitary slaughter due to legal and control issues in the outbreaks of the disease. In the follow-up of slaughter and sanitary inspection of viscera and carcasses, 51.8% (74/143) of slaughtered cattle had macroscopic lesions compatible with bovine tuberculosis, while 48.2% (69/143) showed no visible changes. During the inspection, fragments of lymph nodes and liver and lung parenchyma were collected from five cattle with macroscopic lesions and five with no lesions, which in histopathological analysis showed numerous areas of caseous necrosis and chronic inflammatory reaction with or without central calcification. In the Ziehl-Neelsen staining, numerous acid-fast bacilli were evidenced in all cases. Thus, the results obtained show that the analyzes used in the present study were extremely important for the accurate diagnosis of tuberculosis in cattle. In addition, the identification of the disease in dairy herds should serve as an alert to the serious public health risk that this symbolizes, since there are many people in direct contact or purchasing raw meat and / or milk from tuberculous animals.

INDEX TERMS: Tuberculosis, zoonosis, *Mycobacterium* spp., dairy cattle, diagnosis.

RESUMO.- [Tuberculose bovina: Diagnóstico em bovinos leiteiros através de quatro ferramentas de análise.] A tuberculose é uma antroponose crônica de ocorrência mundial, causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. No Brasil existe o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose em bovinos, que viabiliza o diagnóstico e a destinação correta dos animais positivos, porém ainda há dificuldade quanto ao diagnóstico da doença. Assim, este trabalho descreve a utilização de quatro ferramentas diagnósticas para a confirmação de casos suspeitos de tuberculose. As ferramentas utilizadas compreenderam o teste tuberculínico cervical comparativo, os achados macroscópicos durante o abate sanitário e a histopatologia dos tecidos lesados seguido de histoquímica. O estudo avaliou um total de 211 bovinos leiteiros, dos quais 35% (74/211) apresentaram reatividade no teste tuberculínico cervical comparativo, e 143 animais (67,8%) foram encaminhados para abate sanitário devido a questões legais e de controle nos focos da doença. No acompanhamento do abate e inspeção sanitária de vísceras e carcaças verificou-se que 51,8% (74/143) dos bovinos abatidos apresentavam lesões macroscópicas compatíveis com tuberculose bovina, enquanto 48,2% (69/143) não apresentavam alterações visíveis. Durante a inspeção foram coletados fragmentos de linfonodos e parênquima de fígado e pulmão de cinco bovinos com lesões macroscópicas e de cinco sem lesões, que na análise histopatológica apresentaram numerosas áreas de necrose caseosa e reação inflamatória crônica com ou sem calcificação central. Na coloração de Ziehl-Neelsen foram evidenciados numerosos bacilos álcool-ácido resistentes em todos os casos. Assim, diante dos resultados obtidos verifica-se que as análises empregadas no presente estudo foram de extrema importância para o diagnóstico acurado de tuberculose em bovinos. Além disso, a identificação da doença em rebanhos leiteiros deve servir como um alerta ao sério risco de saúde pública que tal fato simboliza, já que há muitas pessoas em contato direto ou adquirindo carne e/ou leite cru oriundos de animais tuberculosos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Tuberculose, zoonose, *Mycobacterium* spp., bovinos leiteiros, diagnóstico.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Universidade de Passo Fundo (UPF), Campus I, BR 285, Bairro São José, Passo Fundo, RS 99052-900, Brasil. *Autor para correspondência: elcidickel@upf.br.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma antroponose de evolução crônica e de ocorrência mundial, causada por micobactérias que compõem o chamado Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, o qual compreende as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. canetti*, *M. mungi*, *M. orygis* e *M. suricattae* (Alexander et al. 2010, Van Ingen et al. 2012, Dippenaar et al. 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose é a doença infecciosa de agente único que mais causa óbitos, superando inclusive o HIV. Em 2016, cerca de 10,4 milhões de pessoas adoeceram de tuberculose no mundo e cerca de 1,3 milhão morreram em decorrência da doença (WHO 2018). No Brasil, 2016 foram registrados 4.426 óbitos e em 2017 foram notificados 69.569 casos novos de tuberculose (Brasil 2018).

Nos bovinos a doença é causada pelo *Mycobacterium bovis* e configura-se numa das principais doenças infecciosas da espécie (Acha & Szyfres 2005, Radostits et al. 2007). A enfermidade provoca redução na produção de carne e leite e alto índice de condenação de carcaças em abatedouros, além de perdas econômicas devido aos embargos na comercialização de animais e produtos de origem animal (Demelash et al. 2009, Asil et al. 2012, Paes & Franco 2016). Sua transmissão ocorre, principalmente, por meio de contato direto com animais contaminados, consumo de água infectada e ingestão de leite cru e/ou derivados lácteos fabricados com leite cru, tal como queijos clandestinos (Corrêa & Corrêa 1992). A média nacional da ocorrência da tuberculose em bovinos é 2,64%, havendo heterogeneidade e flutuação dentro e entre os Estados avaliados, sendo que na região Sul, destaque na produção de leite, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná apresentaram 2,8%, 0,06% e 2,15%, respectivamente (Ferreira Neto et al. 2016).

No Brasil, desde 2001, existe o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) para bovinos e bubalinos, criado para estabelecer normas e procedimentos quanto ao diagnóstico dessas enfermidades (Brasil 2006). Conforme o PNCEBT, a base do diagnóstico da tuberculose "*in vivo*" é dado pela tuberculinização intradérmica em bovinos e bubalinos com mais de seis meses de idade. A tuberculinização se fundamenta, imunologicamente, por reação de hipersensibilidade tardia tipo IV e, pode ser realizada com as técnicas da prega caudal, cervical simples ou cervical comparativa (Brasil 2006, ^aBrasil 2017). Para o teste tuberculínico positivo, a legislação brasileira preconiza o abate sanitário do animal, que deve ser realizado em frigoríficos com serviço de inspeção oficial para que observações "*post mortem*" possam ser realizadas e, principalmente, para destinação correta da carcaça (^bBrasil 2017). Existem, porém, casos de reação inespecífica onde o bovino manifesta reação à tuberculina sem apresentar a doença. Também podem ocorrer casos em que o animal teve contato com o agente, sem lesões características de tuberculose na inspeção *post mortem*, bem como animais negativos no teste e que apresentam lesões compatíveis no *post mortem*. Essas situações se transformam em um celeiro de dúvidas para os agentes oficiais que têm de decidir o destino dos animais (Paes & Franco 2016). Assim, neste estudo, foram utilizados o teste tuberculínico cervical comparativo, seguido de inspeção minuciosa nos animais submetidos a abate sanitário e coleta de tecidos para exame histológico e histoquímico para diagnóstico da tuberculose bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

A aplicação dos testes para diagnóstico de brucelose e tuberculose fazia parte da rotina do médico veterinário habilitado pelo PNCEBT e colaborador do estudo, e cujos serviços foram contratados pelos proprietários dos rebanhos. O estudo avaliou 211 bovinos leiteiros de diferentes idades, entre os meses de novembro de 2017 e abril de 2018, oriundos de pequenas propriedades do Norte do Rio Grande do Sul. Aos proprietários foi explicada a importância do diagnóstico, bem como esclarecidas as medidas legais em caso de haver animais positivos no rebanho. Assim, mediante esclarecimento, todos os animais das propriedades foram avaliados por exame clínico geral e posteriormente submetidos ao teste tuberculínico.

O teste tuberculínico cervical comparativo (TTCC) é considerado um teste confirmatório e para realizá-lo foi realizada tricotomia em duas áreas: 1) região cervical, à frente da espinha da escápula e a 20 cm da cernelha, onde foi inoculada a tuberculina aviária; 2) na região cervical, atrás da espinha da escápula, e a 20 cm da cernelha, onde foi inoculada a tuberculina bovina. Inicialmente, entre estes dois pontos, respeitou-se uma distância mínima entre 15 a 20 cm e mensurou-se e registrou-se a espessura da dobra da pele de cada ponto com cutímetro. Após, procedeu-se a inoculação de 0,1 mL de da tuberculina PPD (*Purified Protein Derivate*) aviária e 0,1 mL da tuberculina PPD bovina. Após 72 horas da inoculação realizou-se nova verificação da espessura das dobras de pele, onde as diferenças foram interpretadas de acordo com os critérios definidos pelo Regulamento Técnico do PNCEBT (^aBrasil, 2017), para então concluir quais animais eram reagentes, não reagentes ou inconclusivos.

Conforme preconiza o PNCEBT, todos os bovinos considerados reagentes ou inconclusivos no teste tuberculínico foram marcados no lado direito da face com um "P" contido num círculo de oito centímetros de diâmetro e, destinados para abate sanitário em abatedouro frigorífico com serviço de inspeção oficial. Para o estudo foi acompanhada a inspeção de carcaça e vísceras de todos os animais destinados ao abate sanitário, a fim de localizar e identificar lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina, principalmente as lesões

granulomatosas e/ou calcificadas. A inspeção visual foi realizada através de palpação e secção seriada nos linfonodos (mediastinais, bronquiais, retrofaríngeos, parotídeos, mandibulares, mesentéricos e hepáticos), parênquima pulmonar e parênquima hepático e na carcaça (linfonodos sub-ilíacos, inguinais, sacrais, retro mamários).

Dentre os bovinos TTCC reagentes e enviados para abate selecionou-se cinco animais sem lesões características de tuberculose e cinco que não apresentavam nenhuma lesão caseosa ou calcificada. Desses bovinos coletou-se fragmentos de linfonodos (retrofaríngeos, mediastinais, bronquiais, mesentéricos e hepáticos) e de parênquima pulmonar e hepático para realização de exame histopatológico (hematoxilina e eosina) e coloração especial de Ziehl-Neelsen para verificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação clínica dos bovinos leiteiros, constatou-se que 15,1% (32/211) apresentavam sinais clínicos clássicos de tuberculose bovina, como queda na produção de leite, dificuldade de concepção e dificuldade respiratória, prostração e caquexia (Fig.1 A). Posteriormente foram submetidos ao TTCC (Fig.1 B), o qual evidenciou que 35% (74/211) apresentaram reatividade, sendo 22,3% (47/74) positivos e 12,8% (27/74) inconclusivos. O teste demonstrou também que 64,9% (137/211) dos bovinos eram negativos para as tuberculas bovina e aviária, embora mantidos com animais reagentes ao teste. Na tabela 1 encontra-se o resumo dos resultados da avaliação clínica, do TTCC, da frequência de animais destinados para abate sanitário por município e do número de lesões macroscópicas encontradas durante a inspeção *post mortem*.

Por se tratar de uma doença de caráter crônico, a grande variabilidade de manifestações faz com que o diagnóstico clínico da tuberculose tenha valor relativo, uma vez que o bovino pode estar infectado de modo localizado e aparentar-se sadio (Corrêa & Corrêa 1992). Estudos com animais inoculados com *M. bovis* em contato com animais não inoculados demonstraram não haver sinais clínicos compatíveis com a enfermidade nos dois grupos (Cassidy et al. 1999). Nos casos de tuberculose avançada, o diagnóstico clínico assume maior importância, pois os animais em geral apresentam queda na produção de leite, dificuldade de concepção, dificuldade respiratória, eliminação de secreção nasal, prostração e caquexia (Roxo 1997, Brasil 2006, Garbaccio et al. 2018).

O teste tuberculínico em bovinos apresenta uma sensibilidade com variação entre 32 a 99% e uma especificidade de 75,5 a 99,9% (Vitale et al. 1998), e no presente estudo a sensibilidade foi de 35% (74/211) de animais reagentes. O teste tuberculínico pode apresentar resultados falso-positivos (Monaghan et al. 1994), pois animais infectados por *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *Nocardia farcinus* ou outras micobactérias podem ser reativos ao PPD bovino (Monaghan et al. 1994, Souza et al. 2016, Garbaccio et al. 2018). Assim, o TTCC é o teste preconizado já que em comparação com o teste tuberculínico simples apresenta redução na possibilidade de tais reações cruzadas (Collins et al. 1994). Entretanto, a ocorrência de 12,8% (27/211) animais inconclusivos demonstra sua limitação, bem como a necessidade da utilização de métodos complementares para um resultado preciso (Monaghan et al. 1994, Romero et al. 1999).

Alguns animais, ainda que infectados, não respondem aos testes tuberculínicos (Brasil 2006), o que pode ter ocorrido no presente estudo. Nos municípios de Círiaco e Passo Fundo (RS), por medida de controle dos focos, 100% dos animais testados foram enviados para abate sanitário, dos quais 52% (27/52) e 47% (42/89) foram negativos no TTCC embora estivessem junto com animais positivos, respectivamente. Nos animais oriundos dos mesmos municípios e enviados para abate foram evidenciados 85% e 33,7% de ocorrência de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose durante a inspeção *post mortem*, respectivamente. Fatores como infecção recente, final de gestação, desnutrição e doença avançada podem ocasionar falso-negativos no teste tuberculínico. Além disso, tais resultados podem ocorrer devido a variações inerentes ao próprio teste ou por variações na leitura e interpretação do exame (BRASIL, 2006). É importante salientar que animais em estado avançado de infecção podem manifestar o fenômeno chamado de anergia, definido como ausência de reatividade cutânea à tuberculina (ROXO, 1996).

Com base os resultados do TTCC, da orientação do PNCEBT (Brasil, 2006) e da Inspeção Veterinária, além dos bovinos reagentes também foi determinado o abate sanitário de animais negativos para o TTCC mas oriundos de propriedades com mais de 50% de bovinos reagentes para as tuberculas bovina e aviária, totalizando 67,8% (143/211) dos animais examinados. Os abates foram realizados em abatedouro frigorífico com serviço de inspeção oficial, onde todos os processos puderam ser acompanhados e registrados, incluindo a realização da inspeção *post mortem* de carcaças e vísceras. Na inspeção *post mortem* verificou-se que 51,8% (74/143) dos bovinos apresentaram lesões granulomatosas de aspecto purulentas ou caseosas, por vezes calcificadas em um ou mais sítios, principalmente linfonodos pré-escapular, retrofaríngeo, retromamário, hepático, mesentéricos e linfonodos pulmonares apicais e/ou mediastínicos (Fig.1 C), além das pleuras parietal (Fig.1 D) e visceral e, dos parênquimas pulmonar (Fig.1 E) e hepático. Enquanto isso, 48,2% (69/143) dos bovinos inspecionados não apresentaram lesões visíveis.

As carcaças foram consideradas positivas quando em pelo menos um órgão verificou-se lesões sugestivas de tuberculose, tal como no estudo de Furlanetto et al. (2012). No presente trabalho, dos 143 bovinos

submetidos a abate sanitário 51,8% (74/143) apresentaram lesões sugestivas, resultado inferior ao reportado por Fráguas et al. (2008) que observou 72% de carcaças com lesões em estudo semelhante. Entretanto, foi superior ao relatado por Pinto et al. (2004), o qual encontrou 44% dos bovinos reagentes à tuberculinização também apresentando lesões tuberculosas. Para Corner et al. (1990), cerca de 58% dos animais com tuberculose apresentam lesões únicas, e a inspeção detalhada de linfonodos (cabeça, torácicos, mesentéricos e da carcaça) bem como fígado, pulmão, baço, rins, úbere e órgãos genitais, aumenta a possibilidade de visualização destas lesões (Corner, 1994). Alguns aspectos podem estar envolvidos com a não detecção de lesões sugestivas em carcaças de animais reagentes ao TTCC, tais como: estágio inicial da doença, contato com outras micobactérias que não o *M. bovis*, tempo e atenção destinados para a inspeção *post mortem* insuficientes (Souza et al. 1999, Corner 1994, Brasil 2006, Medeiros et al. 2012).

Dos 10 bovinos selecionados para exame histopatológico, cinco apresentavam lesões amareladas, com conteúdo purulento ou caseoso circundado por cápsula fibrosa e, por vezes, aspecto calcificado ao corte, tal como encontrados por Souza et al. (2016). Também foram coletados fragmentos de linfonodos retrofaríngeos, mediastinais, bronquiais, mesentéricos e hepáticos e, do parênquima pulmonar e hepático de cinco bovinos TTCC reagentes e que não apresentavam lesão macroscópica na inspeção. Tal como encontrado por Furlanetto et al. (2012), na análise microscópica os 10 bovinos apresentaram lesões compatíveis com tuberculose bovina. No presente trabalho foram identificadas lesões intensas ou moderadas, porém todas circundadas por tecido conjuntivo fibroso e bem delimitadas. Além disso, apresentavam reação granulomatosa acentuada, infiltrado mononuclear constituído de macrófagos epitelioides, linfócitos e células gigantes tipo Langhans e necrose caseosa central e/ou mineralização multifocal (Fig.1 F).

Em bovinos podem ocorrer processos inflamatórios granulomatosos com características macroscópicas semelhantes a tuberculose, porém de etiologias diferentes como linfossarcoma, linfadenites inespecíficas, actinobacilose e nocardiose (Kantor et al. 1981, Reis et al. 1995, Roxo 1997). Assim, a inspeção macroscópica pode ser subjetiva para julgamento das carcaças (Reis et al. 1995, ^bBrasil 2017), indicando que a inspeção sanitária das carcaças deve ser realizada de forma criteriosa, por profissionais bem treinados, diminuindo assim o risco de alimentos suspeitos chegarem à mesa dos consumidores ou de carcaças serem condenadas desnecessariamente em função de lesões não tuberculosas (Fraguás et al. 2008, ^bBrasil 2017).

No presente estudo a coloração de Ziehl-Neelsen proporcionou a evidência de numerosos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em todas as amostras teciduais examinadas (Fig.1 G), inclusive naquelas sem lesão macroscópica. Entretanto, estes achados destoam de estudos que consideram a coloração de Ziehl-Neelsen de baixa sensibilidade quando aplicada em cortes histológicos (Fráguas et al. 2008). Andrade et al. (1991) observou BAAR em apenas 9,1% das amostras histológicas examinadas em seu estudo, enquanto Salazar (2005) e Furlanetto et al. (2012) relataram ausência de BAAR em amostras de tecidos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose e confirmadas no exame histopatológico. Conforme Rodriguez et al. (2004), essas divergências podem ocorrer porque o teste revela a presença de BAAR em concentrações superiores a 10⁴ micobactérias em um corte histológico.

Os resultados permitiram inferir que o TTCC, a inspeção *post mortem* macroscópica, o exame histopatológico e identificação de BAAR são ferramentas úteis para o diagnóstico de tuberculose bovina. O presente estudo destaca, sobretudo, a análise histopatológica e histoquímica em tecidos com lesões sugestivas de tuberculose bovina, o que permite caracterizar as alterações microscópicas das lesões, bem como identificar BAAR. Também é importante salientar que o estudo foi realizado em um rebanho leiteiro, demonstrando a circulação da doença entre esses animais, o que representa uma ameaça às pessoas que entram em contato direto e/ou que consomem carne e leite desses animais. Além disso, os bovinos infectados também constituem uma fonte de infecção para aqueles que trabalham na indústria de produção de alimentos, expondo-os ao agente etiológico durante o manuseio de animais ou produtos de origem animais infectados.

CONCLUSÕES

A obtenção do diagnóstico confirmatório da tuberculose bovina não é simples, principalmente quando consideramos as reações inespecíficas que podem ocorrer nas provas intradérmicas e as dúvidas quanto às lesões encontradas em matadouros durante a inspeção *post mortem*. O presente estudo demonstrou que a associação de alternativas de baixo custo permitiu ampliar a acurácia diagnóstica para tuberculose bovina. Afinal, o TTCC identificou animais reagentes que no abatedouro foram identificados com lesões sugestivas, enquanto a histopatologia das lesões sugestivas identificou lesões granulomatosas, e a coloração de Ziehl-Neelsen evidenciou BAAR, inclusive em bovinos reagentes no TTCC sem lesão macroscópica. Assim, a associação dessas ferramentas contribuiria para o bom funcionamento do PNCEBT para controle e erradicação dessa zoonose nos rebanhos bovinos brasileiros.

REFERÊNCIAS

- Acha P.N. & Szyfres B. 2005. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: bacterioses and mycoses. 3^a ed. Pan American Health Organization, Washington, 378p.
- Alexander K.A., Laver P.N., Michael A.L., Williams M., Van Helden P.D., Warren R.M. & Van Pittius N.C.G. 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. Emerg. Infect. Diseases 16(8):1296-1299.
- Andrade G.B., Riet-Correa F., Mielke P.V., Méndez M.C. & Schild A.L. 1991. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares á tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 11(3):81-86.
- Asil E.T.A., Sulieman M., Sanousi E., Gameel A., Beir E.H., Fathelrahman M., Terab N.M., Muaz A.M. & Hamid M.E. 2012. Bovine tuberculosis in South Darfur State, Sudan: an abattoir study based on microscopy and molecular detection methods. Trop. Anim. Health Production 45(1):469-472.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006. Manual Técnico - Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília, DF.
- ^aBRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2017. Instrução Normativa Nº 10 de 03 de março de 2017. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Brasília, DF.
- ^bBRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. 2017. Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017, alterado pelo Decreto nº 9.069 de 31 de maio de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Brasília, DF.
- BRASIL. Ministério da Saúde. 2018. Implantação do Plano Nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas. Boletim Epidemiológico 49(11):1-18.
- Cassidy J.P., Bryson D.G., Pollock J. M., Evans R.T., Forster F. & Neill S.D. 1999. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis* - inoculated Calves. J. Comp. Path. 121(4):321-337.
- Collins D.M., Radford A.J., Lisle G.W. & Jacob H.B. 1994. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. Vet. Microb. 40(1):83-94.
- Corner L.A., Melville L., Mccubbin K., Small K.J., McCormick B.S. & Rothel J.S. 1990. Efficiency of inspection procedures for detection of tuberculous lesions in cattle. Australian Vet. J. 67(11):389-392.
- Corner L.A. 1994. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microb. 40(1):53-63.
- Corrêa W.M. & Corrêa C.N.M. 1992. Tuberculose. In: Corrêa W.M. & Corrêa C.N.M. (Ed), *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2. ed. Medsi, Rio de Janeiro, p.317-337.
- Demelash B., Inangolet F., Oloya J., Asseged B., Badaso M., Yilkal A. & Skjerve E. 2009. Prevalence of bovine tuberculosis in Ethiopian slaughter cattle based on post-mortem examination. Trop. Anim. Health Production 41(1):755-765.
- Dippenaar A., Parsons S.D.C., Sampson S.L., Van Der Merwe R.G., Drewe J.A., Abdallah A.M., Siame K.K., Van Pittius N.C.G., Van Helden P.D., Pain A. & Warren R.M. 2015. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. Tuberculosis 95:682-688.
- Ferreira Neto J.S., Silveira G.B., Rosa B.M., Gonçalves V.S.P., Grisi-Filho J.H.H., Amaku M. & Lage A.P. 2016. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Semina: Ciên. Agrárias* 37(5):3385-3402.
- Fráguas S.A., Cunha-Abreu M.S., Ferreira A.M.R., Marassi C. D., Oelemann W., Fonseca L.S, Ferreira R. & Lilenbaum W. 2008. Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. *Rev. Bras. Ciên. Vet.* 15(3):117-121.
- 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. 2012. Uso de métodos complementares na inspeção post mortem de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 32(11):1138-1144.
- Garbaccio S.G., Delgado F.O., Zumarraga M.J., Rodriguez L.R., Huertas P.S. & Garro C.J. 2018. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis bovina en bovinos reactivos positivos a la prueba tuberculínica. *Ver. Investig. Agropec.* 44(1):69-75.
- Kantor I.N., De La Veja E. & Caballero P. 1981. Estudio de órganos bovinos decomisados por tuberculose, mataderos del gran Buenos Aires. *Rev. Méd. Vét.* 62(4):282-285.
- Medeiros L.S., Marassi C.D., Figueiredo E.E.S., Leite J., Ferreira A.M.R. & Lilenbaum W. 2012. Assessing the histopathology to depict the different stages of bovine tuberculosis infection in a naturally infected herd. *Pesq. Vet. Bras.* 32(2):135-139.

- Monaghan M.L., Doherty M.L., Collins J.D., Kazda J.F. & Quinn P.J. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microb.* 40(1):111-124.
- Paes A.C. & Franco M.M.J. 2016. Tuberculose em animais de produção. In: Paes A.C. & Franco M.M.J. (Ed), *Doenças infecciosas em animais de produção e companhia*. Roca, Rio de Janeiro, p.512-542.
- Pinto P.S.A., Vilorio M.I.V. & Faria J.E. 2004. Avaliação do desempenho dos exames anatomopatológico e histopatológico na inspeção *post mortem* de bovinos suspeitos ou reagentes à prova de tuberculinização. *Rev. Bras. Ciên. Vet.* 11(1):27-31.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10. ed. Saunders, Philadelphia, 2156p.
- Reis D.O., Almeida L. & Faria A.R. 1995. Estudo comparativo entre linfossarcoma, tuberculose e linfadenites inespecíficas ocorridas em bovinos abatidos e a confirmação histológica. *Higiene Alimentar* 9(35):28-30.
- 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. 2004. Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de Spoligotyping. *Arq. Inst. Biol.* 71(3):277-282.
- Romero R.E., Garzón D.L., Mejía G.A., Monroy W., Patarroyo M.E. & Murillo L.A. 1999. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. *Canadian J. Vet. Research* 63(2):101-106.
- Roxo E. 1996. Tuberculose bovina: Revisão. (Bovine Tuberculosis: Review). *Arq. Inst. Biol.* 63(2):91-97.
- Roxo E. 1997. *M. bovis* como causa de zoonose. *Ver. Bras. Ciên. Farmac.* 18(1):101-108.
- Salazar F.H.P. 2005. Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no estado de Mato Grosso, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 73p.
- Silva D.A.V.D., Siconelli M.J.L., Bürger K.P. & Keid L.B. 2018. Comparison between tests for tuberculosis diagnosis in slaughtered bovines. *Arq. Inst. Biol.* 85(1):1-8.
- Souza A.V.D., Sousa C.F.A., Souza R.M.D., Ribeiro R.M.P. & Oliveira A.D.L. 1999. A importância da tuberculose bovina como zoonose. *Higiene Alimentar* 13(59):22-27.
- Souza M.A.D., Bombonato N.G., Soares P.M., Ramos G.B., Castro I.P., Medeiros A.A. & Lima A.M.C. 2016. Exames complementares no diagnóstico da tuberculose em bovinos reagentes à tuberculinização comparada. *Arq. Inst. Biol.* 83(1):1-8.
- Van Ingen J., Rahim Z., Mulder A., Boeree M.J., Simeone R., Brosch R. & Van Soolingen D. 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerg. Infect. Diseases* 18(4):653-655.
- Vitale F., Capra G., Maxia L., Reale S., Vesco G. & Caracappa S. 1998. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates and nasal swabs. *J. Clin. Microb.* 36(4):1050-1055.
- WHO - World Health Organization. Bending the curve - ending TB: Annual report 2017. Geneva: World Health Organization, 2017. 72 p. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/254762>>. Acesso em: 01 agosto 2018.

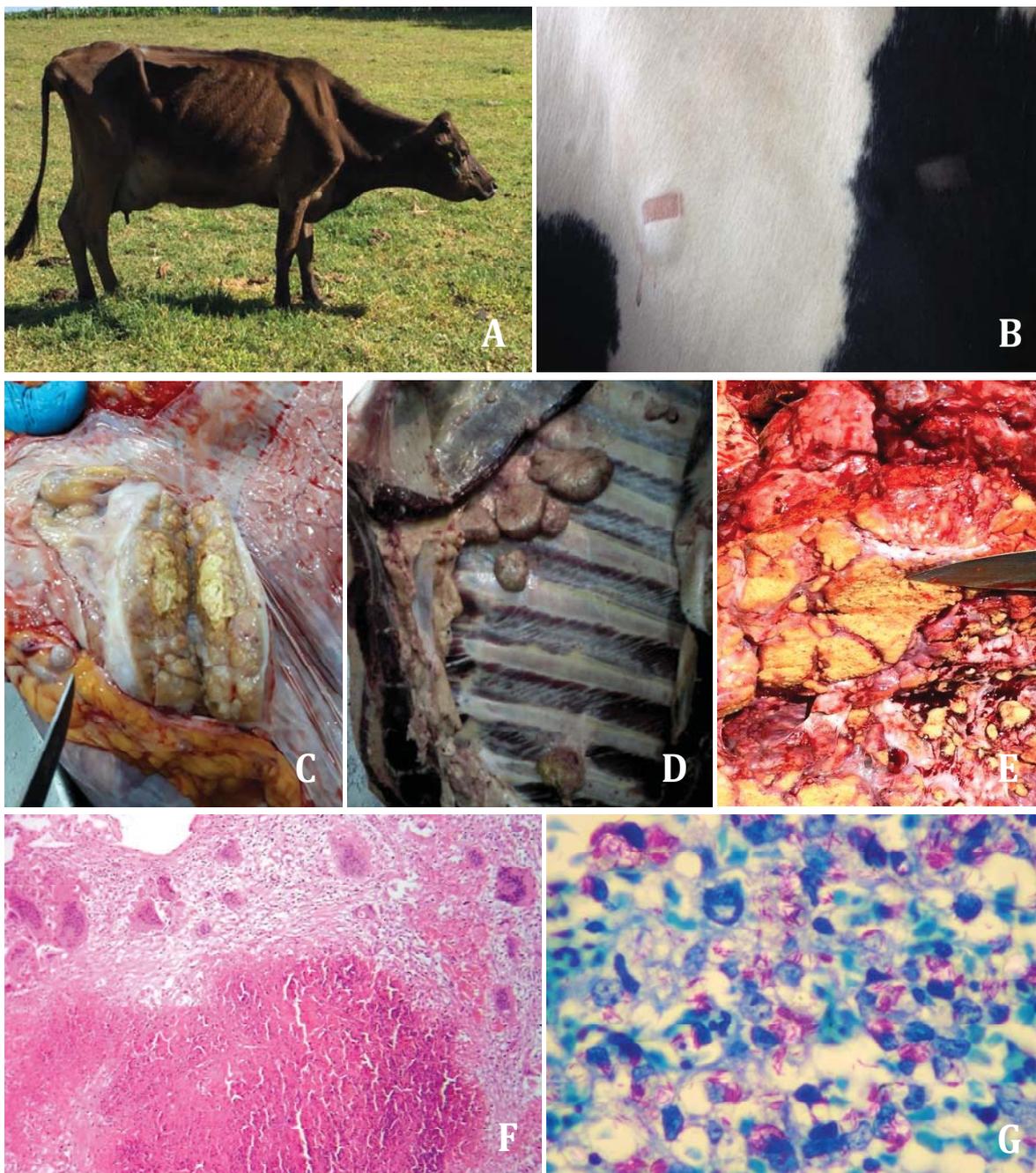
Legenda da Tabela

Tab.1. Avaliação clínica, teste tuberculínico comparativo cervical (TTCC), animais destinados ao abate sanitário e animais com lesões macroscópicas encontradas na inspeção *post mortem* dos 143 bovinos abatidos.

Município	Avaliação clínica		Teste tuberculínico (TTCC)			Abate sanitário	Inspeção <i>post mortem</i>	
	Com sinais	Sem sinais	Positivo	Inconc.	Negativo	Nº animais	Com lesões	Sem lesões
Ciríaco	13	39	15	10	27	52	44	8
Nova Bassano	-	70	2	-	68	2	-	2
Passo Fundo	19	70	30	17	42	89	30	59
Total	32	179	47	27	137	143	74	69
%	15,1	84,9	22,3	12,8	64,9	67,8	51,8	48,2

Legendas das Figuras

Fig.1. Ferramentas diagnósticas para tuberculose bovina. A) Fêmea bovina apresentando dificuldade respiratória, prostração e caquexia. B) Fêmea bovina com TTCC positivo. B) Lesão granulomatosa em linfonodo mediastínico. D) Nódulos granulomatosos aderidos a pleura parietal. E) extensas áreas de lesões granulomatosas no parênquima pulmonar. F) Pulmão com inflamação granulomatosa acentuada com macrófagos epitelioides, abundantes células gigantes multinucleadas e necrose caseosa. HE, obj.10x. G) Bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) no citoplasma de célula gigante em lesão de linfonodo bovino com tuberculose. Ziehl-Neelsen, obj.100x.



4. CONCLUSÕES

A proposta do presente trabalho foi de detectar bovinos leiteiros reagentes ao teste tuberculínico cervical comparativo (TTCC) e a partir disso, acompanhar a inspeção *post mortem* dos bovinos regentes para identificar lesões sugestivas de tuberculose bovina e coletá-las para exame histopatológico e histoquímico.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o TTCC, a inspeção macroscópica em frigoríficos, a realização de exame histopatológico e identificação de bacilos álcool ácido através da coloração especial de Ziehl-Neelsen, constituem ferramentas de análise, que quando utilizadas em conjunto, são muito úteis para o diagnóstico definitivo de tuberculose bovina. O estudo destaca, sobretudo, a análise histopatológica e histoquímica em tecidos com lesões sugestivas de tuberculose bovina, pois esses exames permitiram caracterizar o tipo de alterações microscópicas que compunham as lesões, bem como identificar que os agentes envolvidos no processo inflamatório eram bacilos álcool-ácido resistentes.

Também é importante salientar que o estudo foi realizado em um rebanho leiteiro e demonstrou que a doença está circulando entre os animais dessa categoria, o que representa uma séria ameaça à saúde das pessoas que entram em contato direto com os animais doentes e/ou que consomem carne e leite cru, cuja a origem é de animais infectados. Além disso, indiretamente, o estudo demonstra como os bovinos infectados também constituem uma fonte de infecção para aqueles que trabalham na indústria de produção de alimentos, já que durante o manuseio dos animais *in vivo* ou durante o abate e inspeção *post mortem* eles se expõem ao agente etiológico.

Outro ponto que deve ser salientado e merece mais estudos é o quanto do percentual de positividade em uma propriedade deve ser considerado para a realização de um vazio sanitário, pois o presente trabalho evidenciou que bovinos negativos abatidos de propriedades com altos índices de animais positivos, podem possuir lesões sugestivas de tuberculose, os anérgicos, e estes se permanecerem na propriedade serão a fonte de contaminação para os demais bovinos do rebanho.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos 211 animais examinados no teste tuberculínico cervical comparativo (TTCC) pode-se dizer que a tuberculose bovina encontra-se presente com alto índice de prevalência (35,1%) dos bovinos analisados, nestas três propriedades, dos municípios de Ciríaco, Nova Bassano e Passo Fundo. Sem falar que esse índice seria mais alto se considerássemos todos os bovinos que eram negativos no TTCC, mas apresentaram lesões sugestivas de tuberculose na inspeção *post mortem* e que foram confirmadas macroscopicamente.

Por ser tratar de um rebanho leiteiro e pela ocorrência da tuberculose representar um risco zoonótico seríssimo, o TTCC deveria ser um exame de rotina obrigatório em toda propriedade que comercializa leite. Embora o teste tuberculínico seja preconizado pelo PNCEBT e haja uma Instrução Normativa do MAPA que trate do controle e erradicação da brucelose e tuberculose, a legislação brasileira não obriga e tampouco penaliza os pecuaristas que não realizam os diagnósticos. Além disso, quando o diagnóstico é realizado em um rebanho e alguns animais se apresentam positivos, esses são marcados e destinados ao abate sanitário. Porém os demais, que estavam em contato com os positivos, mas que foram negativos no teste tuberculínico só deverão ser retestados após no mínimo 60 dias, tempo suficiente para um bovino se constituir numa grave fonte de disseminação de tuberculose.

As agroindústrias também têm culpa de o rebanho bovino brasileiro ainda estar sujeito a doenças como brucelose e tuberculose. Se as pequenas, médias e grandes indústrias de produtos de origem animal realmente se preocupassem com a qualidade sanitária das suas matérias primas, bem como com a saúde do consumidor, elas fariam uma parceria com o MAPA e implementariam o PNCEBT em todo território nacional. Assim, os produtores de leite e carne ficariam obrigados a aderirem ao PNCEBT, pois só assim haveria de fato controle e, num futuro próximo, erradicação dessas duas doenças zoonóticas.

Enquanto tal parceria não é instituída e os rebanhos continuarem sendo acometidos por essas zoonoses, se torna extremamente importante o uso de várias ferramentas para o diagnóstico da tuberculose, sobretudo as de baixo custo e que apresentem boa sensibilidade e especificidade. Principalmente o exame histopatológico das lesões de abatedouros consideradas suspeitas, pois embora requeira pessoal e laboratórios especializados, é uma ferramenta que tem boa especificidade e permite a confirmação da presença da lesão granulomatosa e, quando associada à coloração especial permite a visualização de bacilos álcool-ácido resistentes, compatíveis com *Mycobacterium* spp.

6. REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. Produção da pecuária municipal em 2016 [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf>.
2. Viana G, Ferras RPR. A cadeia produtiva do leite: um estudo sobre a organização da cadeia e sua importância para o desenvolvimento regional. *Rev Cap Científico-Eletrônica*. 2010;5(1):23-40.
3. Mendes EI, Melo LEH, Tenório TGS, Sá LM, Souto RJC, Fernandes ACC, Silva TIB. Intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose em bovinos leiteiros do estado de Pernambuco. *Arq Inst Biol*. 2011;78(1):1-8.
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico - Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília (DF); 2006.
5. Beer J. Doenças Infecciosas em Animais Domésticos. São Paulo: Roca; 1988.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 02 de 10/01/2001. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Brasília (DF); 2001.
7. Murakami PS, Fuverki RBN, Nakatani SM, Barros Filho IR, Biondo AW. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. *Arq Cien Vet Zool UNIPAR*. 2009;12(1):67-74.
8. World Health Organization [Internet]. Bending the curve - ending TB: Annual report 2017 [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/254762>>.
9. Abrahão RCM, Nogueira PA, Malucelli MIC. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: Um problema de saúde pública. *Arch Vet Science*. 2005;10(2):1-17.
10. Kantor IN. Bacteriología de la tuberculosis humana y animal. 2ª ed. Buenos Aires: CEPANZO; 1989.

11. Pfyffer GE. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, editores. Manual of clinical microbiology. 11^a ed. Washington: ASM Press; 2015. p. 543-72.
12. Leao SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MS, Portaels F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Belgium: Ghent University; 2004.
13. Barrera L. The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V, editores. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. 3^a ed. Belgica: BourcillierKamps; 2007. p. 93-112.
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [Internet]. Conjunto de bactérias da espécie *Mycobacterium tuberculosis* visualizadas em microscopia eletrônica de varredura [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=9997>>.
15. Rosemberg J, Tarantino AB. Tuberculose. In: Tarantino AB, editor. Doenças pulmonares. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 294-380.
16. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology: an introduction. 9^a ed. San Francisco: Benjamin Cummings; 2006.
17. Euzéby JP [Internet]. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Mycobacterium* [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>>.
18. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tuberc Lung Dis. 1995;76(1):1-46.
19. Sobral LF, Duarte RS, Vieira GBO, Silva MG, Boéchat N, Fonseca LS. Identificação de *Mycobacterium bovis* em cepas micobacterianas isoladas de espécimes clínicos humanos em um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. J Bras Pneum. 2011;37(5):664-68.

20. Zinsstag J, Schelling E, Roth F, Kazwala R. Economics of bovine tuberculosis. In: Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ, editores. *Mycobacterium bovis* infections in animals and humans. Iowa: Blackwell Publishing; 2005. p. 68-83.
21. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 146 de 07/03/1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. Brasília (DF); 1996.
22. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 30 de 07/08/2013. Permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto. Brasília (DF); 2013.
23. Cezar RD, Lucena-Silva N, Borges JM, Santana VL, Junior JWP. Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil. *Inter J Mycobacteriology*. 2016;5(3):269-272.
24. Starikoff KR, Fontanesi CD, Maciel FM, Ikuta CY, Ferreira F, Neto JSF, Grisi-Filho JHH. Decline in *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* populations during the maturation of experimentally contaminated parmesan-type cheese. *Sem Cien Agrárias*. 2016;37(5): 3743-3758.
25. Bdnews24.com Bangladesh's First Internet Newspaper [Internet]. WHO, The Union call countries to take zoonotic TB 'seriously' [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<https://bdnews24.com/health/2016/10/27/who-the-union-call-countries-to-take-zoonotic-tb-seriously>>.
26. Dailloux M, Laurain C, Weber M, Hartemann PH. Water and nontuberculous mycobacteria. *Water Research*. 1999;33(10):2219-2228.
27. Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: bacterioses and mycoses. 3^a ed. Washington: Pan American Health Organization; 2003.
28. Steele JH, Ranney AF. Animal tuberculosis. *Amer Review Tuberculosis*. 1958;77(6):908-922.

29. Roxo E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. Rev Cien Farmacêuticas. 1997;1(18):101-108.
30. Leite CQF, Anno IS, Leite SR, Roxo E, Morlock GP, Cooksey RC. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(3):319-323.
31. De La Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis. 2006;86(2):77-109.
32. Thoen CO, LoBue PA, Enarson DA, Kaneene JB, Kantor IN. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. Vet Italiana. 2009;45(1):135-181.
33. Handa U, Mundi I, Mohan S. Nodal tuberculosis revisited: a review. J Infection Dev Countries. 2012;6(1):6-12.
34. The Financial Times [Internet]. TB superbugs spur need for new vaccine [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<https://www.ft.com/content/c5774d7c-f5a3-11e5-96db-fc683b5e52db>>.
35. MSD Manual Version Professional [Internet]. Extrapulmonary Tuberculosis (TB) [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/mycobacteria/extrapulmonary-tuberculosis-tb>>.
36. Collins CH. The bovine tubercle bacillus. British J Biomed Science. 2000;57(3):234-240.
37. The University of British Columbia [Internet]. Bovine Tuberculosis [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<https://blogs.ubc.ca/badgered/category/bovine-tuberculosis/>>.
38. Universidade Federal de Santa Catarina [Internet]. Tuberculose Bovina [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<http://patologiaveterinaria.paginas.ufsc.br/2015/12/16/tuberculose-bovina/>>.
39. Brasil. Ministério da Saúde. Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem. Brasília (DF); 2011.

40. Souza JR, Souza W, Miranda GY, Carvalho EMF. Resposta atenuada ao PPD no diagnóstico de infecção tuberculosa latente em pacientes com artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol*. 2009;49(2):121-31.
41. Roxo E [Internet]. Tuberculose humana e animal [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível: <https://www.researchgate.net/profile/Eliana_Roxo/publication/258109756_Tuberculose_humana_e_animal/links/0deec526f7d39d07000000/Tuberculose-humana-e-animal.pdf>.
42. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 10 de 03/03/2017. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Brasília (DF); 2017.
43. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Decreto nº 9.013 e 29 de março de 2017, alterado pelo Decreto nº 9.069 de 31 de maio de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Brasília (DF); 2017.
44. Furlanetto LV, Figueiredo EE, Conte Júnior CA, Carvalho RC, Silva FG, Silva JT, Paschoalin VM. Uso de métodos complementares na inspeção post mortem de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. *Pesq Vet Bras*. 2012;32(11):1138-1144.
45. Souza MA, Bombonato NG, Soares PM, Ramos GB, Santos MP, Ganda MR, Lima-Ribeiro AMC. Frequência de lesões macroscópicas em carcaças de bovinos reagentes ao teste tuberculínico. *Arq Inst Biológico*. 2014;81(4):363-367.
46. Furlanetto LV, Figueiredo EES, Júnior CC, Silva FGS, Duarte RS, Silva JT, Paschoalin VMF. Prevalência de tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso, Brasil. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 2012;64(2):274-280.
47. Giannitti F, Fraga M, Caffarena RD, Schild CO, Banchemo G, Armien AG, Riet-Correa F. *Mycobacterium paratuberculosis* sheep type strain in Uruguay: Evidence for a wider geographic distribution in South America. *J Infec Devel Countries*. 2018;12(03):190-195.
48. França LR, Sousa DL, Carvalho FRB, Pinto MS, Castro PNMP, Santos ÉSV, Cerqueira RB. Diagnóstico pelas técnicas histopatológicas e de Ziehl-Neelsen da tuberculose bovina

- de carcaça condenada em um frigorífico no Estado da Bahia. Rev Ciên Méd Biol. 2016;15(1):52-55.
49. Andrezza D, Boos GS, Boabaid FM, Wouters ATB, Wouters F, Souza SO, Driemeier D. Caracterização histológica e imuno-histoquímica das lesões de tuberculose em bovinos e de linfadenite granulomatosa em suínos. Pesq Vet Bras. 2015;35(2):129-136.
50. Koneman EW. Micobactérias. In: Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL, editores. Diagnostico microbiologico: texto e atlas colorido. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008. p. 1016-1075.
51. Pardo RB, Langoni H, Mendonça LJP, Chi KD. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. Braz J Vet Research Anim Science. 2001;38(6):284-287.
52. Vialta A, Moreno I, Lerayer ALS, Vieira MC, Graef ET, Barbieri MK. Caracterização microbiológica, microscópica e físico-química de produtos lácticos clandestinos apreendidos no estado de São Paulo. Rev Elet Epid Doenças Transm Alimentos. 2003;3(6):212-216.
53. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [Internet]. Colônias de *Mycobacterium* spp. visualizadas em meio de cultivo Lowenstein-Jensen [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2904>>.
54. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [Internet]. Colônias de *Mycobacterium tuberculosis* visualizadas em meio de cultivo Lowenstein-Jensen [Acesso em 15 de julho de 2018]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/chapter4.pdf>>.
55. Collins DM. Advances in molecular diagnosis for *Mycobacterium bovis*. Vet Microb. 2011;151(1):2-7.
56. Soini H, Musser JM. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. Clin Chemistry. 2001;47(5):809-814.
57. Persing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. J Clin Microb. 1991;29(7):1281-1285.

58. Pandolfi JR, Malaspina AC, Santos A, Suffys PN, Oelmann M, Valentini SR, Leite CQF. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Rev Ciên Farm Básica e Aplicada*. 2007;28(3):251-257.
59. Bapat PR, Satav AS, Shekhawat SD, Manke SD, Husain AA, Nayak RA, Kashyap R. Diagnóstico molecular de infecção por *Mycobacterium bovis* zoonótica em Melghat, Índia. *J Zoon Diseases*. 2017;2(2):2-16.
60. Settanni L, Corsetti A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food-and beverage-associated microorganisms: A review. *J Microb Methods*. 2007;69(1):1-22.
61. Roselló-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *Fed European Microb Soc Microb Reviews*. 2001;25(1):39-67.
62. Neto JSF, Silveira GB, Rosa BM, Gonçalves VSP, Grisi-Filho JHH, Amaku M, Lage AP. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. *Sem Ciên Agrárias*. 2016;37(5):3385-3402.
63. Belchior APC. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco de tuberculose bovina em Minas Gerais [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.