

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em
bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso,
Brasil.**

Fernando Henrique Piovezan Salazar

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em
bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso,
Brasil.**

Fernando Henrique Piovezan Salazar

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Batista Guimarães

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal. Área de
Concentração: Saúde Animal**

S161o Salazar, Fernando Henrique Piovezan
Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil / Fernando Henrique Piovezan Salazar. -- Campo Grande, MS, 2005.

68 f. : il. col. ; 30 cm.

Orientador: Eurípedes Batista Guimarães.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1.Tuberculose em bovino. 2. *Mycobacterium bovis*. 3. *Mycobacterium paratuberculosis*. I. Guimarães, Eurípedes Batista. II. Título.

CDD (22) - 636.20896995

SUMÁRIO

ASSUNTO	“página”
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Definição de tuberculose bovina.....	01
1.2 Histórico.....	01
1.3 Aspectos socio-econômicos.....	05
1.4 Etiologia.....	07
1.5 Epidemiologia.....	10
1.6 Imunopatogenia.....	14
1.7 Patologia.....	19
1.8 Diagnóstico.....	22
1.8.1 Diagnóstico clínico.....	22
1.8.2 Diagnóstico <i>post mortem</i>	22
1.8.3 Diagnóstico histopatológico.....	23
1.8.4 Diagnóstico imunológico.....	24
1.8.5 Isolamento bacteriano.....	26
1.8.6 Diagnóstico molecular.....	28
1.9 Controle.....	29
1.9.1 Políticas atuais de combate à tuberculose bovina no Brasil.....	32
2 REFERÊNCIAS.....	35
3 ARTIGO: Ocorrência de tuberculose causada por <i>Mycobacterium bovis</i> em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	45
INTRODUÇÃO.....	46
MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	61
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

AMG	Coloração argênteo-metenamina de Gomori-Grocott
AN5	Amostra de <i>Mycobacterium bovis</i>
B-83	Meio de cultura à base de ágar
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
Bcg	Gen relacionado à resistência à tuberculose
BstE II	Enzima de restrição utilizada no PRA
CD8 ⁺	Co-receptor envolvido na restrição de MHC I e resposta imune Th2
CD4 ⁺	Co-receptor envolvido na restrição de MHC II e resposta imune Th1
CD1	Co-receptor envolvido na restrição de MHC <i>like proteins</i>
CISPOA	Coordenadoria de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal / INDEA
CPZ	<i>Centro Panamericano de Zoonosis</i>
DNA	Ácido desoxido-ribonucléico
DTH IV	Reação de hipersensibilidade tardia tipo IV
D4	Amostra de <i>Mycobacterium avium</i>
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FIA	Fator indutor de apoptose
GTA	Guia de trânsito animal
Hae III	Enzima de restrição utilizada no PRA
HE	Hematoxilina-eosina de Harris
HSP	Proteína do choque térmico ou do estresse
INDEA	Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso
INF- α	Quimiocina interferon alfa
INF- γ	Quimiocina interferon gama
IL	Quimiocina interleucina
INS1	Primer para complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
INS2	Primer para complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
IS6110	Gen do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
JB21	Primer espécie específico para <i>Mycobacterium bovis</i>
JB22	Primer espécie específico para <i>Mycobacterium bovis</i>
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MHC I	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe I
MHC II	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe II
MOTT	Complexo das micobactérias não causadoras de tuberculose
MTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Nramp1	Gen associado à resistência à tuberculose
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ONU	Organização das Nações Unidas
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNCEBT	Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	Derivado Protéico Purificado
PRA	Análise da PCR por enzimas de restrição
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

RNA	Ácido ribonucléico
RTc $\alpha\beta$	Receptor alfa beta de linfócito T que expressam CD4 ⁺ e CD8 ⁺
RTc $\gamma\delta$	Receptor gama delta de linfócito T atípico que expressam WC1 na apoptose
RTc DN	Receptor de linfócito T duplo negativo CD4 ⁻ e CD8 ⁻ que expressam CD1
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SISE	Serviço de Inspeção Sanitária Estadual
TACO	Molécula de triptofano aspartato contendo proteína
Tb11	Primer específico para gênero <i>Mycobacterium</i>
Tb12	Primer específico para gênero <i>Mycobacterium</i>
TCC	Teste de tuberculização cervical comparativa
TCS	Teste de tuberculização cervical simples
Tho	Linfócito T virgem
Th1	Perfil de resposta imune celular
Th2	Perfil de resposta imune humoral
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF β	Fator de necrose tumoral beta
TPC	Teste de tuberculização na prega caudal
VH ⁺ ATP	Bomba de próton dependente de adenosina trifosfato
WC1	Receptores envolvidos na restrição de MHC <i>like proteins</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
WTO	<i>World Trade Organization</i> – Organização Mundial do Comércio

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição de tuberculose bovina

A tuberculose bovina é uma entidade nosológica infecto-contagiosa de evolução crônica, e desenvolvimento de lesões granulomatosas características. O agente etiológico é o *Mycobacterium bovis*, que forma, junto a outras micobactérias, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* dos mamíferos acometendo especialmente o sistema respiratório dos hospedeiros infectados. O fato desta doença afetar além dos bovinos, diversas espécies animais, tanto domésticas como silvestres, a transforma em um importante problema, provocando prejuízos à pecuária bovina, suscitando risco à saúde pública face ao seu aspecto zoonótico (Grange & Yates, 1994; Acha & Szyfres, 2001; Collins, 2001).

1.2 Histórico

O *Mycobacterium bovis* já provocava, antes da ocupação humana, a tuberculose em animais das regiões que atualmente correspondem à Europa. No entanto, somente após o processo de domesticação dos bovídeos, ocorrido entre 8000-4000 a.C. é que surgem evidências arqueológicas de infecção humana por *M. bovis* através da observação de lesões tuberculosas em múmias de indivíduos que viveram durante o período neolítico, encontradas na Alemanha. A origem de tais lesões foi atribuída, provavelmente, à interação ambiental dos humanos com animais infectados e ao consumo de leite contaminado (Dormandy, 2002; Reichman & Tanne, 2003).

Na África, algumas múmias dos Faraós da dinastia Ramsés, que reinaram há três mil anos antes da era cristã no Egito antigo, apresentaram sinais compatíveis com a tuberculose óssea. Na sociedade antiga, Hipócrates definiu a tuberculose como uma doença natural denominando-a de tísica, do grego *phthisis*, ou seja, que traz consumpção, devido ao esgotamento físico, freqüentemente apresentado pelos indivíduos afetados. Posteriormente, Aristóteles também mencionou a ocorrência da doença na população grega, três séculos antes da era cristã. Na França e na Inglaterra, por volta do século XVI, pacientes com tuberculose ganglionar eram contemplados com o “toque real” pelos reis desses países, o que, muitas vezes era seguido de melhora dos sintomas, atribuindo-se tal efeito à assepsia do ambiente onde os doentes permaneciam aguardando o referido ritual. Também são antigos os relatos desta enfermidade em animais abatidos na comunidade judaica, ao ponto do *Talmud*, o livro

sagrado dos judeus, proibir o consumo das carcaças de animais que apresentassem lesões pulmonares, quando abatidos em matadouros ou submetidos ao sacrifício ritualístico sugerindo que os hebreus nos primórdios da era cristã, no século II, já conheciam as lesões presuntivas de tuberculose em ruminantes (Michalany, 1995; Corrêa & Corrêa, 1992; Dormandy, 2002).

Nos séculos XVII e XVIII, com o início da exploração anatômica dos pulmões de humanos, François de la Boe, identificou em pacientes mortos pela tísica, estruturas anormais que lembravam tubérculos, do latim *tuberculum* ou seja, nódulo, dando origem à terminologia *tuberculose*. No século XVIII, esta doença era conhecida por peste branca, citada brevemente por Giovanni Morgagni, pai da anatomia patológica, e descrita em detalhes por René Laennec (Dunlop & Willians, 1996; Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

Em 1751 o Rei Fernando VI da Espanha criou uma lei que obrigava os médicos a notificarem todos os casos de tuberculose, afastando-se os doentes da comunidade, queimando-se todos os pertences dos pacientes que vinham a falecer. A partir de meados do século XVIII a Revolução Industrial na Inglaterra promoveu, além do desenvolvimento, uma grande expansão da pobreza que, associada às condições sanitárias ruins, favoreciam a disseminação de enfermidades, entre elas a tuberculose, que acometia quase metade da população inglesa. Apesar de toda esta história, a compreensão da doença só ocorreu a partir de 1810, quando Carmichael, um cientista inglês, observou que havia relação entre tuberculose nodular ou escrófula, em crianças, e consumo de leite de vaca pelas mesmas. Na época ele concluiu equivocadamente que a doença era desencadeada por fatores nutricionais (Dunlop & Willians, 1996; Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

Entre 1865 e 1868, Jean Antoine Villemim demonstrou experimentalmente a transmissibilidade da tuberculose humana e de bovinos a coelhos e cobaias. Em 24 de março de 1882, Robert Koch, descobriu o agente infeccioso da tuberculose, corando-o pela fucsina-anilina e isolando-o em meio de cultura elaborado a partir de humor vítreo de bovinos de abatedouros, denominando-o, em 1884, *tuberkelbacillen* ou bacilo da tuberculose. Em 1885, Roentgen descobre o raio X, dando impulso aos estudos da enfermidade, método posteriormente desonerado no Brasil, quando Manoel de Abreu imprimiu as radiografias em filme de 35 milímetros, criando assim a abreugrafia (Grange & Yates, 1994; Michalany, 1995; Roxo, 1997).

Eufórico com sua descoberta, Koch tentou produzir uma vacina anti-tuberculose utilizando extrato glicérico de bacilos, ao qual denominou *old tuberculin*, ou tuberculina velha. Os resultados foram ineficazes, mas a tentativa não foi em vão, permitindo-lhe a descoberta do fenômeno alérgico em pessoas que haviam tido contato prévio com o bacilo.

Esta reação foi melhorada por Charles Mantoux em 1908, tornando-se universal (Grange & Yates, 1994; Michalany, 1995).

A vacina anti-tuberculose utilizada hodiernamente em humanos, foi desenvolvida entre 1908 e 1919 por dois cientistas franceses, Calmette e Guérin, a partir de cultura de *M. bovis* com virulência atenuada ou Bacilo de Calmette e Guérin (BCG). Naquela época, o tratamento preconizado para a tuberculose em humanos limitava-se ao isolamento do paciente associado ao repouso, ar livre e boa alimentação. Algumas vezes estas medidas eram reforçadas com a administração de quinino, Cálcio, creosoto, Enxofre, Ouro e Bismuto. Neste ínterim, havia a crença generalizada no meio científico, inclusive compartilhada por Koch, de que existia apenas um tipo de bacilo da tuberculose acometendo os humanos e os animais. Poucos se atreviam a discordar dessa idéia, tamanho o prestígio e credibilidade de Koch à época. Entre os que se opunham a este conceito, haviam celebridades coevas da medicina veterinária, a exemplo de Ravanel, M'Fadyean e Bang (Grange & Yates, 1994; Michalany, 1995; Roxo, 1997).

Em 1897, Theobald Smith, nos Estados Unidos da América (EUA), observando que o bacilo que acometia bovinos era menor, crescia mais lentamente *in vitro* e era menos sensível às modificações dos meios de cultura do que o bacilo que acometia humanos, levantou dúvidas sobre a teoria da existência de um único bacilo e descreveu a diferenciação entre os bacilos, denominado-os *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium* (Pritchard, 1988).

O século XIX foi, em função da tuberculose, de desalento para a sociedade contemporânea. A humanidade perdia precocemente seus ícones e cidadãos em geral. Como exemplo pode-se citar Frédéric Chopin, compositor clássico que, vitimado pela tuberculose, chegou a ser isolado em um monastério na ilha de Mallorca onde compôs uma de suas mais belas obras, *Prelúdios*. Por volta de 1900, tantas eram as dúvidas acerca da doença, afetando tanto os humanos quanto os animais, principalmente com relação ao possível aspecto zoonótico da tuberculose bovina, que o governo inglês decidiu nomear uma comissão para estudar o assunto (Pritchard, 1988; Dormandy, 2002).

Foi então criada a *Royal Commission on Tuberculosis*, que, ao invés de limitar-se às opiniões de especialistas, resolveu desenvolver um extenso programa de pesquisa, visando a geração de conhecimentos que esclarecessem definitivamente as dúvidas sobre a tuberculose em bovinos e sua relação com a doença em humanos. Essa Comissão trabalhou de 1901 a 1911, dispondo de um laboratório e uma fazenda experimental, e chegou à conclusão de que bovinos tuberculosos representavam risco para a saúde pública e que algo deveria ser feito,

pois a ocorrência da doença nesses animais era em número alarmante (Pritchard, 1988; Corrêa & Corrêa, 1992).

A patogênese da enfermidade era ainda confusa, quando em 1917, Karl Ranke comparou o seu desenvolvimento com o da sífilis, determinando três períodos distintos, isto é, infecção primária, disseminação e lesão orgânica isolada. Posteriormente essa última forma, passou a ser denominada como tuberculose primária, a partir da qual poderia ocorrer evolução para tuberculose de reativação endógena ou de reinfecção exógena (Pritchard, 1988; Grange & Yates, 1994).

Entre o fim do século XIX e início do século XX, a tuberculose acometia entre 20 e 40% dos bovinos de muitos países da Europa. A partir de então ficaram patentes os problemas sociais e econômicos decorrentes da doença e os países desenvolvidos iniciaram a implantação de programas para controle e erradicação. Após várias décadas, muitos países europeus, da Oceania e da América do Norte, alcançaram boa parte de seus objetivos, apresentando atualmente baixíssimas taxas de incidência e prevalência da tuberculose bovina (Corrêa & Corrêa, 1992; Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

No Brasil em 1938, Torres e Pacheco isolaram o *Mycobacterium bovis* de lesões humanas, tratando-se da primeira publicação na literatura médica nacional sobre o assunto (Souza et al., 1999).

Até 1970 o bacilo da tuberculose bovina era considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. A proposta para sua classificação como espécie individual denominada *Mycobacterium bovis* foi feita por Karlson e Lessel em 1970 (Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

Quanto ao tratamento, até 1940 as pessoas tuberculosas eram tratadas como nos tempos passados, existindo informações inclusive da utilização de intervenções cirúrgicas, como no caso de ressecção do pulmão comprometido e de indução de pneumotórax com fins terapêuticos. Só em meados do século XX houve o incremento terapêutico através da utilização da estreptomicina, da rifampicina, e da isoniazida, esta última descrita em 1912, a qual, em 1945 teve sua eficácia comprovada em laboratório, atuando sobre os ácidos micólicos da parede celular das micobactérias. A partir da década de 1960, até os dias atuais, foi preconizado o tratamento de humanos tuberculosos por meio da utilização de um coquetel com os antibióticos acima mencionados (Corrêa & Corrêa, 1992).

No âmbito pecuário, a terapêutica ainda é discutível, pois a legislação sanitária da maioria dos países que alcançaram bons níveis de controle, não a preconizam, em contrapartida existem pesquisas indicando tratamento para bovinos em doses diárias e

intervaladas utilizando principalmente a isoniazida (Langenegger et al., 1991; Corrêa & Corrêa, 1992; Mota et al., 2004).

Hodiernamente a recrudescência da tuberculose a configura como doença infecciosa humana que mais mata em todo o mundo, sobretudo em países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina, os quais possuem respectivamente 94%, 82% e 60% de suas populações humanas em áreas rurais correndo potencial risco de contrair a tuberculose zoonótica. Deve-se considerar também o irrefutável aspecto de enfermidade ocupacional, quando trabalhadores envolvidos na cadeia produtiva da carne e do leite são expostos ao risco de contrair a infecção. Além destes fatores, também são consideráveis os prejuízos à bovinocultura, justificando a aplicação de medidas emergenciais de controle da enfermidade, preconizadas desde 1911 (Cosive et al., 1998).

1.3 Aspectos socio-econômicos

Estimava-se que até o final do século XX esta zoonose estaria erradicada dos países desenvolvidos, mas não foi o que ocorreu, inclusive ocorrendo como doença reemergente, principalmente por fatores tais como, advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), o surgimento de cepas de micobactérias multiresistentes aos coquetéis de antibióticos, e especialmente, nos países em desenvolvimento, as condições de vida precárias das populações (Cosive et al., 1998; Reichman & Tanne, 2003).

Nos países desenvolvidos, os programas de controle e erradicação da tuberculose bovina basearam-se no emprego de vários métodos tais como, o sacrifício de animais diagnosticados como positivos, a investigação epidemiológica retrospectiva a partir do monitoramento de carcaças de animais com lesões presuntivas de tuberculose em matadouros-frigoríficos, associados à implantação de um eficiente processo de pasteurização do leite, reduzindo drasticamente a incidência da doença causada por *M. bovis* em bovídeos e humanos. Apesar do principal agente etiológico da tuberculose humana ser o *Mycobacterium tuberculosis*, em torno de 5 a 10% das infecções em humanos são decorrentes da infecção por *M. bovis*. Ambos microrganismos produzem doença indistinguível clínica, radiológica e patologicamente (Wedlock et al., 2002).

Já em 1993, organismos da Organização das Nações Unidas (ONU), como no caso da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*-WHO), e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agricultural Organization*-FAO) declaravam a tuberculose como emergência mundial, e promoveram, em conjunto com a Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health*-OIE), pesquisas objetivando o desenvolvimento de vacinas para animais e humanos mais eficientes

que a BCG. No mundo, atualmente são estimados cerca de três milhões de óbitos anuais, causados por tuberculose em humanos. Este número é maior que o total de mortes causadas pela AIDS, malária e outras doenças tropicais (WHO, 1994; Cosive et al., 1998; Kaufmann, 2001).

Há estimativa de que um terço da população humana esteja infectada com o bacilo da tuberculose. Entretanto isto não se efetiva em um problema de alta gravidade já que, apenas 10% das pessoas imunocompetentes, infectadas com *Mycobacterium* desenvolvem a doença. Os 90% restantes, não adoecem e dificilmente transmitem a tuberculose (Kaufmann, 2001).

Ainda concernente ao aspecto zoonótico da doença, sua importância no âmbito da saúde pública, e a presença desta enfermidade em rebanhos bovinos traduz-se em risco iminente à saúde humana, seja na forma de doença ocupacional, ou através do consumo de produtos de origem animal contaminados com o bacilo, sobretudo leite e derivados lácteos consumidos *in natura*. Estima-se que 90% do leite produzido nos países africanos, da região abaixo do Deserto do Saara, é consumido *in natura* ou em forma de coalhada. Aliás, o emprego do processo de pasteurização de leite ainda é uma realidade distante em muitos países em desenvolvimento. À carne bovina não pode, a rigor, ser imputada como via de transmissão da tuberculose, pelo menos em países onde ela é consumida após cocção e, além do mais é muito raro o encontro do bacilo na musculatura. A inspeção sanitária em matadouros-frigoríficos, por prudência, faz a condenação parcial ou total de carcaças de animais portadoras de lesões presuntivas de tuberculose, constituindo-se um excelente instrumento de vigilância da doença, amparado legalmente (Corrêa & Corrêa, 1992; Cosive, 1998; Abrahão, 1999).

Os prejuízos na cadeia produtiva da carne e do leite, em função da tuberculose, estimados entre 10 e 25%, estão vinculados às perdas diretas resultantes da morte de animais, à redução gradativa dos índices zootécnicos e às condenações de carcaças em matadouros-frigoríficos sob inspeção sanitária. Além disso, a presença da enfermidade nos rebanhos torna o produto, resultante da pecuária, vulnerável a barreiras sanitárias, impostas pelo mercado internacional. Destarte, diminui-se a credibilidade e competitividade dos produtos, pois se trata de uma zoonose que integra a lista da OIE. Devido a estes fatores, os prejuízos na pecuária mundial, em função da tuberculose, são de aproximadamente três bilhões de dólares por ano (Lage et al., 1998; Garnier et al., 2003).

As exigências crescentes no que diz respeito à segurança alimentar, faz com que a inspeção sanitária de produtos de origem animal situe na vanguarda da vigilância sanitária visando a proteção da saúde dos consumidores. Por isso a globalização da economia tem implementado o rigor da inspeção de alimentos em respeito ao mercado interno, mas

principalmente em atendimento a mercados externos, extremamente exigentes no que tange à qualidade sanitária dos produtos por eles importados. Tais exigências são amparadas por organismos internacionais, como por exemplo, a Organização Mundial do Comércio (*World Trade Organization-WTO*). Este comportamento dos mercados motivou os países exportadores a revisarem suas políticas de segurança alimentar e adotarem as normas do *Codex Alimentarius*, criado em 1963, como base técnico-científica para garantir que os alimentos consumidos pela população tenham condições sanitárias e higiênicas apropriadas. A situação de segurança e inocuidade alimentar no mundo foi amplamente discutida na 53ª Assembléia da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization-WHO*) em maio de 2000. A partir dessa discussão foi emitida uma resolução, estabelecendo que a segurança e inocuidade alimentar são prioridades globais, recomendando aos Estados Membros, entre eles o Brasil, que revisem suas políticas de saúde pública (WHO, 2005).

Apesar do Brasil deter o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 195 milhões de cabeças, distribuídas em quase 2,5 milhões de propriedades rurais; de haver mais de 4.500 estabelecimentos com inspeção industrial e sanitária em nível federal e de configurar-se como o principal país exportador de carne bovina *in natura*, há ainda o paradoxo do abate clandestino responsável pela metade do total de bovinos abatidos no País, para consumo no mercado interno. Não obstante, quase metade da produção brasileira de leite não recebe um processamento adequado antes de ser fornecido para a população (Alves, 2001; Pardo et al., 2001; Brasil, 2002; Leite et al. 2003).

1.4 Etiologia

A tuberculose bovina tem como agente etiológico a espécie *Mycobacterium bovis*, uma bactéria pertencente à ordem *Actinomycetales*, e à família *Mycobacteriaceae*, descrito por Robert Koch em 1882. É uma das espécies causadoras da tuberculose em mamíferos, que constituem um grupo de cinco micobactérias filogeneticamente relacionadas, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* de mamíferos (MTB), a saber: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e o *M. canettii* (Grange & Yates, 1994; Biet et al., 2005).

Outro grupo de micobactérias genotipicamente diferentes das constituintes do complexo MTB, formam o complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), o qual inclui duas espécies (*M. avium* e *M. intracellulare*). O *M. avium* é subdividido em quatro subespécies (ssp.): ssp. *avium*, ssp. *paratuberculosis*, ssp. *silvaticum* e recentemente ssp. *hominissuis*. São bactérias que, em bovinos, provocam reação cruzada nos testes de hipersensibilidade a derivados proteicos purificados (Dvorska et al., 2004).

M. avium spp *avium* é o agente da tuberculose em várias espécies de aves e associado aos quadros de linfadenites granulomatosas em suínos. *M. avium* spp *paratuberculosis* é causador da doença de Johne em ruminantes e foi encontrado em tecido de humanos com doença de Crohn (Dvorska et al., 2004; Biet et al., 2005).

Micobactérias saprófitas ou “atípicas”, com potencial patogênico, têm sido identificadas como causadoras de doenças, que não a tuberculose, em animais e no homem. Estas fazem parte do complexo micobactérias outras que não as causadoras de tuberculose (*mycobacteria other than tubercle*-MOTT) incluindo-se entre elas, o *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. smegmatis* e *M. chelonae*, causadoras de infecções e quadros mórbidos, denominados genericamente de micobacterioses (Thoen et al., 1981; Lage et al., 1998).

As micobactérias ainda podem ser agrupadas quanto à patogenicidade em complexos com espécies clássicas (patogênicas) e atípicas (não patogênicas). As espécies clássicas são reconhecidas como causas de doenças em seres humanos e animais e constituem-se dos bacilos *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. paratuberculosis*, *M. leprae*. As demais espécies são classificadas como atípicas, não causadoras de doenças (Blood & Radostits, 1989).

Existem mais de 70 espécies no gênero *Mycobacterium*, classificadas sob diversos critérios. O diagnóstico “padrão-ouro”, no caso de *M. bovis* é o isolamento definitivo da bactéria, sendo obtido por meio de cultivo. A importância de classificar a micobactéria envolvida na infecção é de cunho epidemiológico, profilático e para a saúde pública. A análise química de diferentes grupos funcionais de ácidos micólicos tipo I, II, III, IV, V e VI, presentes na parede das micobactérias é uma forma de classificação, e possibilita a identificação da espécie envolvida, uma vez que a composição dos grupos moleculares é específica. O complexo MTB, do qual o *Mycobacterium bovis* faz parte, apresenta em sua parede celular os grupos I, III e IV de ácidos micólicos. Esse método tem sido utilizado no Brasil como uma técnica de rotina para a identificação de micobactérias desde 1992 (Leite et al., 1998).

Morfológicamente os bacilos da espécie *M. bovis* são curtos, intracelulares facultativos, aeróbicos, imóveis, não esporulados, não flagelados, não capsulados e não produtores de toxinas. Têm como propriedade tintorial característica, a álcool-ácido resistência, em função da capacidade de formar complexos com os derivados de trifenilmetano, resistindo à ação do álcool-ácido. Apresenta-se em formato de bastonete reto, encurvado ou ainda ramificado, medindo de 0,3 a 0,6 micrômetros (µm) por 1 a 4 µm. Contudo são propriedades que também estão associadas a outros gêneros tais como *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* (CPZ, 1988; Corner, 1994; Lage et al., 1998).

Também são características peculiares ao *M. bovis* um período de geração longo, demandando de 16 a 20 horas, dependendo da oferta de Oxigênio e de nutrientes. Possui estreita relação filogenética com o *Mycobacterium tuberculosis*, cujos genomas, ambos descritos por completo, apresentam mais de 99,95% de similaridade. Esta última espécie de micobactéria, possui quase 250 genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (Kaufmann, 2001; Garnier et al., 2003).

Os mecanismos imunopatogênicos da infecção por *M. bovis* estão diretamente relacionados à composição da parede celular do bacilo. Esta é complexa, e possui alta concentração de lipídeos, correspondendo a cerca de 20 a 40 % do peso seco do bacilo, conferindo-lhe resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos desinfetantes ácidos e alcalis. Esta característica torna sua parede celular hidrofóbica e impermeável a corantes aquosos, quando não submetidos ao aquecimento (Pollock & Neill, 2002).

A parede celular das micobactérias é formada seqüencialmente, da parte interna adjacente ao citosol, para o meio externo, pela membrana citoplasmática, seguida de uma camada intermediária de peptideoglicanos, como por exemplo, o glucolil-murâmico, ligados ao açúcar arabinogalactano e estes ao ácido micólico correspondente à porção externa da parede bacteriana, denominada complexo micolilarabinogalactano. Esse complexo atua como uma camada de cera, que impermeabiliza a superfície da micobactéria tornando-a altamente resistente aos compostos hidrofílicos e à dessecação, além de dificultar a captação de nutrientes retardando o seu crescimento (Collins, 1994; Lage et al., 1998; Neill et al., 2001).

Os principais grupos de lipídeos livres presentes na parede celular das micobactérias são os ácidos micólicos, responsáveis pela característica álcool-ácido resistência. Tal propriedade é observada em métodos de coloração a exemplo do Kinyoun e do Ziehl-Neelsen e suas modificações por Faraco e Wade (Behmer et al., 1976).

Já os glicolipídeos ou micosídeos do complexo micolilarabinogalactano, como a lipoarabinomana, são responsáveis pela toxicidade, pelo estímulo à resposta inflamatória granulomatosa e pela resistência das micobactérias fagocitadas, além de atuarem na permeabilidade celular e resistência a substâncias desinfetantes. O fator corda ou dimicolato de trealose, é responsável pela característica de crescimento colonial das micobactérias virulentas, e os sulfolipídeos de trealose que estão localizados na periferia da parede celular, também atuam como fatores de virulência. Todos lipídeos da parede celular acima mencionados corroboram com a resistência do bacilo à ação enzimática dos macrófagos, atuando na inibição da fusão do fagossomo com o lisossomo, o que explica parcialmente o fato de que estes microrganismos tenham êxito no meio intracelular. Além disso, existem

outros mecanismos bioquímicos e moleculares que atuam inibindo a fusão dos fagossomos aos lisossomos no interior dos macrófagos (Collins, 1994; Pollock & Neill, 2002).

No aspecto de resistência e sensibilidade, as micobactérias patogênicas apresentam, em função principalmente à constituição da sua parede celular rica em lipídeos, resistência a vários agentes físicos e químicos. As espécies causadoras de tuberculose mantêm sua viabilidade em condições de umidade, temperatura e ao abrigo da luz solar, nos estábulos e aviários por quatro anos, em pastos por dois anos e em matéria orgânica em estado de putrefação por períodos de seis meses até quatro anos, na água por até um ano, e em produtos de origem animal por até dez meses. Resistem bem às baixas temperaturas e ao pH ácido, contudo são sensíveis à luz solar direta por ação dos raios ultravioleta, e agentes desinfetantes como fenóis a 5% por três horas, formol a 3%, e hipoclorito de Sódio a 5%. No entanto, as ações dos desinfetantes podem ser afetadas pela concentração dos produtos, tempo de exposição, temperatura e presença de matéria orgânica. Compostos de amônio quaternário e clohexidine não destroem o bacilo (Carter, 1988; Morris et al., 1994).

As micobactérias são pouco resistentes ao calor, morrendo pelo aquecimento até a fervura em poucos minutos. A pasteurização, consistindo no tratamento do leite a 62,8-65,6°C por 30 min ou 71,7°C por 15 segundos, mata além das micobactérias, a maioria dos microrganismos não esporulados (Roxo, 1997).

1.5 Epidemiologia

A tuberculose foi perpetuada através dos milênios, principalmente por três hospedeiros, o bovino, o homem e as aves, que contribuíram para a manutenção do *Mycobacterium* na natureza. *Mycobacterium bovis* possui um elevado grau de virulência tanto para os animais quanto para o homem, em contraste com o agente da tuberculose humana, *Mycobacterium tuberculosis*, o qual é virulento para o homem, e é menos patogênico para o bovino que, quando infectado por essa micobactéria, pode desenvolver doença de caráter auto-limitante, não sendo observada transmissão entre bovinos ou de bovinos para humanos. A infecção de bovinos por *Mycobacterium avium* não é freqüente, podendo desenvolver lesões ao nível de linfonodos, que raramente generalizam, no entanto, como as demais micobactérias do complexo MAC, provocam sensibilizações alérgicas inespecíficas, interferindo no diagnóstico da tuberculose bovina (O'Reilly & Daborn, 1995; Moda et al., 1996; Lage et al., 1998).

M. bovis é um patógeno ubiqüitário, e tem um abrangente leque de hospedeiros, tornando seu modelo epidemiológico de transmissão um dos mais complexos dentre os microrganismos patogênicos. Apesar de muitas espécies serem suscetíveis a este bacilo,

poucas atuam como hospedeiros mantenedores da infecção, conseguindo transferi-la efetivamente para outras espécies, a exemplo dos bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus*, no mundo inteiro, búfalos *Bubalus bubalis* especialmente na Austrália e *Syncerus caffer* na África equatorial, o bisão *Bison bison* na América do Norte, e os cervos *Odocoileus virginianus* e *Cervus elaphus* na Nova Zelândia e América do Norte. O marsupial *Trichosurus vulpecula* na Nova Zelândia e o furão *Meles meles* no Reino Unido e Irlanda mantêm a infecção dentro de suas populações através da transmissão pseudo-vertical entre mãe e filhote, e horizontal durante o acasalamento, entretanto a interação atípica destas duas últimas espécies de animais silvestres dão especial importância na translação do *M. bovis*, ou seja, a sua passagem de uma espécie à outra (Morris et al., 1994; Waters et al., 2003).

Os hospedeiros disseminadores domésticos e silvestres, *spillover hosts*, compõem uma vasta lista, como os pequenos ruminantes, equídeos, felídeos, canídeos e suídeos, que se infectam após um desafio de exposição ao *M. bovis*, mas na ausência de infecção adquirida continuamente de um hospedeiro mantenedor, não mantêm a infecção dentro da espécie. O homem também pertence a esta categoria. O Quadro 1 demonstra a ocorrência das principais micobactérias no homem e em alguns animais domésticos (Morris et al., 1994).

Quadro 1. Ocorrência de tuberculose e frequência das principais micobactérias em humanos e em alguns animais domésticos.

ESPÉCIE	OCORRÊNCIA	<i>M. bovis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>
Humanos	Comum	++	+++	+
Bovinos	Comum	+++	+	++
Suínos	Comum	+++	++	+++
Ovinos	Rara	+++	-	++
Caprinos	Rara	+++	-	++
Cães	Rara	++	+++	+
Gatos	Rara	+++	++	+
Equinos	Rara	+++	+	+

(+++) = agente mais comum; (++) = agente menos comum; (+) = agente raro; (-) = agente não observado.

Fonte: Corrêa & Corrêa, 1992.

No aspecto de resistência natural à infecção por *M. bovis*, estudos em murídeos demonstram haver uma relação com a expressão dos genes *Bcg* e o *Nramp1*, e resistência à infecção. Em bovídeos a quantidade elevada de linfócitos T γ/δ circulantes também sugere uma resistência maior destes animais, particularmente nas raças da espécie *Bos indicus*, porém todos estes fatores citados ainda requerem investigações pormenorizadas (Pollock & Neill, 2002).

A fonte de infecção do *M. bovis* em um rebanho pode consistir, principalmente, na presença de animais infectados, que podem propagar o bacilo para outros animais suscetíveis. Em países onde não há efetivas medidas de controle e erradicação a taxa de morbidade em bovídeos situa-se em torno de 8 a 10%, e a letalidade natural pode chegar a 50%, se a enfermidade for levada a termo, uma vez que os animais de corte vão cedo para o abate, não oportunizando o desenvolvimento do quadro crônico da tuberculose. O animal infectado transmite a doença principalmente por via aerógena, e em menor proporção através da contaminação ambiental, da água, pastagens, utensílios e cochos, com fezes, urina, catarro, secreções uterovaginais, leite e produtos de abscedações de linfonodos (Corrêa & Corrêa, 1992; Morris et al., 1994).

A via de transmissão pode ser determinada pela localização da lesão no foco primário e nos gânglios linfáticos regionais. Alguns resultados de infecções experimentais, simultaneamente por via aerógena e alimentar, evidenciam que 80 a 90% dos indivíduos são infectados por via aerógena, através da inalação de aerossóis contaminados com o bacilo. Em animais adultos, pode-se encontrar uma predominância de lesões em gânglios brônquicos e/ou mediastínicos. Igualmente em bezerros, a via aerógena constitui a via de maior importância (Neill et al., 1994).

Ocasionalmente, um grupo saudável de bezerros pode ser infectado pela ingestão de leite contaminado pelo *M. bovis* proveniente de vacas com mastite tuberculosa, presente em torno de 1% das vacas infectadas. Não obstante, esta é também a principal forma de transmissão da tuberculose dos bovinos para humanos. Outras vias de transmissão menos usuais têm sido relatadas, tais como, a infecção cutânea que requer contaminação de uma lesão primária pelo bacilo da tuberculose e o uso de soluções destinadas ao tratamento de mastites contaminadas por *M. bovis*, podendo infectar a glândula mamária, resultando em transmissão iatrogênica. Também são de pouca importância a transmissão transplacentária, considerada rara nos bovinos, e a via intra-uterina e através do coito, por sêmen contaminado (Morris et al., 1994; Neill et al., 1994).

Um exemplo de que os bovinos tuberculosos são a principal fonte de bacilos, para a manutenção da infecção em um rebanho, foi observado no Texas, onde ocorre a maior incidência de tuberculose bovina nos EUA, quando um estudo de ecossistema envolvendo doze rebanhos bovinos tuberculosos e dois não afetados pela doença revelou que todas as 670 amostras coletadas dos mamíferos outros que não os bovinos, aves e do meio ambiente, como solo, água e ar, relacionados ao ambiente dos quatorze rebanhos, foram negativas na prova de cultivo quanto a presença de *M. bovis*. O mesmo ocorreu com 119 amostras de urina, provenientes dos trabalhadores envolvidos com os rebanhos bovinos acima mencionados.

Esses resultados indicaram que os reservatórios, outros que não os bovinos, não foram fatores determinantes na transmissão da tuberculose (Pillai et al., 2000).

A eliminação do *M. bovis* pelo bovino infectado pode ocorrer através da respiração, secreções e excreções, constituindo-se o próprio bovino na fonte de infecção, mesmo antes do animal tuberculoso desenvolver lesões teciduais. Animais hospedeiros disseminadores infectam-se mais facilmente por outras vias que não a respiratória, por exemplo a via oral. Quanto a via transplacentária, apesar de aproximadamente 5% das vacas infectadas apresentarem tuberculose ao nível uterino, apenas 1% dos bezerros provenientes de vacas tuberculosas são infectados por via congênita, quando se observa um quadro grave de metrite tuberculosa (Morris et al., 1994; Neill et al., 1994; Menzies & Neill, 2000).

Deve-se ressaltar que a tuberculose é caracteristicamente uma doença que afeta rebanhos leiteiros, principalmente animais estabulados. Quanto aos rebanhos de corte infectados, criados extensivamente, há maior dificuldade na transmissão do bacilo. Tal observação pôde ser confirmada pela baixa incidência da doença em novilhas sadias colocadas em pastagens, juntamente com vacas comprovadamente infectadas, o que não ocorre quando as mesmas são estabuladas com vacas tuberculosas. O conhecimento de tais características epidemiológicas é essencial à inspeção sanitária, principalmente em estabelecimentos que realizam o abate de vacas leiteiras de descarte (Morris et al., 1994; Menzies & Neill, 2000).

A tuberculose bovina possui distribuição mundial mas, nos países industrializados, encontra-se em fase avançada de controle ou erradicação. Sua ocorrência concentra-se principalmente em países em desenvolvimento e em criações intensivas, como na bovinocultura leiteira (Cosive et al., 1998).

Na África, vinte e cinco países informam que a ocorrência da tuberculose bovina é baixa ou esporádica, seis informam que a doença é enzoótica e dois descrevem que têm alta ocorrência da doença, e 85% da população bovina do continente está em áreas onde se controla parcialmente ou não há controle nenhum da enfermidade. Na Ásia, dezesseis países reportam a tuberculose bovina como esporádica ou de baixa ocorrência; um País, Barein, a informa como enzoótica; dez países não informaram sobre a doença e nove nações não possuem dados da doença; 94% da população bovina e 99% da bubalina asiáticas estão em regiões onde a tuberculose bovina tem controle parcial ou não tem controle algum. Entre os países da América Latina e Caribe, doze informam a tuberculose bovina como esporádica ou de baixa ocorrência, entre eles o Brasil. Sete a reportam como enzoótica e um País, a República Dominicana, a reporta como de alta ocorrência. Doze países não informaram sobre a ocorrência e em dois países não há dados sobre a doença. Nesta região americana, 24% do

rebanho bovino se encontra em áreas onde a tuberculose bovina é parcialmente controlada ou não recebe qualquer tipo de controle (Cosive et al., 1998).

1.6 Imunopatogenia

A inalação do bacilo, pelo animal suscetível, através de perdigoto contendo gotículas, expiradas pelo animal infectado, responde por cerca de 90% das infecções. Neste caso as partículas mais pesadas vão ao chão sendo menos infectantes, e as mais leves são inaladas e conseguem atingir os bronquíolos dos animais suscetíveis, onde libera o núcleo seco, com menos de 5µm de diâmetro, contendo poucos bacilos. Os núcleos maiores são eliminados do organismo por mecanismos de defesa inespecífica do trato respiratório, enquanto os menores podem estabelecer o foco de infecção da tuberculose ocorrendo a interação entre as células de defesa do hospedeiro com o patógeno (Pollock & Neill, 2002).

Ainda quanto ao contágio, raramente ocorre de forma vertical. A forma horizontal por ingestão também é pouco freqüente, como por exemplo em bezerros lactantes, porque em torno de 1% das vacas tuberculosas desenvolvem a mastite tuberculosa por *Mycobacterium bovis*. Por outro lado, esta última forma de contágio, assume relevância no aspecto zoonótico, por ser a ingestão de leite cru a principal via de transmissão da tuberculose para os humanos (Morris et al., 1994; Menzies & Neill, 2000).

Fatores ambientais como a ventilação, e também a luz solar através dos raios ultravioleta, podem interferir no processo de transmissão do *M. bovis*, o primeiro, dificultando o acesso ao hospedeiro e o segundo destruindo o bacilo (Morris et al., 1994; Neill et al., 1994 ; Neill et al., 2001).

A imunopatogenia da tuberculose bovina, analisando a via de infecção mais comum que ocorre de forma inalatória, pode ter seu desenvolvimento a partir da entrada de *Mycobacterium bovis* no organismo do hospedeiro, determinado por três fatores: o *primeiro* fator é a carga infectante, que ainda necessita de pesquisas, pois experimentalmente já se produziu iatrogenicamente a doença com menos de seis bacilos introduzidos no trato respiratório em bovinos, e em ovinos de um a cinco bacilos introduzidos via aerossóis produziram lesão pulmonar, ao passo que treze milhões de bacilos introduzidos via oral não conseguiram produzir lesão em ovinos. Todavia, estudos concernentes à dose infectante ainda necessitam de comprovações em bovinos, pois a maioria dos dados refletem experiências em pequenos animais e humanos; o *segundo* é a virulência do bacilo, que se refere à capacidade do microrganismo causar infecção em determinado hospedeiro; o *terceiro* é a resistência ou imunidade natural do hospedeiro, aliada aos mecanismos de proteção das vias aéreas através das barreiras inespecíficas, além da imunidade adquirida. Esta última,

pode ocorrer com perfil humoral ou celular, quando houver contato com alguma partícula ou ser estranhos ao organismo, envolvendo leucócitos, como os macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e linfócitos B, que interagem por meio de receptores ou por secreção de quimiocinas (Morris et al., 1994; Neill et al., 1994; Lage et al., 1998).

A resposta imune humoral ocorre quando os linfócitos T *helper* virgens (Tho) modulam-se em linfócitos T helper 2 (Th2) expressando co-receptores CD8⁺, sensibilizados por quimiocinas tipo Interleucinas (IL) 4, 5, 6 e 10. Destarte, os linfócitos B (LyB) são acionados e modulam-se em plasmócitos produzindo anticorpos, os quais não são capazes de atacar o *M. bovis*, devido à sua localização intracelular, no fagossomo, caracterizando-se no caso da tuberculose, uma resposta ineficiente. Este perfil de resposta favorece a instalação do quadro nosológico de anergia num estágio terminal, onde não há resposta citomediada, mas ocorrem altos níveis de anticorpos circulantes. Este quadro, apesar de não totalmente esclarecido, ocorre possivelmente mediado por quimiocinas tipo Interleucina-10 (IL10) e ausência de Interferon- γ (IFN- γ) (Neill et al., 2001; Pollock & Neill, 2002).

A produção de anticorpos também pode contribuir para a patogênese da tuberculose, formando complexos antígeno-anticorpo, os quais, ao ativarem o sistema complemento, podem causar lesão tecidual ou inibir o acesso de macrófagos ao sítio inflamatório, prejudicando a eliminação do *M. bovis* (Neill et al., 2001; Pollock & Neill, 2002; Hope et al., 2004).

A resposta imune mediada por células ocorre quando macrófagos e células dendríticas ou células de Langerhans fagocitam e processam o *M. bovis* e apresentam os antígenos para os linfócitos modulados em T helper 1 (Th1), que expressam co-receptores CD4⁺, e liberam quimiocinas tipo Interleucina 12 (IL12), Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- α e β (TNF- α e TNF- β) que estimulam o recrutamento de outros macrófagos, linfócitos e fibroblastos. Este processo ocorre entre duas e dez semanas após o contato com o *M. bovis*, e é a resposta mais eficiente contra o bacilo. A consistência na modulação dos linfócitos T *helper* virgens (Tho) em Th1 ou Th2 é peculiar em cada animal, sendo constatado no sangue periférico de bovídeos tuberculosos as quimiocinas IFN- γ de perfil Th1, e IL4 de perfil Th2, demonstrando que ambas as respostas ocorrem concomitantemente em bovídeos infectados por *M. bovis* (Neill et al., 2001; Pollock et al., 2001).

Um exemplo consistente da dualidade e concomitância nas respostas Th1 e Th2 ocorre com as células dendríticas, que compõem um sistema especializado na apresentação de antígenos aos linfócitos T, localizando-se principalmente nos tecidos cutâneo, traqueal e intestinal, locais de onde após a fagocitose do antígeno, migram via vasos linfáticos aferentes

aos linfonodos regionais, podendo sinalizar resposta Th1 e Th2 simultaneamente, devido sua capacidade em produzir quimiocinas tipo IL12 de perfil Th1 e quimiocinas INF- α e IL10 de perfil Th2. O efeito imunopatogênico desta condição é que as células dendríticas cessam apenas a multiplicação de *M. bovis* no seu fagossomo, não digerindo os bacilos, e funcionando como uma célula reservatório da micobactéria, um mecanismo que ainda merece investigações, pois macrófagos que fagocitam micobactérias, quando estimulados por IFN- γ e TNF- α , tornam-se ativados, iniciando processos bioquímicos que aniquilam os bacilos localizadas nos fagolisossomos (Kaufmann, 2001; Hope et al., 2004).

Muitos patógenos são destruídos quando fagocitados pelos macrófagos, o que não ocorre com o *Mycobacterium bovis*, ocorrendo inclusive a multiplicação bacteriana intracelularmente dentro dos fagossomos. O encontro de *M. bovis* com o macrófago é mediado por quimiocinas do sítio inflamatório, e a aderência é facilitada por moléculas de colesterol da superfície do macrófago. Após vários receptores de superfície (receptor de complemento, de manose, de imunoglobulina e de colesterol) atuarem no processo de aderência ao macrófago e na fagocitose, o bacilo alcança o meio intracelular, com o auxílio das opsoninas bacterianas e também de um glicolípido de superfície do microrganismo que facilita a fagocitose pelo macrófago, a lipoarabinomana (Kaufmann, 2001; Pollock et al., 2001).

Destarte, no fagossomo, o *M. bovis* consegue executar vários processos a fim de postergar a fusão fagossomo-lisossomo, entre eles destaca-se a retenção da molécula denominada *tryptophane-aspartate-containing coat protein* (TACO) e o sequestro de íons Ferro, por moléculas especializadas em sua captação como o receptor de transferrina, pois tal íon é essencial para a sobrevivência intracelular do bacilo. Estes processos também são corroborados pela inibição da acidificação fagossomal, com o impedimento da bomba de próton dependente de adenosina trifosfato vacuolar (V-H⁺ ATPase) transportar íons Hidrogênio para o meio intrafagossomal (Kaufmann, 2001; Pollock et al., 2001).

Além de todos estes mecanismos, o *M. bovis* consegue reduzir sua atividade metabólica na falta de nutrientes e Oxigênio, podendo persistir no hospedeiro sem produzir enfermidade, em estado de latência, utilizando a via do glioxilato para obtenção de energia. Mesmo com todos estes artifícios bioquímicos e moleculares do bacilo, os macrófagos conseguem desenvolver a maturação de alguns fagolisossomos, digerindo e expressando antígenos peptídicos, glicolipídicos e lipoprotéicos do *M. bovis*, tornando-se células apresentadoras de antígenos ativadas, mediante estimulação por IFN- γ (Kaufmann, 2001; Alberts et al., 2004).

Estes macrófagos ativados destroem os bacilos no interior dos fagolisossomos e terão a capacidade de fagocitar e destruir os *M. bovis* liberados dos macrófagos infectados mortos por ação dos linfócitos *Natural Killer* (NK) e linfócitos citotóxicos, mecanismo que será mencionado adiante em: apoptose de células infectadas. Não obstante, a ativação dos macrófagos é a efetiva reação do organismo hospedeiro para destruir o bacilo. Assim, observa-se uma complexa resposta imunológica, onde ocorre um balanço dinâmico entre a persistência do *M. bovis* e os mecanismos de defesa do animal infectado (Wedlock et al., 2002; Wickoff III, 2002).

Concomitantemente ao processo intracelular acima descrito, particularmente nos macrófagos, os processos intercelulares envolvendo células de defesa, antígenos micobacterianos fagocitados, processados e apresentados, podem ocorrer de acordo com as diferentes moléculas expressadas pelos macrófagos e células dendríticas, por quatro vias:

1 - Quando o antígeno peptídico expressado é resultante de fagocitose, os macrófagos apresentadores de antígenos e células dendríticas expressam-no via molécula Complexo de Histocompatibilidade Principal II, do inglês *Major Histocompatibility Complex Class II* (MHC II), sendo este antígeno restrito ao reconhecimento por linfócito com receptores de célula T (RTc) α/β associado ao co-receptor $CD4^+$, envolvido na imunidade mediada por células, de perfil Th1. O co-receptor $CD4^+$ também interage com antígenos na reação de hipersensibilidade tardia tipo IV, do inglês *Delayed-type Hypersensitivity IV* (DTH IV) que é desencadeada a partir da reexposição do hospedeiro aos antígenos do *M. bovis*, ocorrendo quando por exemplo, na prova tuberculínica, o derivado protéico purificado, do inglês *Purified Protein Derivate* (PPD), é absorvido pelo tecido colagenoso denso presente na derme e os antígenos difundem-se no tecido adjacente ao local de inoculação, sendo fagocitados por células dendríticas ou por macrófagos. Estes os apresentarão, via molécula MHC II, aos linfócitos. Como células apresentadoras de antígenos, as células fagocitárias migram até o linfonodo regional, permitindo a interação com linfócitos, que reconhecem os antígenos e migram ao local de exposição, liberando quimiocinas tipo $IFN-\gamma$, desencadeando um processo inflamatório com atração e migração de mais macrófagos em um prazo de doze a vinte e quatro horas. Os macrófagos, por sua vez, liberam quimiocinas tipo Interleucina 12 (IL12) e mediadores inflamatórios, intensificando a lesão local (Pollock et al., 2001; Wedlock et al., 2002; Hope et al., 2004).

2 - Quando o antígeno peptídico expressado é resultante de síntese e processamento no citosol do macrófago através dos proteossomos e retículo endoplasmático, é apresentado via molécula MHC I, presente em todas as células nucleadas do animal. Este antígeno fica

restrito ao reconhecimento por linfócitos citotóxicos e linfócitos *Natural Killer* com receptores de célula T (RTc) α/β associado ao co-receptor $CD8^+$, vinculado à resposta mediada por anticorpos, de perfil Th2, e também envolvido na apoptose de célula infectada.

3 - Quando antígenos não protéicos do *M. bovis* como os glicolipídicos são expressados por macrófagos, envolvem uma terceira molécula de apresentação, o MHC *like protein*. Estes antígenos são reconhecidos, no contexto de co-receptor CD1, via linfócito com receptores de célula T (RTc) α/β duplo negativo (DN $CD4^-$ e $CD8^-$).

4 - Quando os antígenos do patógeno são de composição glicolipídica e lipoprotéica, notadamente a proteína do choque térmico, do inglês *heat shock protein* (HSP-65), envolvida no mecanismo da apoptose, apresentados também via terceiro tipo de MHC, o *like proteins*. Estes antígenos são reconhecidos via linfócitos atípicos com receptores de célula T (RTc) γ/δ associado ao co-receptor WC1 que está presente em maior quantidade nos bovídeos que noutras espécies e ainda não possuem seu papel descrito de forma clara. Os linfócitos γ/δ participam na resposta contra bactérias intracelulares, como o *M. bovis*, limitando o acesso de células inflamatórias que podem causar danos aos tecidos do hospedeiro (Kaufmann, 2001; Wedlock et al., 2002; Wickoff III, 2002).

Nas quatro condições de apresentação de antígenos acima citadas, há interação do macrófago apresentador de antígenos que secreta IL1, IL12 e IL18, com os linfócitos *Natural Killer*, linfócitos citotóxicos com receptores RTc α/β $CD8^+$, linfócitos T via receptores RTc α/β $CD4^+$, linfócitos T via receptores RTc γ/δ WC1 e linfócitos via receptores RTc α/β DN CD1. Os aludidos linfócitos liberam $INF-\gamma$ e $TNF-\alpha$, quimiocinas que irão ativar os macrófagos, que por sua vez produzirão radicais de Oxigênio e Nitrogênio, como o óxido nítrico e o peróxido de Hidrogênio, moléculas que contribuirão efetivamente na maturação, acidificação e restrição de entrada de íons Ferro no fagolisossomo, destruindo o *Mycobacterium bovis*. Apesar da tentativa do macrófago inibir o crescimento e multiplicação dos bacilos, alguns conseguem executar tais funções dentro do macrófago, restando poucas opções, entre elas, um processo de sinalização de autodestruição celular, a apoptose (Kaufmann, 2001; Wedlock et al., 2002; Wickoff III, 2002).

A apoptose é uma modalidade de morte celular que depende da ativação de um programa genético intrínseco, envolvendo produção de energia e síntese de RNAm, além de expressão de proteínas específicas. O processo pode ocorrer de forma fisiológica ou patológica sem incitação de reação inflamatória. Um exemplo de apoptose patológica é o processo de morte que ocorre nas células infectadas por *M. bovis* (Wickoff III, 2002; Alberts et al., 2004).

Esta alteração celular não é facilmente observada à microscopia de luz, porque atinge células individualmente ou em pequenos grupos específicos. Diferentemente da necrose, a célula em apoptose não sofre lise. Ela se fragmenta em estruturas envolvidas por unidade de membrana denominadas corpos apoptóticos que contêm organelas intactas, tais como mitocôndrias e lisossomos, não liberando macromoléculas no meio extracelular. Por manter sem prejuízos, a bomba de Sódio e Potássio da membrana celular e, face a esta integridade do conteúdo celular, o processo apoptótico não desencadeia quimiotatismo nem ativação de células inflamatórias (Alberts et al., 2004; Slauson & Cooper, 2002).

Em caso de tuberculose, os macrófagos infectados por *M. bovis* desencadeiam, através de sua própria IL12, a ação de um *pool* de linfócitos que liberam IFN γ e TNF α . Os linfócitos *Natural Killer*, os linfócitos citotóxicos com receptores RTc α/β CD8⁺ e os linfócitos atípicos com receptores RTc γ/δ associados ao co-receptor WC1 reconhecem os antígenos peptídicos, glicolipídicos e lipoprotéicos do patógeno, bem como a proteína do choque térmico ou HSP-65, expressada por células infectadas por *Mycobacterium bovis*. Esta última é conhecida por proteína do estresse e está intimamente associada à sinalização de apoptose, da mesma forma que a HSP-60, em células infectadas por *Brucella abortus*, e a HSP-70 nas infecções intracelulares por *Mycobacterium tuberculosis* (Collins, 1994; Wickoff III, 2002).

Acionado o mecanismo de sinalização de célula infectada com microrganismo intracelular, são liberadas, inicialmente, vesículas dos linfócitos contendo perforinas que atuam na membrana da célula infectada, formando poros, por onde penetram as granzimas, também presentes nas referidas vesículas. Estas por sua vez, ativarão o Fator Indutor de Apoptose-FIA, que sinalizará para que as enzimas caspases iniciem a clivagem do DNA por endonucleases. Paralelamente ocorre fragmentação do citoesqueleto, com liberação dos corpos apoptóticos, que serão, posteriormente removidos por fagocitose. Com isso é dada nova chance ao organismo para reagir contra o patógeno, pois outros macrófagos ativados fagocitarão tais corpos apoptóticos contendo *Mycobacterium bovis* (Wickoff III, 2002; Alberts et al., 2004).

1.7 Patologia

A palavra-chave na definição de patologia é *resposta*, que corresponde a um espectro de reações que variam desde a lesão reversível, passando pela lesão irreversível, transformação maligna e morte. Um aspecto marcante nas infecções micobacterianas é a resposta imune mediada por célula desenvolvida pelo hospedeiro infectado. Isto se deve, inicialmente, à localização intracelular das micobactérias, conduzindo o hospedeiro ao desenvolvimento da

inflamação do tipo granulomatosa, cuja lesão recebe a denominação de tubérculo e, posteriormente, no caso de uma eventual reexposição aos antígenos do bacilo, à reação DTH IV. O organismo agredido dispõe ainda da morte celular programada, ou apoptose como um mecanismo adicional de eliminação de células infectadas, quando estas expressam a proteína do choque térmico, imprescindível para o desencadeamento deste tipo de morte celular (Jones et al., 2000; Neill et al., 2001; Wickoff III, 2002).

Quando a infecção por *M. bovis* se dá por via respiratória, o pulmão é o órgão primeiramente atingido, assim como os linfonodos regionais. Por outro lado, quando a infecção se dá pela via digestiva a lesão se desenvolve inicialmente no sítio de entrada, principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. Finalmente, quando há generalização do processo, as lesões podem atingir qualquer órgão (Thomson, 1990; Roxo, 1997).

O bacilo da tuberculose pode afetar vários tecidos, no entanto, as lesões macroscópicas freqüentemente ocorrem nos linfonodos da cabeça, pescoço, mediastínicos e mesentéricos, como também nos pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio (Roxo, 1997).

Macroscopicamente os tubérculos ou granulomas apresentam-se como nódulos localizadas na intimidade do tecido afetado. São de diâmetro variável entre 1,0 mm a 2,0 cm, de coloração branca, cinza ou amarelados e de consistência firme. Os tubérculos mais antigos, ao serem cortados, podem evidenciar um ranger no fio da faca devido à presença de material de aspecto arenoso, constituído de cristais de Cálcio. A área central da lesão é de aspecto seco, de consistência caseosa e de coloração amarelada que se destaca com facilidade deixando uma estrutura crateriforme com parede irregular (Grange & Yates, 1994; Jones et al., 2000; Pollock & Neill, 2002).

Aos nódulos que sofreram calcificação, associados a lesão no gânglio satélite, denomina-se “complexo primário” que, quando ocorre no pulmão denomina-se complexo primário de Ranke (McIlroy et al., 1986; Thomson, 1990; Jones et al., 2000).

Quando há a generalização da tuberculose, com disseminação da doença por via linfática ou sangüínea, atingindo grande parte dos órgãos ou tecidos, há desenvolvimento de uma forma difusa denominada de tuberculose miliar. Neste caso, observam-se, em todos os sítios afetados, a presença de múltiplos tubérculos pequenos, semelhantes a grãos de milho. A disseminação para a superfície pleural é acompanhada da formação de nódulos solitários, ou em aglomerados de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro, semelhantes a pérolas sendo a doença, neste caso, denominada de tuberculose perolada ou perlada (Thomson, 1990; Corrêa & Corrêa, 1992; Jones et al., 2000).

Microscopicamente, se o organismo não consegue limitar a evolução da infecção, há uma intensificação da resposta do hospedeiro frente ao bacilo e incitação de um processo inflamatório que evolui para a formação de granuloma, também denominado tubérculo (Pollock & Neill, 2002; Wickoff III, 2002; Alberts et al., 2004).

A gênese do granuloma ocorre a partir de uma reação inflamatória inespecífica evidenciada, ao exame microscópico, pela presença de hiperemia vascular, edema e exsudação leucocitária. Nas primeiras horas pós infecção, observa-se predominância de polimorfonucleares neutrófilos, que participam do desenvolvimento inicial do granuloma, no sítio de infecção, por meio de mecanismo ainda não totalmente esclarecido (Morris et al., 1994; Pollock & Neill, 2002).

Os bacilos são posteriormente circundados por células mononucleares, apresentando-se como aglomerados de linfócitos que, em fase ulterior, são substituídos por mononucleares macrófagos que fagocitam os bacilos, tornando-se infectados. Esta fagocitose é facilitada pela grande quantidade de receptores presentes na superfície do macrófago permitindo a sua interação com o patógeno (Jubb et al., 1993; Cassidy et al., 1999; Pollock & Neill, 2002).

Há, dessa forma, o desenvolvimento do foco inflamatório, no qual há predomínio de macrófagos que assumem, com a evolução, aparência com células epiteliais sendo, por isso, denominadas “células epitelióides”. Há também a gênese de células gigantes resultantes da modulação de macrófagos que, na tentativa de fagocitarem simultaneamente os bacilos, têm as suas paredes celulares abertas e se fundem, formando grandes células multinucleadas, conhecidas como células gigantes tipo Langhans. Tais células apresentam um número variável de núcleos dispostos na periferia, dando-lhes a aparência de ferradura. O conjunto de células gigantes e células epitelióides formam o centro do granuloma que é circundado por um infiltrado de linfócitos, monócitos e outras células sanguíneas (Boros & Warren, 1974; Jubb et al., 1993; Cassidy et al., 1999).

Com a exacerbação desta reação inflamatória proliferativa, há o desenvolvimento do tubérculo ou granuloma, no qual, em estádios avançados, observa-se externamente uma banda de tecido conjuntivo proliferado evidenciando, na sua periferia, graus variados de neoformação vascular. O granuloma ou tubérculo pode evoluir para resolução, transformando-se em uma pequena cicatriz, ou sofrer necrose central do tipo caseificação que se apresenta como uma massa amorfa eosinofílica repleta de restos celulares. Devido à entrada abundante de íons Cálcio nas mitocôndrias das células necrosadas, e à reação deste mineral com fosfatos provenientes das células destruídas, desenvolve-se um quadro de calcificação distrófica, visto nas preparações coradas pela hematoxilina-eosina de Harris

(HE), como grumos de cristais basofílicos (Grange & Yates, 1994; Pollock & Neill, 2002; Jones et al., 2000).

Em algumas espécies, especialmente em cervos (*Odocoileus virginianus* e *Cervus elaphus*), os neutrófilos estão presentes em grande quantidade na composição dos granulomas, promovendo uma liquefação, ao invés da caseificação do exsudato, característico da tuberculose (Pollock & Neill, 2002).

1.8 Diagnóstico

O diagnóstico da tuberculose em bovinos pode ser realizado de forma direta ou indireta, por métodos clínicos, anatomo-patológicos ou laboratoriais (Lage et al., 1998).

1.8.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico é de pouca relevância na fase inicial da enfermidade, devido à apresentação supostamente sadia do animal, que pode estar somente infectado e com lesões localizadas. No entanto, em animais com evolução adiantada da doença, o exame clínico detalhado e a investigação epidemiológica criteriosa são de grande valor para a formulação do diagnóstico definitivo (Roxo, 1997).

A constatação de que bovinos em aparente condição de hígidez estejam com tuberculose contrapõe-se ao paradigma de emaciação progressiva como parâmetro de suspeita clínica da tuberculose bovina. Apesar de haver exacerbação na liberação da quimiocina TNF- α em animais tuberculosos, e esta promover alterações no metabolismo suprimindo a ação da lipase lipoprotéica dos adipócitos, provocando emagrecimento e caquexia, deve-se ressaltar que animais destinados ao abate em boas condições nutricionais também são detectados com tuberculose (Slauson & Cooper, 2002; Alberts et al., 2004).

O exame clínico inclui a auscultação, a percussão, a termometria e a palpação de glândulas mamárias e linfonodos superficiais. Neste último caso, são avaliados principalmente a exacerbação da sensibilidade dolorosa e a presença de linfadenomegalia. Também são sinais clínicos que devem ser levados em consideração a manifestação intensa de cansaço, a ocorrência de tosse seca não produtiva, a eliminação de secreção nasal e a manifestação de dispnéia (Roxo, 1997).

1.8.2 Diagnóstico *post mortem*

O diagnóstico anatomo-patológico, ou *post mortem*, da tuberculose bovina, durante a realização de necropsias ou de inspeção sanitária de carcaças em matadouros-frigoríficos, apresenta considerável dificuldade, uma vez que, muitos processos inflamatórios

granulomatosos apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para a tuberculose, isto é, lesões nodulares com 1mm a 2 cm de diâmetro, confluentes ou não, de cor amarelada, envolvida por cápsula fibrosa e contendo exsudato com aspecto purulento ou caseoso no seu interior.

Lesões com as características acima mencionadas, descritas detalhadamente no tópico referente à patologia, suscitam diagnóstico diferencial, pois podem ocorrer também, nas infecções por *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces bovis*, *Actinobacillus lignieresii*, por fungos, na infestação por larvas de parasitos, bem como em alguns processos neoplásicos, confundidas freqüentemente com tuberculose. A ocorrência de patologias com estas características, em qualquer parte do organismo, determina a busca de lesões presuntivas de tuberculose, causadas pela infecção primária em órgãos relacionados à via de infecção do *M. bovis* (Andrade et al., 1991; Corner, 1994; Essey & Koller, 1994; Neill et al., 1994; Lage et al., 1998; Gil, 2000).

Apesar das dificuldades, o exame anatomo-patológico é crucial para o diagnóstico da tuberculose bovina. Isto pode ser confirmado com base nos bons resultados preliminares alcançados pelos programas de controle, implementados em regiões com alta prevalência da doença, onde o exame *post mortem* convencional detecta cerca de 47% de lesões presuntivas de tuberculose em carcaças de bovinos abatidos (Corner, 1994 Lage et al., 1998; Menzies & Neill, 2000).

Dados de literatura demonstram que cerca de 70 a 90% das lesões presuntivas de tuberculose, encontradas durante o exame *post mortem* de carcaças em abatedouros-frigoríficos, ocorrem nos linfonodos da cabeça e da cavidade torácica e, dentre as carcaças com tais alterações, 66% delas evidenciam uma única lesão. Um estudo conduzido na Austrália concluiu ser conveniente acrescentar ao exame *post mortem* convencional, a inspeção também dos pulmões e dos linfonodos mediastínicos, retrofaríngeos e bronquiais. De acordo com este estudo, tal procedimento possibilitou a identificação de 86% das carcaças com apenas uma lesão presuntiva de tuberculose. Ainda com o propósito de melhorar a eficiência do exame *post mortem*, este mesmo estudo conseguiu identificar 95% das carcaças com única lesão presuntiva da doença, acrescentando ao procedimento anterior o exame, também dos linfonodos mesentéricos e mais três pares, correspondentes aos parotídeos, cervicais caudais e inguiniais superficiais (Corner, 1994).

1.8.3 Diagnóstico histopatológico

A histopatologia é uma forma de diagnóstico complementar ao exame *post mortem* de carcaças com lesões presuntivas de tuberculose. Este exame constitui-se em uma técnica

direta de diagnóstico presuntivo pesquisando bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), ou indireta, detectando o granuloma, considerado a lesão característica dessa doença. Para se efetivar este tipo de exame deve-se obter fragmentos das lesões presuntivas, com espessura de até 1,0 centímetro, abrangendo, preferencialmente, a zona de transição entre a área lesada e a aparentemente normal. Os fragmentos devem ser colhidos, e acondicionados em frascos de boca larga contendo formol a 10%, em volume dez vezes maior que o do material a ser fixado (Lemos, 1998; Cassidy et al., 1999).

Depois de fixados, incluídos em parafina e microtomizados, os cortes histológicos do tecido lesado podem ser submetidos à coloração por HE, e examinados sob microscopia de luz. Isto permite a observação da morfologia e organização do granuloma característico da tuberculose, revelando seu envolvimento por uma cápsula conjuntiva; adjacente à ela há presença de infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente constituído por macrófagos e poucos linfócitos; também são observadas células eptelióides, células gigantes tipo Langhans delimitando a área de necrose de caseificação; que no seu interior pode conter material amorfo basofílico, resultado da calcificação distrófica (Cassidy et al., 1999).

As lâminas histológicas também podem ser submetidas à coloração especial pelo método de Ziehl-Neelsen, modificado por Faraco e Wade, ou pelo método de Kinyoun. Estas técnicas baseiam-se nas propriedades tintoriais comuns às micobactérias e aos microrganismos dos gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium*, conhecidos como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), assim denominados porque conseguem reter a fucsina aquecida após o tratamento do material por álcool-ácido. Neste tipo de coloração, os microrganismos álcool-ácido resistentes podem ser observados sob microscopia óptica de luz, em objetiva de imersão, aparecendo como bacilos corados em vermelho, contrastando com o restante do corte histológico corado em azul, pelo azul de metileno ou verde, pelo verde malaquita, conforme a técnica utilizada (Luna, 1968; Behmer et al., 1976; Michalany, 1980).

1.8.4 Diagnóstico imunológico

O diagnóstico imunológico da tuberculose bovina é baseado em reações alérgicas *in vivo*, representado pela prova tuberculínica. Esta prova constitui-se em um método indireto de diagnóstico da tuberculose e é capaz de revelar infecções incipientes, com três a oito semanas pós-contato com o *M. bovis*, desde que sejam empregadas técnicas utilizando-se reagentes e equipamentos padronizados. É um teste amplamente empregado desde que foi preconizado por Robert Koch em 1890. Esse exame baseia-se na avaliação da resposta do animal à injeção intradérmica de extratos de micobactérias, denominados tuberculinas.

Classicamente esta resposta é descrita como uma reação DTH IV, deflagrada em animais previamente expostos ao bacilo da tuberculose (Monaghan et al., 1994).

A tuberculina descoberta por Koch é, atualmente, denominada de derivado protéico purificado (PPD), amplamente utilizada para o diagnóstico indireto *in vivo* da tuberculose bovina e hodiernamente disponível em quase todo o mundo, inclusive no Brasil, na apresentação PPD bovino correspondente ao extrato antigênico de proteínas purificadas, derivado da amostra AN5 de *M. bovis*, e PPD aviário, que é sintetizado a partir da amostra D4 de *M. avium* (Monaghan et al., 1994).

São preconizados testes diagnósticos de triagem e confirmatório da tuberculose bovina, representados pela prova intradérmica simples e pela comparada. No primeiro caso utiliza-se somente PPD bovina em uma única inoculação, denominado teste cervical simples (TCS), ou na prega caudal, conhecido como teste da prega caudal (TPC). Como teste confirmatório empregam-se PPDs bovino e aviário, inoculados simultaneamente em dois pontos próximos, previamente determinados na região do pescoço, denominado teste cervical comparativo (TCC).

Após 72 horas da inoculação intradérmica com PPD bovino, na região cervical ou escapular, no caso do TCS, a reação positiva caracteriza-se pela presença de muita dor e inchaço da pele, mensurada por cutímetro em local anteriormente demarcado e mensurado.

No TPC o PPD bovino é inoculado intradermicamente na região da junção das peles pilosa e glabra, o resultado é obtido após 72 horas comparando-se a prega inoculada com a prega do lado oposto. A avaliação é visual e tátil, quando qualquer aumento de espessura na prega inoculada caracteriza resultado positivo ao teste (Brasil, 2001)

Tratando-se do TCC, as injeções de tuberculina aviária e bovina são feitas em pontos distintos, previamente estabelecidos no terço médio do pescoço, onde são feitas mensurações da pele com cutímetro, aplicações dos PPDs bovino e aviário e, 72 horas depois procedida a leitura do resultado, através de novas mensurações da pele. Verificando-se um aumento igual ou superior a 4mm, quando subtraída a mensuração do local inoculado com PPD aviário do local inoculado com PPD bovino, a interpretação é de resultado positivo ao TCC (Monaghan et al., 1994; Brasil, 2001).

O aumento da espessura da pele é determinado pelo infiltrado de células inflamatórias mononucleares e pelo edema mais ou menos pronunciado, cuja amplitude determinará o resultado do teste. Após a tuberculinização, os animais reagentes tornam-se dessensibilizados, isto é, apresentam capacidade diminuída para responder a um novo teste alérgico, a qual é recuperada após um período de 42 a 60 dias (Neill et al., 1994; Monaghan et al., 1994).

Animais em estágio adiantado da doença podem desenvolver o fenômeno da anergia, que se caracteriza pela ausência de reatividade ao teste cutâneo tuberculínico, podendo ocasionar resultados falso-negativos interferindo no diagnóstico. Este fenômeno também pode ser observado em casos de infecção recente por *M. bovis*, entre 30 e 50 dias, final de gestação, parto recente, desnutrição e uso inadequado de drogas imunossupressoras. Além disso, variações inerentes ao teste, tais como dose de inóculo, cuidados com a armazenagem e conservação e a própria tuberculina utilizada, somadas às possíveis variações nos métodos de realização, critérios de leitura e formas de interpretação do teste, podem contribuir para o aumento da ocorrência de resultados falso-negativos (Monaghan et al., 1994; Roxo, 1997).

Outro teste imunológico é o de detecção da produção específica de interferon-gama (IFN- γ), um método diagnóstico indireto *in vitro*, realizado em amostras heparinizadas de sangue total de animais suspeitos, com o objetivo de mensurar a produção de *Interferon* γ (Wood & Jones, 2001).

Trata-se de um ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA*) através do qual é possível se verificar a existência de resposta imune mediada por células, desenvolvida pelo organismo do animal em resposta à infecção micobacteriana. O IFN- γ produzido pelo linfócito T do animal infectado é detectado através do teste de ELISA de captura, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-IFN- γ . A ausência de detecção de IFN- γ caracteriza a negatividade do animal para infecção pelo *M. bovis* uma vez que os linfócitos de bovinos não infectados não produzem esta quimiocina de forma específica. Como trata-se de um teste *in vitro*, tem a vantagem de não interferir no estado imune do animal, podendo ser repetido no mesmo animal sem a necessidade de respeitar o período de dessensibilização (Madruga et al., 2001; Wood & Jones, 2001).

1.8.5 Isolamento bacteriano

O isolamento do *Mycobacterium bovis* é um método direto de diagnóstico considerado como “padrão-ouro”. Porém, o longo período requerido para o isolamento e identificação bioquímica, é um de seus pontos críticos, podendo demandar mais de doze semanas para a conclusão definitiva do diagnóstico (Collins et al., 1994; Corner, 1994).

A obtenção de diagnósticos satisfatórios neste método, depende das condições de colheita das amostras, principalmente no que diz respeito à assepsia, bem como da estocagem, até o seu envio aos laboratórios. Nos países em que as distâncias entre o local de colheita e os laboratórios de diagnóstico são longas e as temperaturas ambientais altas, a exemplo da Austrália e do Brasil, é possível se obterem resultados laboratoriais satisfatórios

mantendo-se as amostras congeladas a 20°C negativos. De acordo com dados experimentais foi possível a recuperação de *M. bovis* em 90% das amostras positivas mantidas durante cem dias congeladas a -20°C. Este mesmo experimento revelou ser possível, ainda a obtenção de crescimento bacteriano em 78% das amostras positivas mantendo-as nas mesmas condições, durante um ano. A conservação de amostras em solução saturada de tetraborato de Sódio revelou ser eficiente quanto à manutenção da viabilidade dos bacilos em amostras resfriadas a 6°C positivos, quando o processamento era realizado até 72 horas depois da colheita. Passado este período, houve uma queda abrupta na viabilidade dos bacilos dificultando a sua recuperação por procedimentos laboratoriais preconizados para isolamento micobacteriano (Corner, 1994).

No laboratório, os principais fatores que influenciam no sucesso do isolamento de *M. bovis* são a escolha do meio de cultura, os procedimentos de descontaminação da amostra e as condições de incubação do agente. *M. bovis* é uma bactéria que requer meios ricos em nutrientes para o seu crescimento e isolamento. Os meios de cultura de Stonebrink e o Löwenstein-Jensen são à base de ovos e piruvato, e o primeiro é mais recomendado ao cultivo do *M. bovis*. Meios de cultura à base de ágar enriquecidos com soro ou sangue, a exemplo do *Middlebrook* modificado ou 7H11 e o meio tuberculose ágar sangue ou B83, também são indicados para o cultivo.

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 27 dias no B83 e em 28 dias no 7H11. Já 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 cultivada tenha sido previamente descontaminada.

Estudos utilizando amostras provenientes de casos clínicos de tuberculose, ao serem cultivadas, evidenciaram 8,3% de contaminação quando se utilizou o meio agar 7H11. Este percentual de contaminação foi duas vezes maior que o observado quando se empregou o meio de Stonebrink que evidenciou 4,7% de contaminação das amostras. Em outro estudo, as amostras, ao serem cultivadas, foram submetidas a descontaminação com Hidróxido de Sódio (NaOH) a 2%, reduzindo o aparecimento de contaminantes para 3,9% das amostras, quando se empregou o ágar 7H11, como meio de cultivo, e para 0,3% quando as amostras foram cultivadas no meio de Stonebrink. No processo de descontaminação das amostras a serem cultivadas, o maior problema é a seleção de um descontaminante e a sua concentração, bem como o conhecimento do efeito adverso que a maioria dos reagentes têm sobre o *M. bovis*. Várias substâncias descontaminantes podem ser utilizadas, como no caso do cloreto de

hexadecilpiridínio, do ácido oxálico, do cloreto de benzalcônio e do descontaminante de Petroff que contém NaOH a 2%, em sua fórmula (Corner, 1994).

O cultivo do *M. bovis* é feito em tubos contendo meio inclinado, com pH ideal entre 6,8 e 7,0 e mantido em estufa a 37° C. Estudos demonstraram que a adição de até 5% de CO₂ na atmosfera de incubação não teve efeito sobre a taxa de crescimento bacteriano e o número de colônias de *M. bovis* em isolamento primário, mas concentrações de CO₂ superiores a 5% inibem o seu crescimento. Em meios de cultivo a base de ovos, como no caso do Stonebrink, é típico o crescimento de colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo pálido, com borda irregular e superfície granular. Em meios a base de ágar como, por exemplo, o *Middlebrook* 7H11 modificado, e o tuberculose ágar sangue, conhecido como B83, elas são brancas, finas, ásperas e planas, exceto no centro aonde são mais volumosas (Corner, 1994).

As colônias isoladas, presuntivas de *M. bovis*, devem ser identificadas por métodos bioquímicos ou moleculares. Para a identificação bioquímica, as técnicas tradicionais requerem um crescimento abundante de cultura pura e madura, o que não é comum tratando-se de *M. bovis*, e necessitam de três a quatro semanas para sua total realização, após as doze semanas ou mais necessárias ao isolamento primário do *M. bovis* (Collins et al. 1994).

Depois de cultivadas, as colônias bacterianas devem ser submetidas a provas bioquímicas, objetivando identificação da bactéria isolada, com base em parâmetros observados. Assim, a produção de catalase é uma característica do complexo MAC. Por outro lado, esta substância não é produzida pelas micobactérias componentes do complexo MTB. De outra forma, a hidrólise do Tween é uma particularidade que permite a separação do complexo MAC, de outras micobactérias ambientais. A prova da redução do telurito de Potássio é positiva para o complexo MAC e negativa para o complexo MTB. Ainda, o aumento da quantidade de niacina, e redução de nitrato a nitrito, são observados quando a bactéria cultivada é *M. tuberculosis*, mas não ocorre quando se trata do *M. bovis*, permitindo, assim, uma seleção prévia da micobactéria cultivada. Também o teste de sensibilidade ao antibiótico pirazinamida contribui para o diagnóstico definitivo da tuberculose, diferenciando o *M. bovis* do *M. tuberculosis* (Brasil, 1994).

1.8.6 Provas moleculares

As técnicas de biologia molecular para amplificação de ácido desoxiribonucleico (DNA), como no caso a reação em cadeia da polimerase (PCR), baseiam-se na síntese enzimática orientada por oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers*. Estes oligonucleotídeos correspondem a uma porção conhecida da seqüência do DNA que se pretende sintetizar e amplificar. Eles fornecem um sítio para que a enzima termoestável DNA-polimerase

promova a síntese e incorporação de nucleotídeos, alongando o DNA que se desenvolve em três etapas distintas, isto é, desnaturação térmica e separação da dupla fita de DNA, hibridização das fitas resultantes com os *primers*, anelamento, e a extensão destes com auxílio da enzima DNA-polimerase (OIE, 2005).

Quanto ao emprego da PCR para diagnóstico da tuberculose bovina, esta reação vem sendo amplamente avaliada na detecção de micobactérias do complexo MTB em colônias cultivadas, em leite, em tecidos frescos, e em tecidos fixados em formol e embebidos parafinados. Também tem sido utilizados diversos *primers* para amplificar a sequência de RNAr 16S-23S, correspondentes às seqüências de inserção em cromossomo de micobactérias, IS6110 e IS1081, como também genes codificadores para proteínas, tais como a MPB70 de 24 KDa, o Antígeno B de 38 KDa e a HSP de 65 KDa (Fisanotti et al., 1998; Perumalla et al., 1999; Zanini et al., 2001; Leite et al., 2003).

A técnica *fingerprinting*, também tem sido utilizada por alguns laboratórios de diagnóstico, com o intuito de distinguir diferentes espécies do complexo MTB e algumas amostras pertencentes ao *M. bovis*, e o método mais utilizado é o de oligotipos espaçadores ou *spacer oligotyping* ou *Spoligotyping*. Também seguem o padrão de corte *fingerprinting* as técnicas PGRS (*Polymorphic 'GC' Rich Repeat Sequence*), DR (*Direct Repeat*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorph analysis*) e VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) (OIE, 2005).

Somando-se às técnicas mencionadas, a reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-*real time*), MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*) e SNP (*Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms*) também vem sendo implementadas, como as demais técnicas, na metodologia de diagnóstico rápido de *Mycobacterium bovis*, tornando-se ferramentas para estudos epidemiológicos da transmissão da tuberculose bovina, dando notoriedade a um moderno campo de pesquisa, a epidemiologia molecular, onde a agilidade e rapidez na detecção do *M. bovis* podem ser determinantes na escolha desses métodos, que diferenciam as espécies e amostras diferentes de uma mesma espécie, ao nível do DNA .

A contaminação cruzada tem sido o grande problema na padronização dos métodos moleculares, a variação nos resultados de diferentes autores quanto a especificidade e sensibilidade destes testes devem-se a muitos fatores como o tipo de amostra utilizada, o emprego de metodologias diferentes no preparo das amostras, no sistema de amplificação e na detecção do produto amplificado, e isso só será dirimido com protocolos confiáveis e padronizados por vários laboratórios (OIE, 2005).

1.9 Controle

Objetivamente, as medidas de controle e erradicação devem interromper a transmissão da doença com ações específicas para as fontes de infecção, vias de transmissão e animais suscetíveis, a exemplo do teste-sacrifício, devendo os pecuaristas engajarem-se ao programa por persuasão aos argumentos técnicos, sociais e econômicos, evitando-se a adesão por coerção ou punição. Ações inespecíficas aplicadas à movimentação de animais entre propriedades, que deve ser realizada mediante porte de documentos atestando os animais como negativos à enfermidade, ou positivos se destinados ao sacrifício, e eventualmente medidas de controle frente aos hospedeiros mantenedores sinantrópicos ou silvestres, que após identificados como reservatórios da infecção, devem ser eliminados, se isto for possível (Morris et al., 1994).

A vacinação de animais contra a tuberculose ainda não foi preconizada em nenhum programa de controle, face à problemática de indistinção de animais infectados e vacinados frente aos exames de rotina empregados. Porém, pesquisas fomentadas por entidades internacionais continuam buscando uma forma de desenvolver um antígeno capaz de promover imunidade e não interferir nos testes diagnósticos (Collins, 1994; Cosive et al., 1998; Pollock et al., 2001).

O tratamento de bovinos tuberculosos, utilizando principalmente a isoniazida têm sido proibido em países que têm programas de controle, pois não se obtém por meio de tratamento a eliminação de todos os animais portadores do bacilo, mantendo desta forma a fonte de infecção e a doença no rebanho (Roxo, 1997; Lage et al., 1998).

A globalização dos mercados vem paulatinamente retirando barreiras tributárias e implantando barreiras sanitárias cada vez mais rigorosas. Países desenvolvidos, que há décadas iniciaram programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, levam vantagem na apresentação de seus produtos aos mercados consumidores.

O controle da doença na América do Norte encontra-se em um estágio avançado, observando-se, nos EUA e Canadá, índices de incidência da doença muito baixos, contando inclusive com áreas livres de tuberculose bovina, mas ainda estão presentes áreas endêmicas no México. O programa federal de controle da tuberculose bovina foi implantado em 1917 nos EUA, e em 1994 a prevalência da infecção foi estimada em 0,003% no rebanho bovino. Nessa ocasião não havia registro de tuberculose humana causada por *M. bovis* em indivíduos residentes, exceto naqueles recentemente emigrados para os EUA de países com alta prevalência de tuberculose bovina.

O programa canadense de erradicação da tuberculose bovina foi estabelecido em 1923. Em 1994, oito das dez províncias que constituem o Canadá já eram consideradas áreas livres da doença, e a erradicação total da enfermidade nos bovinos estava prevista para os próximos anos. Bisões e cervídeos silvestres infectados pelo *M. bovis* ainda representam uma fonte de infecção para animais domésticos na América do Norte. A boa participação dos pecuaristas frente aos focos de infecção, a eficiência no controle do trânsito animal, e o abate da grande maioria dos animais que se dá em matadouros-frigoríficos com rigorosa inspeção sanitária, lograram êxito ao programa nos EUA e Canadá (Essey & Koller, 1994).

Na Oceania os programas de controle e erradicação intensificaram-se no ano de 1970, motivados pelas perdas de produtividade animal e visando garantir mercado de exportação, e sobretudo a melhoria da saúde pública. Na Nova Zelândia e Austrália a presença de reservatórios silvestres de *M. bovis* tem retardado a erradicação da tuberculose. Evidências epidemiológicas mostraram que o *Trichosurus vulpecula*, uma espécie de marsupial, foi o principal hospedeiro mantenedor da tuberculose para os bovinos, principalmente na Nova Zelândia. A aplicação da política de teste-sacrifício dos animais positivos e a investigação de casos identificados em matadouros-frigoríficos também nortearam os programas desses países, além de uma boa coordenação envolvendo pecuaristas, entidades privadas e governos (Tweddle & Livingstone, 1994; Barlow et al., 1998; Collins, 2001; Cousins & Roberts, 2001).

Na Europa, o Reino Unido teve o início de seu programa de controle adiado por mais de trinta anos face aos conceitos equivocados de Koch em 1901, subestimando o aspecto zoonótico da tuberculose, onde somente a partir de 1935 os procedimentos de controle foram instituídos. Com o advento da União Européia (UE) em 1957, os programas ganham coesão entre os Estados Membros, amparados em intensiva testagem e sacrifício mediante indenização de animais reatores (Pritchard, 1988; Caffrey, 1994).

Países membros da UE, segundo levantamento realizado em 1991, apresentavam prevalência variada de tuberculose bovina. A Irlanda com 8,8% de casos e a Itália com 3,71% ainda não haviam alcançado a erradicação, a Espanha, onde o programa nacional de erradicação havia, recentemente, sido iniciado, a infecção atingia 10,8% dos rebanhos bovinos. Estudo realizado na Irlanda mostrou que espécies silvestres são hospedeiras que atuam na manutenção do *M. bovis* e contribuem para a persistência e difusão da enfermidade em animais domésticos, especialmente o furão *Meles meles*, interferindo na eficácia de programas de erradicação da tuberculose em rebanhos bovinos (Caffrey, 1994; Gormley & Collins, 2000).

Embora dados de prevalência sobre a tuberculose bovina em países em desenvolvimento sejam geralmente escassos, existem informações sobre a ocorrência e medidas de controle em alguns desses países, por exemplo na Ásia, sete países aplicam políticas de medidas de controle, como o teste-sacrifício e notificam a ocorrência de tuberculose. No entanto, vinte e nove países aplicam medidas parciais de controle ou medida alguma. Na África, outros sete países aplicam medidas de controle como o teste-sacrifício, nos demais países o controle é inadequado ou não existe. Pesquisas informaram ser a tuberculose bovina a principal causa de condenação de carcaças bovinas em abatedouros-frigoríficos de Burkina Faso, e que a prevalência da enfermidade na Tanzânia em rebanhos bovinos de corte e leite foi de 1 e 2% respectivamente (Cosive et al., 1998; Bonsu, 2000; Coulibaly & Yameogo, 2000; Shirima, 2003).

Dentre trinta e quatro nações da América Latina e Caribe, apenas doze detêm cerca de 76% do rebanho bovino desta área, e aplicam medidas de controle como o teste-sacrifício e notificam a tuberculose bovina. O Brasil configura-se entre elas. Em vinte e dois países, a doença é parcialmente controlada ou não tem controle algum. A prevalência da infecção por países é muito flutuante, com taxas muito baixas em Cuba, Uruguai e Venezuela, moderadas na Argentina, Paraguai, Brasil e Chile, e elevada na Bolívia (De Kantor & Ritacco, 1994; Cosive et al., 1998).

O impacto da tuberculose como zoonose, pondo em risco a saúde humana, constituiu-se em um fator determinante para que se estabelecessem programas para seu controle e erradicação ainda no início do século XX, que associados ao processo de pasteurização do leite em países desenvolvidos levou a uma redução na incidência de tuberculose humana causada por *M. bovis*. As medidas básicas necessárias para o controle da tuberculose em rebanhos domésticos são bem definidas e as informações atinentes ao processo estão prontamente acessíveis (Grange & Yates, 1994; Morris et al., 1994; Cosive et al., 1998).

1.9.1 Políticas atuais de combate à tuberculose bovina no Brasil

O Brasil tem atualmente uma população bovina superior a 195 milhões de cabeças e dados de Mato Grosso do Sul, no período de 1976 a 1979, revelaram uma prevalência de tuberculose em abatedouros-frigoríficos de 0,2%, considerada baixa em relação à média brasileira de 1976 de 2,62%. Informações de 1987 a 1989 mostravam que a infecção acometia entre 0,9 a 2,9% dos bovinos, e que entre 6,2 a 26,3% dos rebanhos eram infectados. No mesmo período, verificou-se que a prevalência de lesões presuntivas de tuberculose encontradas em matadouros-frigoríficos era de 0,14%. Em Minas Gerais, na região do Triângulo Mineiro no período de 1993 a 1997, foi determinada uma prevalência em

bovinos abatidos de 0,71%. E dados oficiais obtidos entre 1989 e 1998, mostravam que, no Brasil, a tuberculose acometia 1,3% dos bovinos. Considerando-se o atual rebanho bovino brasileiro, este último percentual corresponderia a aproximadamente dois milhões e quinhentas mil reses com tuberculose (Schenk & Schenk, 1982; De Kantor & Ritacco, 1994; Brasil, 2003; Baptista et al., 2004).

No Brasil a tuberculose bovina é doença de notificação obrigatória, com um fluxo de informação partindo dos serviços de defesa e inspeção oficiais de cada Município, compondo uma informação estadual. Esta é remetida ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que informará através de boletins a entidade que certifica países em relação às enfermidades animais, a OIE, na França. A tuberculose bovina é uma das enfermidades que compõe a lista de doenças notificáveis a esta entidade internacional, quais sejam, doenças que possuem importância socio-econômica, na saúde pública e que afetam o comércio internacional. Diante estas premissas, a OIE preconiza a tomada de ações de controle e erradicação, partindo-se de um estabelecimento da prevalência da doença através de levantamentos diagnósticos e epidemiológicos (Brasil, 2001; Mato Grosso, 2005).

Mas até o final do século XX, verificou-se no Brasil que o controle da tuberculose bovina não motivou os médicos veterinários, os criadores, autoridades sanitárias e os consumidores de produtos de origem animal. Em parte, isso se deve ao fato de ser uma enfermidade crônica, que não apresenta sinais clínicos como abortos, febre alta, queda abrupta de produção, como em doenças de evolução aguda. Quando por alguma razão os pecuaristas são alertados para o problema da tuberculose, e procuram assistência técnica, a prevalência se revela alta de maneira geral (Lage et al., 1998).

A iniciativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ao instituir o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) em 2001, identificou a necessidade de se obter informações sobre a incidência e prevalência da tuberculose bovina no Brasil (Brasil, 2001; Brasil, 2003).

A Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária número 06, de oito de janeiro de 2004, aprovou o Regulamento Técnico do PNCEBT, definindo o papel dos integrantes do programa, padronizando e garantindo qualidade aos instrumentos e ações profiláticas, de diagnósticos, de saneamento de rebanhos de vigilância sanitária ativa, relacionadas ao combate à brucelose e tuberculose. Os objetivos do PNCEBT estão alicerçados na diminuição da prevalência e incidência da brucelose e tuberculose e certificação de um número elevado de estabelecimentos de criação, com medidas sanitárias aplicadas principalmente às populações bovina e bubalina, objetivando aumentar a oferta de produtos de baixo risco para a saúde pública (Brasil, 2004).

De acordo com o PNCEBT, o serviço de inspeção oficial participa em colaboração com serviço de defesa oficial, visando melhorar a eficácia das ações de vigilância sanitária e monitoramento do aludido programa, com atribuições de realizar o abate sanitário de animais reagentes positivos, cumprir procedimentos higiênicos e sanitários e comunicando ao serviço de defesa oficial os achados de matança, em carcaças e vísceras, presuntivos de tuberculose (Brasil, 2004).

No Brasil, a Divisão de Normas Técnicas do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do MAPA, é responsável pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), aprovado pelo decreto número 30.691 de 29 de Março de 1952, e alterado pêlos decretos número 1255 de 26 de Junho de 1962, 1236 de 02 de Setembro de 1994, 1812 de 08 de Fevereiro de 1996 e 2244 de 04 de Junho de 1997, e contém a legislação vigente, utilizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). O Artigo 196 do RIISPOA trata do destino dado às carcaças e órgãos que apresentam lesões sugestivas de tuberculose (Brasil, 1997).

No âmbito da inspeção oficial estadual em Mato Grosso, o INDEA/MT, executa a inspeção sanitária em matadouros-frigoríficos que destinam seus produtos aos municípios mato-grossenses, através de sua Coordenadoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal (CISPOA). O Serviço de Inspeção Sanitária Estadual (SISE) é amparado na Lei Estadual nº 6338 de 03 de dezembro de 1993, regulamentada pelo Decreto Estadual nº 4384 de 07 de abril de 1994, e atende ao dispositivo do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (Mato Grosso, 2005).

De acordo com o Artigo 185 do RIISPOA/SISE, deverão sofrer condenação total, compreendendo carcaça e vísceras, os animais portadores de tuberculose nos seguintes casos: qualquer forma de tuberculose, quando acompanhada de caquexia, anemia ou febre; tuberculose miliar aguda, caracterizada pela existência de múltiplas granulações cinzas ou diversas tuberculosas miliares aproximadamente do mesmo desenvolvimento; lesões tuberculosas, indicando colapso das defesas orgânicas, tais como; tuberculose generalizada nos pulmões; tuberculose caseosa extensa em um órgão; tuberculose aguda exsudativa da pleura, peritônio, pericárdio ou meninges; tuberculose linfática hipertrofiante semicaseosa (Mato Grosso, 2005)

Serão liberadas as carcaças em qualquer outro caso de tuberculose, devendo ser retiradas e destruídas as partes lesadas. No caso de tuberculose óssea, exige-se a completa desossa e destruição do esqueleto, liberando-se porém as porções musculares. No caso de lesões discretas, à juízo da inspeção e após a retirada das partes lesadas, a carcaça pode ser destinada à esterilização pelo calor (Mato Grosso, 2005).

Destarte, os serviços de inspeção oficiais respaldam-se nos dispositivos legais acima expostos e o médico veterinário tem a responsabilidade da decisão soberana, de competência legal exclusiva deste profissional, de condenar ou não as carcaças e vísceras com lesões presuntivas de tuberculose, quando, ao constatar a doença, ainda que empiricamente, visa produzir saúde, não no animal sacrificado, mas no homem, este sim, seu objetivo maior. Afinal, não é possível a detecção de todas as enfermidades por meio da inspeção sanitária, atendo-se esta, à certificação do produto apropriado para consumo (Corry & Hinton, 1997).

Tradicionalmente, e à exemplo do PNCEBT no Brasil, o combate à tuberculose bovina é implementado com aplicação de uma rotina de testes tuberculínicos para certificação de propriedades. É essencial que seja analisada a situação epidemiológica nas diferentes regiões brasileiras, o grau de informação sobre a doença e amadurecimento das partes integrantes, pecuaristas, iniciativa privada e governo, bem como a disponibilidade de infra-estrutura e recursos financeiros. Até o momento, programas não disponibilizam de uma vacina que não interfira nos métodos diagnósticos, e não recorrem à terapêutica, que em muitos estudos preconiza principalmente a utilização da isoniazida, que requer tempo de administração prolongado, altas doses e aplicação intermitente, e particularmente no Brasil, vem sendo ministrada indiscriminadamente em rebanhos bovinos de bacias leiteiras do sudeste (Morris et al., 1994; Mota et al, 2004).

Os instrumentos legais que norteiam o PNCEBT estão em plena exequibilidade no País. Otimizar a vigilância e determinar indicadores epidemiológicos da tuberculose causada por *M. bovis* especialmente em bovinos e bubalinos, e seu impacto no aspecto zoonótico, são ações imprescindíveis ao avanço do programa.

2 REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Archive Veterinary Science**, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999.

ACHA, P. N. & SZYFRES, B. Tuberculosis Zoonótica. In.: **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales**, v.1. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. 461 p.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.
Biologia molecular da célula. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463 p.

ALVES, D. A. As dificuldades na inspeção de frigoríficos brasileiros no mercado internacional: Um estudo sobre comercialização da carne bovina “*in natura*”. **Revista Nacional da Carne**, n. 291, p. 96-114, 2001.

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P. V.; MÉNDEZ, M. 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.

BARLOW, N. D.; KEAN, J. M.; CALDWELL, N. P.; RYAN, T. J. Modelling the regional dynamics and management of bovine tuberculosis in New Zealand cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 36, p. 25-38, 1998.

BEHMER, O. P.; TALOSA, E. M. C.; FREITAS, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976. 256 p.

BIET, F.; BOSCHIROLI, M.L.; THOREL, M.F.; GUILLOTEAU, L. A. Zoonotics aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). **Veterinary Research**, n.36, p.411-436, 2005.

BLOOD, D.C. & RADOSTITS, O.M. **Clínica Veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 1231 p.

BONSU, O.A.; LAING, E.; AKANMORI, B. D. Prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme-West district of Ghana, public health implications. **Acta Tropica**, v. 76, p. 9-14, 2000.

BOROS, D.L. & WARREN, K.S. Models of granulomatous inflammation. **Annals. New York Academy of Science**, p. 221-331, 1974.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**, 1997. Brasília.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**, 2001. Brasília.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano agrícola e pecuário. Safra 2002/2003**. Brasília: MAPA, 2002. 76 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**, 2003. Brasília.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**, 2004. Brasília.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2 ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1994. 111p.

CAFFREY, J.P. Status of tuberculosis eradication programmes in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 1-4, 1994.

CARTER, G.R. **Fundamentos da Bacteriologia e Micologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 1988, p.186-192.

CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M.; EVANS, R. T.; FORSTER, F.; NEILL, S. D. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis* - inoculated calves. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 321-337, 1999.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS – CPZ. **Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis III. Sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas. La identificación de micobacterias**. Buenos Aires, 1988. 63 p.

COLLINS, D.M.; RADFORD, A.J.; LISLE, G.W.; JACOB, H.B. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 83-94, 1994.

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

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

CORRÊA, W. M. & CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. 843 p.

CORRY, J. E. L. & HINTON, M. H. Zoonoses in the meat industry: a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 45, n. 4, p. 457-479, 1997.

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

COULIBALY, N. D. & YAMEOGO, K. R. Prevalence and control of zoonotic diseases: collaboration between public health workers and veterinarians in Burkina Faso. **Acta Tropica**, v. 76, p. 53-57, 2000.

COUSINS, D.V. & ROBERTS, J.L. Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis the battle for freedom and beyond. **Tuberculosis**, v. 81, p. 5-15, 2001.

DE KANTOR, I.N. & RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 5-14, 1994.

DORMANDY, T. **The white death: a history of tuberculosis**. 3 ed. London: Hambledon & London, 2002. 448 p.

DUNLOP, R.H.& WILLIAMS, D.J. **Veterinary Medicine: An Illustrated History**. Saint Louis: Mosby, 1996. 692 p.

DVORSKA, L.; MATLOVA, L.; BARTOS, M.; PARMOVA, I.; BARTL, J.; SVASTOVA, P.; BULL, T.J.; PAVLIK, I. Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 239-250, 2004.

ESSEY, M.A. & KOLLER, M.A. Status of bovine tuberculosis in North America. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p.15-22, 1994.

FERREIRA NETO, J.S. & BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**, v. 11, p. 9-13, 1997.

FISANOTTI, J. C.; ALITO, A.; BIGI, F.; LATINI, O.; ROXO, E.; CICUTA, M. E.; KANTOR, I. N.; CATALDI, A.; ROMANO, M. I. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from South América. **Veterinary Microbiology**, v. 60, p. 251-257, 1998.

GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P.; PARKHILL, J.; BARRELL, B.G.; COLE, S.T.; GORDON, S.V.; HEWINSON, R.G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, June 24, v.100, n. 13, p.7877–7882, 2003. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1130426100 Acesso em 26 de nov. 2004.

GIL, J. I. **Manual de inspeção sanitária de carnes: aspectos especiais: volume II**. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. 653 p.

GORMLEY, E. & COLLINS, J.D. The development of wildlife control strategies for eradication of tuberculosis in cattle in Ireland. **Tubercle and Lung Disease**, v. 80, p. 229-236, 2000.

GRANGE, J.M. & YATES, M.D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 137-151, 1994.

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, n. 3-4, p. 187-195, 2004.

JONES, T.C.; HURT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals: volume II**. 4 ed. San Diego: Academic Press, p. 641-652, 1993.

KAUFMANN, S.H.E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 20-30, 2001.

LAGE, A. P.; LOBATO, F.C.F.; MOTA, P.M.P.C.; GONGALVES, V. S. P. **Atualização em tuberculose bovina**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998. 65 p.

LANGENEGGER, J., LEITE, O.G., OLIVEIRA, S. Tratamento intermitente da tuberculose bovina com isoniazida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, p. 55-59, 1991.

LEITE, C.Q.F.; ANNO, I.S.; LEITE, S.R.A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, p.319-323, 2003.

LEITE, C.Q.F.; SOUZA, C.W.O.; LEITE, S.R.A. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 801-805, 1998.

LEMOES, R.A.A. **Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico**. Campo Grande: Editora UFMS, 1998. 536 p.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3th ed. New York: McGraw Hill, 1968.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360 p.

MATO GROSSO, INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE MATO GROSSO. **Legislações de defesa e inspeção sanitárias, dados cadastrais e epidemiológicos atualizados em 2005**. Disponível em: <http://www.indea.mt.gov.br>. Acesso em 04 mai. 2005.

MCILROY, S.G.; NEILL, S.D.; MCCRACKEN, R.M. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. **Veterinary Records**, v. 118, p. 718-721, 1986.

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

MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. São Paulo: Editora Pedagógica Universal, 1980. 277 p.

MICHALANY, J. **Anatomia Patológica Geral na Prática Médico-Cirúrgica**. São Paulo: Editora Artes Médicas, 1995. 319 p.

MODA, G.; DABORN, C.J.; GRANGE, J.M.; COSIVI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tubercle and Lung Disease**, v. 77, p.103-108, 1996.

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

MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.153-177, 1994.

MOTA, P. M. P .C.; MOTTA, P. M. C.; LOBATO, F. C. F.; LAGE, A. P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LEITE, R. C. Avaliação do tratamento com isoniazida em bovinos infectados naturalmente pelo *Mycobacterium bovis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 581-588, 2004.

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.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.G.; HANNA, J. Pathogenesis of

Mycobacterium bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 41-52, 1994.

O'REILLY, L.M. & DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, p. 1-46, 1995.

PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONCA, L. J. P. Isolamento de *Mycobacterium spp.* do leite de vacas suspeitas e positivas para tuberculose. **Brazilian Journal Veterinary Reseach Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.

PERUMALLA, V. S.; ADAMS, L. G.; PAYEEUR, J.; BACA, D.; FICHT, T. A. Molecular fingerprint confirms extensive cow-to-cow intra-herd transmission of a single *Mycobacterium bovis* strain. **Veterinary Microbiology**, v. 70, n. 3-4, p. 269-276, 1999.

PILLAI, S.D.; WIDMER, K.W.; IVEY, L.J.; COKER, C.K.; NEWMAN, E.; LINGSWEILER, S.; BACA, D.; KELLEY, M.; DAVIS, D.S.; SILVY, N.J.; ADAMS, L.G. Failure to identify non-bovine reservoirs of *Mycobacterium bovis* in a region with a history of infected dairy-cattle herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 43, p. 53-62, 2000.

POLLOCK, J.M.; McNAIR, J.; WELSH, M.D.; GIRVIN, R.M.; KENNEDY, H.E.; MACKIE, D.P.; NEILL, S.D. Immune responses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1-2, p. 103-107, 2001.

POLLOCK, J.M. & NEILL, S.D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, v.163. p.115-127, 2002.

PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888 – 1988, conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, p. 357-399, 1988.

REICHMAN, L. & TANNE, J. H. **Timebomb: the global epidemic of multi-drug-resistant tuberculosis**. 1 ed. New York: McGraw-Hill, 2003. 320 p.

ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 18, p. 101-108, 1997.

SCHENK, M.A.M. & SCHENK, J.A.P. Prevalência de tuberculose, cisticercose e hidatidose em bovinos abatidos nos matadouros frigoríficos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (1974 a 1979). **A Hora Veterinária**, v.1, n. 5, p. 28-31, 1982.

SHIRIMA, G. M.; KAZWALA, R.R.; KAMBARAGE, D. M. Prevalence of bovine tuberculosis in cattle in different farming systems in the eastern zone of Tanzania. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, p. 167-172, 2003.

SLAUSON, D.O & COOPER, B.J. **Mechanisms of disease a textbook of comparative general pathology**. 3 ed. Missouri: Mosby, 2002. 445 p.

SOUZA, A.V.; SOUSA, C.F.A.; SOUZA, R.M.; RIBEIRO, R.M.P.; OLIVEIRA, A.L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 59, p. 22-27, 1999.

THOEN, C. O.; KARLSON, A. G.; HIMES, E. M. Mycobacterial infections in animals. **Emerging Infectious Disease**, v.3, p.960-972, 1981.

THOMSON, R. G. **Patologia veterinária especial**. São Paulo: Manole, 1990. 753 p.

TWEDDLE, N.E. & LIVINGSTONE, P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 23-39, 1994.

WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; OLSEN, S. C.; SACCO, R. E.; WHIPPLE, D. L. Immune responses of elk to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin vaccination. **Vaccine**, v. 21, p. 1518-1526, 2003.

WEDLOCK, D.N.; SKINNER, M.A.; LISLE, G.W.; BUDDLE, B.M. Control of *Mycobacterium bovis* infection and the risk to human populations. **Microbes and Infection**, v.4, p. 471-480, 2002.

WICKOFF III, J.H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.395-415, 2002.

WOOD P.R. & JONES S.L. Bovigam: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, p. 147-155, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **53^a World Health Assembly WHA53.15. Safety food:** Switzerland, 2000, Geneva. Disponível em: http://www.who.int/gb/s/s_wha53.html. Acesso em 12 jan. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) / Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) / Office International des Epizooties (OIE). **Report on consultation on animal tuberculosis vaccines:** Switzerland, 1994. Geneva: WHO / Communicable Diseases Surveillance, Control, Prevention and Eradication / Veterinary Public Health: WHO/CDS/VPH/94.138.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th edition, 2004: Chapter 2.3.3. Bovine tuberculosis.** Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00054.htm. Acesso em 10 jan. 2005

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 spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, 2001.

3 ARTIGO

Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil.

(Occurrence of tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in slaughtered cattle at abattoirs in Mato Grosso State, Brazil)

F.H.P. Salazar¹, P.P. Pires², O. C. Ribeiro³, C. Q. F. Leite⁴, A. L. A. R. Osório⁵, K. S. G. Jorge⁵, R. A. A. Lemos⁵, E.B. Guimarães⁵.

¹Programa Mestrado em Ciência Animal - UFMS

²Embrapa-Centro Nacional de Gado de Corte - Campo Grande/ MS

³Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal

⁴Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp - Araraquara/SP

⁵Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UFMS

Caixa Postal 549 CEP 79070-900 – Campo Grande MS

Fone /Fax (67) 3345 3600; e-mail: ebg@nin.ufms.br

RESUMO

A tuberculose bovina causa prejuízos à pecuária e risco à saúde pública. Este trabalho objetivou associar recursos diagnósticos complementares ao exame *post mortem*. Foram examinados 57641 animais abatidos entre novembro de 2004 e agosto de 2005 em três matadouros-frigoríficos sob Inspeção Estadual, dos quais 27 (0,05%) foram condenados por apresentarem linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose, que foram avaliados histopatológica, bacteriológica e molecularmente. A histopatologia revelou lesões granulomatosas características de tuberculose em 23 (85,2%) das amostras. Entre 24 a 87 dias de cultivo, seis (22,2%) amostras apresentaram isolamento de colônias com morfologia compatível com *Mycobacterium bovis*. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise da PCR por enzimas de restrição (PRA) possibilitaram identificar o gênero *Mycobacterium* em todas as seis amostras isoladas, sendo quatro (66,7%) amostras, a espécie *Mycobacterium bovis*, e uma, a subespécie *Mycobacterium paratuberculosis*. Em nenhuma das 27 amostras clínicas foi determinada a etiologia pela PCR. Os resultados permitem concluir que a tuberculose causada por *M. bovis* está presente em bovinos de corte do Estado de Mato Grosso. A otimização das técnicas de isolamento e de padronização dos métodos moleculares para estabelecimento de diagnóstico definitivo a partir de amostras clínicas é uma área demandante de pesquisa.

Palavras-chave: Histopatologia, isolamento bacteriano, reação em cadeia da polimerase, *Mycobacterium paratuberculosis* e *Mycobacterium bovis*.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis causes losses to the livestock industry and public health hazards. The purpose of this paper was to add complimentary diagnostic tools to *post mortem* examination. A number of 57641 animals, all slaughtered at three officially inspected packing plants, were examined from November 2004 to August 2005. Out of those carcasses, the 27 (0,05%) that were condemned by presenting lymph node lesions suggestive of tuberculosis were evaluated

through pathological, bacteriological and molecular techniques. Granulomatous lesions, compatible with those described for tuberculosis, were present in 23 samples (85.2%). In six samples (22.2%), colonies morphologically compatible with *Mycobacterium bovis* were observed after the 24th up to the 87th days of bacterial culturing in specific medium. Polymerase chain reaction (PCR) and PCR analysis by restriction enzymes (PRA) allowed *Mycobacterium* identification in all those six isolated samples. *Mycobacterium bovis* was the species identified in four samples (66.7%) and *Mycobacterium paratuberculosis* in another one. In none of the 27 clinical samples etiology was determined by PCR. The results allowed a conclusion that tuberculosis caused by *M. bovis* is present in the beef cattle population in the Brazilian State of Mato Grosso. Isolation and standardized molecular techniques optimization toward definitive diagnostic procedures in clinical samples are a demanding area of research.

Key-words: Histopathology, bacterial isolation, polimerase chain reaction, *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium bovis*.

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é alvo de recente programa oficial regulamentado por autoridades sanitárias brasileiras, pois além de causar prejuízos à pecuária é zoonose impactante na saúde pública (Brasil, 2004).

O Brasil detém atualmente o maior rebanho comercial do mundo, com aproximadamente 195 milhões de bovinos, dos quais, em torno de 26 milhões estão no Estado de Mato Grosso. Outrossim, o País figura entre os maiores exportadores de carne bovina *in natura*. Mas, paradoxalmente, o abate clandestino ainda é responsável por aproximadamente metade do total de bovinos abatidos para consumo interno. Da mesma forma, quase metade da produção brasileira de leite, não recebe um processamento adequado antes de ser fornecida para a população (Alves, 2001; Leite et al., 2003; Mato Grosso, 2005).

A partir de 2004 com a aplicação do Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), foram garantidos e padronizados a qualidade dos instrumentos e ações profiláticas, de diagnósticos, de saneamento de rebanhos, e de vigilância sanitária ativa, relacionadas ao combate a estas zoonoses, visando aumentar a oferta de produtos de baixo risco para a saúde pública (Brasil, 2004).

Objetivando proporcionar maior consistência à vigilância da tuberculose bovina em Mato Grosso, associaram-se os recursos diagnósticos disponíveis para a identificação de *Mycobacterium bovis* a partir de lesões sugestivas de tuberculose diagnosticadas durante o exame *post mortem* em matadouros-frigoríficos sob Inspeção Estadual.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram examinados 57.641 bovinos, sadios ao exame *ante mortem*, procedentes de 13 municípios mato-grossenses (Apêndice 1), abatidos entre novembro de 2004 e agosto de 2005 em três matadouros-frigoríficos sob Inspeção Estadual.

As carcaças que apresentaram lesões sugestivas de tuberculose durante o exame *post mortem* foram destinadas à esterilização pelo calor, de acordo com o caput do Artigo 185 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Serviço de Inspeção Sanitária Estadual de Mato Grosso - RIISPOA/SISE/MT (Mato Grosso, 2005).

Vinte e sete foram as carcaças que apresentaram linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose. De cada uma dessas carcaças, uma amostra foi colhida para histopatologia e uma para microbiologia e provas moleculares. Constituíram-se então 27 amostras fixadas em formol a 10%, e 27 amostras congeladas. As amostras fixadas constaram-se de linfonodos abertos e as congeladas de linfonodos não cortados, para evitar contaminação, encaminhadas respectivamente, aos laboratórios de anatomia patológica e micobacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFMS, acompanhadas de uma guia de encaminhamento (Apêndice 2).

As 27 amostras destinadas à histopatologia foram fotografadas e recortadas, dando lugar a fragmentos com espessura máxima de 8,0 mm, abrangendo a área lesada, a área de transição e o tecido aparentemente normal. As peças foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina, microtomizadas a 4 µm, sendo obtidas três lâminas histológicas de cada amostra (Behmer et al., 1976).

Uma lâmina foi corada pela hematoxilina-eosina de Harris (HE) com o propósito de observar lesões histológicas. Uma foi submetida à coloração de Ziehl-Neelsen-Faraco (ZNF), juntamente com controles positivo e negativo para que fosse investigada a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Uma foi corada com argênteo-metenamina de Gomori-Grocott (AMG), com o objetivo de evidenciar a presença de estruturas micóticas. Quando examinadas à microscopia de luz, as alterações histopatológicas, os bacilos álcool-ácido resistentes e as estruturas micóticas evidenciadas, foram fotomicrografadas (Behmer et al., 1976).

As 27 amostras congeladas foram descontaminadas pelo método de Petroff, cultivadas em tubos com meio de Stonebrink e incubadas em estufa a 37°C. As culturas foram verificadas semanalmente, durante 90 dias, objetivando observar crescimento de colônias bacterianas com morfologia típica de micobactérias. As colônias isoladas foram fotografadas e

submetidas à baciloscopia, depois de coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen (ZN), para evidenciar a presença de BAAR (CPZ, 1988; Corner, 1994).

As provas moleculares foram realizadas nos laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Araraquara/SP.

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) nas 27 amostras clínicas descontaminadas pelo método de Petroff, utilizaram-se duas estratégias para extração do DNA. Na **primeira**, foram utilizados 300 microlitros (μl) de cada amostra, adicionados de 300 μl de tampão tetrítion 1% (TE), em cada tubo *ependorf*, os quais foram aquecidos a 100°C/10 minutos (min), em seguida resfriados a -20°C/10 min, repetindo-se o procedimento por três vezes, com o objetivo de promover a lise celular. Ao final foram mantidos congeladas por uma noite. Na sequência, foram centrifugadas a 12000 rpm/10 min. O sobrenadante foi pipetado e desprezado e o precipitado de cada tubo ressuscitado em 300 μl de H₂O MiliQ e o volume transferido para novos 27 tubos, centrifugados a 12000 rpm/10 min, desprezando-se novamente o sobrenadante e adicionando-se 100 μl de H₂O MiliQ ao precipitado. Os tubos foram em seguida estocados a -20°C, para posterior amplificação do DNA (Rodriguez et al., 1995; Jordão Junior, 2004).

Na **segunda estratégia**, empregou-se protocolo idêntico à primeira até a etapa de lise celular. A partir daí, o DNA foi extraído adicionando-se 500 μl de fenol/clorofórmio/etanol (25:24:1), em 300 μl de cada amostra. Em seguida, os tubos foram agitados por inversão, durante 10 min, e centrifugados a 12000 rpm/10 min, em centrífuga refrigerada. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novo tubo, e acrescido igual volume de clorofórmio/etanol (24:1). Em seguida, os tubos foram agitados por inversão, durante 10 min, e centrifugados a 12000 rpm/10 min, em centrífuga refrigerada. Em seguida, os tubos foram agitados por inversão, durante 10 min, e centrifugados a 12000 rpm/10 min, em centrífuga refrigerada. Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo. Os tubos foram mantidos abertos até a evaporação total do etanol e em seguida, o precipitado de cada tubo foi ressuscitado com 100 μl de H₂O MiliQ. Os tubos foram estocados a -20°C, para posterior amplificação do DNA (Jordão Júnior, 2004).

Para as PCRs dos produtos de ambas as estratégias de extração do DNA das 27 amostras clínicas, empregaram-se os *primers* JB21 (5'- TGCTCCGCTGATGCAAGTGC-3') e JB22 (5'-CGTCCGCTGACCTCAAGAAG -3'), específicos para *M. bovis*, amplificando produto de 500 pares de bases (pb) (Rodriguez et al., 1995).

Microtubos de 500 μl , contendo volume total de 25,5 μl em cada um, sendo: 22 μl de PCR supermix (*Promega*®), 0,25 μl de *primer* JB21, 0,25 μl de *primer* JB22 e 3,0 μl da amostra de DNA (*template*), após homogeneização, foram inseridos no termociclador (*MJ Research*,

Inc., modelo PTC 100™), nas seguintes condições: desnaturação a 96°C por 4 minutos; 35 ciclos de anelamento — um minuto a 94°C; um minuto a 64°C; um minuto a 72°C — e extensão a 72°C por 10 minutos. Ao término, as amostras eram mantidas em refrigeração a 4°C. Em seguida, tomavam-se 10 µl de cada amostra, e 5 µl da amostra padrão *M. bovis* AN5, para realizar a eletroforese em cuba (*Horizon*® 11-14) usando tampão TBE (0,04M Tris-acetato e 0,01M EDTA, pH 8,0) a 100 volts por 90 minutos em gel de agarose a 1%, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. O gel foi fotodocumentado em polaróide acoplado ao transiluminador, sob luz ultravioleta. Para determinar o tamanho dos fragmentos de DNA gerados, utilizou-se na eletroforese um marcador de peso molecular (*DNA ladder*) de 100 pb (*Invitrogen*®) (Jordão Junior, 2004).

As estratégias para identificação do microrganismo presente nas amostras que, ao isolamento, apresentaram crescimento pleno, foram duas: a **Análise da PCR por enzimas de restrição**, do inglês, *PCR restriction enzyme analysis* (PRA) amplificando fragmento de 439pb, do gene *hsp65*, identificando a presença de bactérias do gênero *Mycobacterium*. Foram utilizados *primers* Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT-3') (Telenti et al., 1993).

A extração do DNA iniciou-se com a raspagem com haste de madeira autoclavada, das colônias no interior dos tubos contendo meio Stonebrink. O conteúdo retirado era adicionado a 100 µl de tampão TE em *ependorf*, homogeneizado e submetido a três ciclos de aquecimento a 100°C/10 min, seguido de congelamento a -20°C/10 min. Os tubos foram em seguida estocados a -20°C, para posterior amplificação do DNA (Jordão Junior, 2004).

Microtubos de 500 µl, contendo volume total de 26,5 µl em cada um, sendo: 23 µl de PCR supermix (*Promega*®), 0,25 µl de *primer* Tb11, 0,25 µl de *primer* Tb12 e 3,0 µl da amostra de DNA (*template*). Após homogeneização, foram inseridos no termociclador (*MJ Research, Inc.*, modelo PTC 100™), nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 10 minutos; 45 ciclos de anelamento — um minuto a 94°C, um minuto a 60°C; um minuto a 72°C — e extensão do DNA a 72°C por 5 minutos. Ao término, as amostras eram mantidas em refrigeração a 4°C. Em seguida, tomavam-se 10 µl de cada amostra para realizar a eletroforese em cuba (*Horizon*® 11-14) usando tampão TBE a 100 volts por 90 minutos em gel de agarose a 1%, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

O gel foi fotodocumentado em polaróide acoplado ao transiluminador, sob luz ultravioleta. Para determinar o tamanho dos fragmentos de DNA gerados, utilizou-se na eletroforese um marcador de peso molecular (*DNA ladder*) de 100 pb (*Invitrogen*®) (Jordão Junior, 2004).

Em seguida, das amostras que apresentaram amplificação, tomaram-se 10 µl em microtubos *ependorf* para submetê-las à digestão enzimática, adicionado-se 0,5 µl da enzima de restrição BstE II (*Boehringer Mannheim*®), mais 2 µl de tampão TE e 7,5 µl de H₂O MiliQ. Após homogeneização foram incubados a 60°C em estufa, por uma hora.

Das mesmas amostras anteriores, foram tomados outros 10 µl, e adicionados a 0,5 µl da enzima de Hae III (*Invitrogen*®), mais 2 µl de tampão TE e 7,5 µl de H₂O MiliQ. Após homogeneização foram incubados a 37°C em estufa, por uma hora (Telenti et al., 1993).

A digestão dos produtos gerou fragmentos analisados por eletroforese em gel agarose a 4%, com marcadores de peso molecular de 25 pb (*Invitrogen*®) e 50 pb (*Invitrogen*®) e logo após foi feita avaliação dos fragmentos utilizando o programa *Image Master VDS software version 3.0 pharmaciabiotech*. A análise dos padrões de restrição, para identificar a espécie de *Mycobacterium*, utilizou o Praside (Praside, 2005).

A outra estratégia aplicada às colônias isoladas, pois o PRA determinaria até o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, foi a realização da PCR, buscando identificar *M. bovis*. O *template* obtido anteriormente para o PRA, foi adicionado nesta prova aos *primers*, JB21 e JB22, para amplificação de produto de 500 pb. A mistura da reação consistiu em um volume final de 26 µl, composto de: 22,5 µl de PCR supermix (*Promega*®), 0,25 µl de cada *primer* e 3 µl de *template*.

Após homogeneização, a mistura foi submetida à amplificação em *termociclador* (*MJ Research, Inc.*, modelo PTC 100TM) em configuração idêntica à realizada para PCR das amostras clínicas, acima mencionada. Após amplificação, tomavam-se 10µl de cada amostra e 5µl da amostra padrão *M. bovis* AN5, para realizar a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. O gel foi fotodocumentado em polaróide acoplado ao transiluminador, sob luz ultravioleta. Para determinar o tamanho dos fragmentos de DNA gerados, utilizou-se na eletroforese um marcador de peso molecular (*DNA ladder*) de 100 pb (*Invitrogen*®) (Jordão Junior, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ocorrência de tuberculose observada durante o exame *post mortem* em 57.641 bovinos abatidos em Mato Grosso, foi de 0,05%, correspondente aos 27 bovinos que apresentaram lesões sugestivas da doença (Tab. 1).

Tabela 1. Ocorrência de lesão presuntiva de tuberculose diagnosticada durante o exame *post mortem* de bovinos abatidos, no período de novembro de 2004 a agosto de 2005, em três matadouros-frigoríficos do Estado de Mato Grosso.

Município	Bovinos abatidos	Ocorrência de bovinos com lesão presuntiva de tuberculose	
		Nº	%
Barra do Garças	21.552	13	0,06
Sinop	9.623	10	0,10
Várzea Grande	26.466	04	0,01
Total	57.641	27	0,05

Esta ocorrência encontrada em Mato Grosso é semelhante à descrita por Almeida (2004), que relatou o achado de 63 casos, correspondendo a 0,013% de 483.047 bovinos abatidos em Mato Grosso do Sul. Outrossim, está próxima às taxas de prevalência da doença, de 0,08% e 0,04%, encontradas por Baptista et al. (2004), em Minas Gerais e Goiás, respectivamente. Por outro lado, Schenk & Schenk (1982) relataram taxa de prevalência de 0,2%, de tuberculose em bovinos abatidos em Mato Grosso do Sul; Andrade et al. (1991) de 0,64%, no Rio Grande do Sul e De Kantor & Ritacco (1994) descreveram uma taxa de 0,14% de comprometimento por tuberculose de bovinos abatidos em todo o Brasil. Apesar das muitas pesquisas pertinentes ao tema, todas são pontuais, não havendo um estudo atualizado com abrangência nacional, sobre a prevalência da tuberculose bovina em matadouros-frigoríficos. No presente estudo, durante o exame *post mortem* foram identificados 55 linfonodos com lesões presuntivas de tuberculose (Fig. 1), em 27 bovinos cujas carcaças foram destinadas à esterilização pelo calor. Os linfonodos acometidos eram os localizados nas regiões da cabeça, cavidade torácica e carcaça, com distribuição de acordo com a (Tab.2). O percentual de 41,8% de acometimento dos linfonodos da carcaça, observado neste estudo, extrapola os publicados por Corner (1994) e Freitas et al. (2001) que encontraram respectivamente, 3,6% e 9,6%, de linfonodos da carcaça com lesões sugestivas de tuberculose. De acordo com Araújo (2004), o elevado percentual de lesões sugestivas de tuberculose identificadas em linfonodos da carcaça está, evidentemente, relacionada à maior atenção dispensada pelos médicos veterinários inspetores a estes linfonodos, especialmente aos pré-escapulares. Assim, o resultado obtido nesta pesquisa é mais condizente aos dados reportados por Jorge (2001) e Araújo (2004) que observaram, respectivamente, 30,6% e 35,7% das lesões em linfonodos da carcaça.

Tabela 2. Distribuição de lesões sugestivas de tuberculose em linfonodos de 27 bovinos detectadas pela inspeção sanitária no período de novembro de 2004 a agosto de 2005.

Localização anatômica	Lesão sugestiva de tuberculose	
	Nº	(%)
Linfonodos da cabeça (parotídeo e retrofaríngeo)	17	(30,9)
Linfonodos da cavidade torácica (apical e traqueobrônquico)	15	(27,3)
Linfonodos da carcaça (pré-peitoral e pré-escapular)	23	(41,8)
Total	55	(100,0)

No diagnóstico histopatológico, a coloração com HE evidenciou em 23 (85,2%) das amostras um processo inflamatório do tipo granulomatoso, característico da tuberculose. Os granulomas se apresentavam em diferentes estádios de evolução sendo, os mais antigos, envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo cicatricial. Adjacente à cápsula havia infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente de macrófagos com presença de poucos linfócitos. Internamente à cápsula eram observadas células epitelíóides com abundante citoplasma eosinofílico espumoso e dispostas, em sua maioria, em paliçadas. Além destas, também foram observadas células multinucleadas, com núcleos dispostos periféricamente, denominadas células gigantes tipo Langhans. A região central dos granulomas era caracterizada por intenso processo necrótico, e pela presença de material amorfo basofílico, correspondentes, respectivamente, à necrose de caseificação e calcificação distrófica (Fig. 2). Estas características, coincidem com as descritas por outros autores para o granuloma típico da tuberculose (Jones et al., 2001).

A taxa de lesões granulomatosas características da tuberculose encontrada nesta pesquisa, foi semelhante às encontradas por Andrade et al. (1991), Jorge (2001) e Almeida (2004) que observaram respectivamente, estas lesões histopatológicas em 92,4%, 80,5% e 74,6%, das amostras avaliadas. De acordo com Andrade et al. (1991), estes percentuais mostram confiabilidade no diagnóstico *post mortem* realizado em frigoríficos.

Em três (11,1%) das amostras coradas com HE, evidenciaram-se lesões com estrutura constituída por cápsula conjuntiva fibrosa vascularizada, envolvendo um conteúdo composto predominantemente por neutrófilos, restos celulares e substância amorfa, caracterizando necrose do tipo liquefativa, características estas, segundo Jones et al. (2001), compatíveis com abscesso.

Em uma das amostras (3,7%) corada com HE, foram observadas, na região central do granuloma, drusas, também denominadas “material de *Splendore-Hoeppli*”, formadas de estruturas periféricas eosinofílicas em forma de baquetas. As drusas, por sua vez, eram

envoltas por abundante infiltrado inflamatório mononuclear composto, predominantemente, por macrófagos e poucos linfócitos, sendo que grande parte dos macrófagos estavam diferenciados em células eptelióides (Fig. 3). Todas estas estruturas eram circundadas por tecido conjuntivo.

A presença de colônias de hifas micóticas septadas e ramificadas, cujos contornos eram corados em preto, e estavam dispersas irregularmente no interior das drusas, (Fig. 3) foi revelada nesta amostra, após realização da coloração com argênteo-metenamina de Gomori-Grocott (AMG). Estes achados são compatíveis aos descritos por Jones et al. (2001) em granulomas micóticos.

A coloração pelo método ZNF revelou a presença de BAAR corados em vermelho distribuídos difusamente ou no interior de macrófagos, apenas no controle positivo (Fig. 4), não sendo evidenciados em nenhuma das 27 amostras. Este resultado difere daqueles encontrados por Andrade et al. (1991), Pinto et al. (2002) e Martins (2004) que observaram BAAR em 9,1%, 50% e 70% das amostras histológicas examinadas, respectivamente.

Entretanto, é um resultado idêntico ao encontrado por Miguel et al. (2005) que afirmam não terem encontrado BAAR em amostras de tecidos apresentando lesões sugestivas de tuberculose. Esta variabilidade de resultados foi mencionada em CPZ (1988), por Andrade et al. (1991) e mais recentemente por Ayele et al. (2004), quando relatam que em tecidos, especialmente de bovinos, a não observação de BAAR em lesões pode, freqüentemente, ocorrer especialmente nos casos de baixa concentração de bacilos na lesão examinada.

Seis (22,2%) amostras, dentre as 27 cultivadas em meio de Stonebrink, evidenciaram, entre 24 a 87 dias de cultivo, crescimento de colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo-pálido, com borda irregular e superfície granular (Fig.5) que, de acordo com CPZ (1988) e Corner (1994), são características compatíveis as colônias de *M. bovis*.

Estudando amostras procedentes de diversos estados brasileiros, Andrade et al. (1991), Jorge (2001), Pinto et al. (2002), Leite et al. (2003) e Araújo (2004) utilizaram este método microbiológico, e obtiveram respectivamente (40/59) 67,8%, (13/45) 28,9%, (6/50) 12%, (15/22) 68,2% e (17/72) 23,6% de isolamento micobacteriano.

Apesar do método de preparação das amostras para isolamento, requerer um processo de descontaminação agressivo, com bruscas variações no pH, visando a eliminação de contaminantes, mas também dificultando a recuperação do *M. bovis*, segundo Corner (1994), é considerado o diagnóstico “padrão ouro” para micobactérias.

A aplicação da técnica de coloração de ZN em lâminas com esfregaço de colônias, revelou a presença de BAAR nas seis (100%) amostras que apresentaram isolamento bacteriano. Este resultado é idêntico aos obtidos por Jorge (2001) e Araújo (2004). Também aplicando esta

técnica, Andrade et al. (1991) e Pinto et al. (2002) observaram BAAR em 27,5% e 50% respectivamente, em esfregaços dos cultivos com isolamento de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium sp.*

A análise por PCR nas 27 amostras clínicas não revelou o fragmento de 500pb (Fig.6) indicativo de *M. bovis*. Este resultado reforça o conceito de Ayele et al. (2004) que consideraram o cultivo diagnóstico padrão ouro aceito internacionalmente para micobactérias. Os autores mencionaram a necessidade de padronização para provas moleculares, aplicadas às lesões sugestivas de tuberculose, pois a presença de inibidores, à exemplo dos íons metálicos e contaminantes, tem se tornado ponto crítico da PCR. Esta problemática para padronização é particularmente observada quando se pesquisam amostras clínicas, que especialmente em bovinos tuberculosos apresentam pequenas quantidades de bacilos. Jordão Junior (2004), pesquisando amostras de leite, também não conseguiu amplificar por PCR o fragmento de 500pb diretamente.

Das seis amostras provenientes de isolamentos de colônias, todas amplificaram o fragmento de 439pb no PRA (Fig.7), indicando que as amostras testadas continham bactérias do gênero *Mycobacterium*.

A análise dos padrões de restrição, de fragmentos de DNA de diferentes pesos moleculares, revelou resultados conforme (Fig.7) e (Tab.3).

Tabela 3. Resultados encontrados por meio da análise da PCR por enzimas de restrição (PRA).

Amostras de colônias	Valores dos pesos Moleculares		Padrão PRA da base de dados PRASITE
	BstE II	Hae III	
1	440/0/0	115/0/0	<i>Mycobacterium sp.</i>
2	235/210	130/105	<i>M. avium spp. paratuberculosis</i>
3	235/115/85	150/125/70	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
4	235/115/85	150/125/70	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
5	235/115/85	150/125/70	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
6	235/115/85	150/125/70	Complexo <i>M. tuberculosis</i>

PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>)

Na amostra 1 não foi possível a determinação da espécie de *Mycobacterium* porque a fragmentação do DNA por digestão enzimática foi parcial, evidenciando somente um fragmento nas colunas das enzimas BstE II e Hae III (Fig. 7).

Na amostra 2, foi possível identificar o *M. avium spp. paratuberculosis*. Apesar de ainda não ser reconhecida oficialmente no Brasil a ocorrência desta micobactéria em animais,

Lilenbaun et al. (2005) reportam o isolamento e identificação deste agente no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul a partir de material colhido de bovinos. De acordo com Driemeier et al. (1999), este microrganismo associa-se à ileocolite granulomatosa, ou doença de Crohn em humanos, e é o responsável pela paratuberculose, ou doença de Johne que se manifesta em ruminantes com mais de dois anos de idade, sem acometimento dos linfonodos retrofaríngeos e mediastínicos. A histopatologia, neste caso, evidencia lesão granulomatosa, geralmente não associada à necrose de caseificação, devendo, por isso, ser diferenciada da tuberculose através da identificação do agente.

A amostra que deu origem à identificação do *M. paratuberculosis* neste estudo, foi proveniente de bovino com mais de 36 meses de idade ao abate, do qual coletaram-se linfonodos pré-peitorais. À histopatologia apresentou granuloma típico da tuberculose e o cultivo estendeu-se por 87 dias, até o aparecimento das primeiras colônias.

As amostras 3, 4, 5, e 6 apresentaram padrão do complexo *M. tuberculosis* no PRA, e quando submetidas à PCR amplificaram o fragmento de 500 pb da mesma maneira que a amostra de *M. bovis* AN5, utilizada como controle positivo (Fig.8), confirmando a presença do *M. bovis* pela PCR em quatro (66,7%) das seis amostras isoladas. Este resultado foi idêntico ao obtido por Leite et al. (2003) que identificou *M. bovis* pela PCR em 10 (66,7%) de 15 amostras isoladas a partir de lesões sugestivas de tuberculose.

Os resultados obtidos nesta pesquisa por meio do PRA e da PCR quando realizados a partir de colônias mostraram alta eficiência, pois identificaram todas as seis amostras, sendo uma na subespécie, quatro na espécie e uma no gênero. Araújo et al. (2005) utilizando estas duas técnicas para identificação de 17 colônias, encontrou em 13 (76,4%) a espécie *M. bovis*. Duas foram identificadas como do complexo *M. tuberculosis* e duas da espécie *M. fortuitum*. Estes resultados tornam patente a importância das provas moleculares no diagnóstico da tuberculose bovina. Todos os resultados obtidos neste estudo estão sumarizados na (Tab. 4).

Tabela 4. Representação dos resultados de histopatologia, bacteriologia e biologia molecular obtidos em amostras de linfonodos com lesões sugestivas de tuberculose observadas durante o abate de bovinos em matadouros-frigoríficos de Mato Grosso no período compreendido entre novembro/2004 e agosto/2005.

Amostra	HE	ZNF	AMG	Isolamento bacteriano			PCR linfonodo
				dias	Zn	PCR/PRA colônias	
01	Granuloma	-	-	31	Baar+	Mycobacterium	-
02	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
03	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
04	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
05	Abscesso	-	-	*	Na	Na	-
06	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
07	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
08	Abscesso	-	-	*	Na	Na	-
09	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
10	Granuloma	-	-	87	Baar+	<i>M. paratuberculosis</i>	-
11	Granuloma	-	-	24	Baar+	<i>M. bovis</i>	-
12	Granuloma	-	-	31	Baar+	<i>M. bovis</i>	-
13	Granuloma	-	-	31	Baar+	<i>M. bovis</i>	-
14	Drusa	-	Hifas	*	Na	Na	-
15	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
16	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
17	Granuloma	-	-	59	Baar+	<i>M. bovis</i>	-
18	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
19	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
20	Abscesso	-	-	*	Na	Na	-
21	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
22	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
23	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
24	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
25	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
26	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-
27	Granuloma	-	-	*	Na	Na	-

HE= Hematoxilina-eosina; ZNF= Ziehl-Neelsen-Faraco; AMG= argênteo-metenamina de Gomori-Grocott; Zn= Ziehl Neelsen; (-) = negativo; Na= Não avaliado; (*) = não houve isolamento; BAAR⁺= bacilo álcool-ácido resistente; PCR= reação em cadeia da polimerase; PRA= análise da PCR por enzimas de restrição



Figura 1. Lesão sugestiva de tuberculose, forma arredondada, bem delimitada, cor amarelo-pálido e consistência firme.

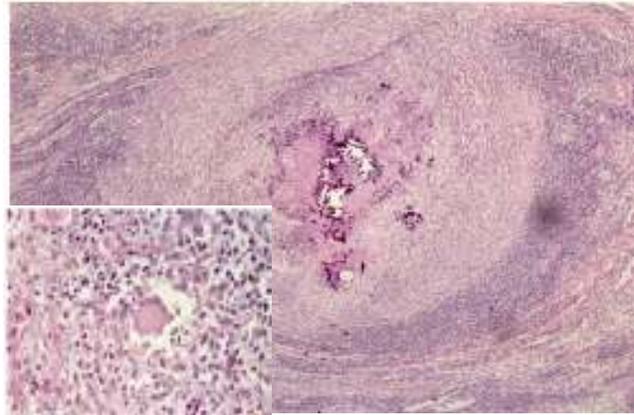


Figura 2. Fotomicrografias; granuloma; cápsula fibrosa; necrose caseosa; calcificação distrófica; HE 40X. Detalhe; célula gigante tipo Langhans; HE 400X.

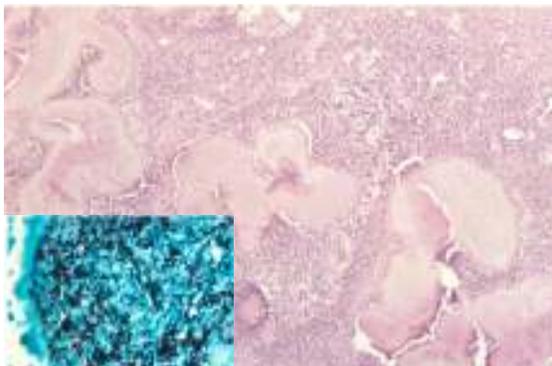


Figura 3. Fotomicrografias; Drusas “material de Splendore-Hoeppli”; HE 40X. Detalhe; hifas micóticas coradas em preto; argênto-metamina de Gomori-Grocott (AMG) 1000X.

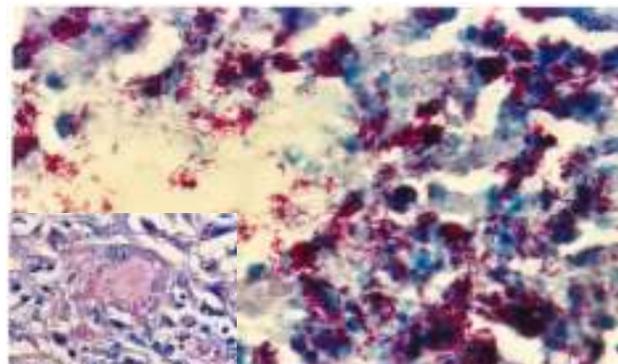


Figura 4. Fotomicrografias; bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) distribuídos difusamente; Ziehl-Neelsen-Faraco (ZNF) 1000X. Detalhe; BAAR no interior de macrófagos; ZNF 400X.



Figura 5. Tubo com meio de Stonebrink; colônias pequenas, arredondadas, cor amarelo-pálido e superfície irregular, morfologia compatível com *Mycobacterium bovis*.



Figura 6. Detecção do PCR utilizando primers JB21 e JB22. A coluna 3 indica o padrão *M. bovis* AN5. As colunas 11 e 24 indicam ladder de 100pb. As demais colunas correspondem às 27 amostras clínicas.

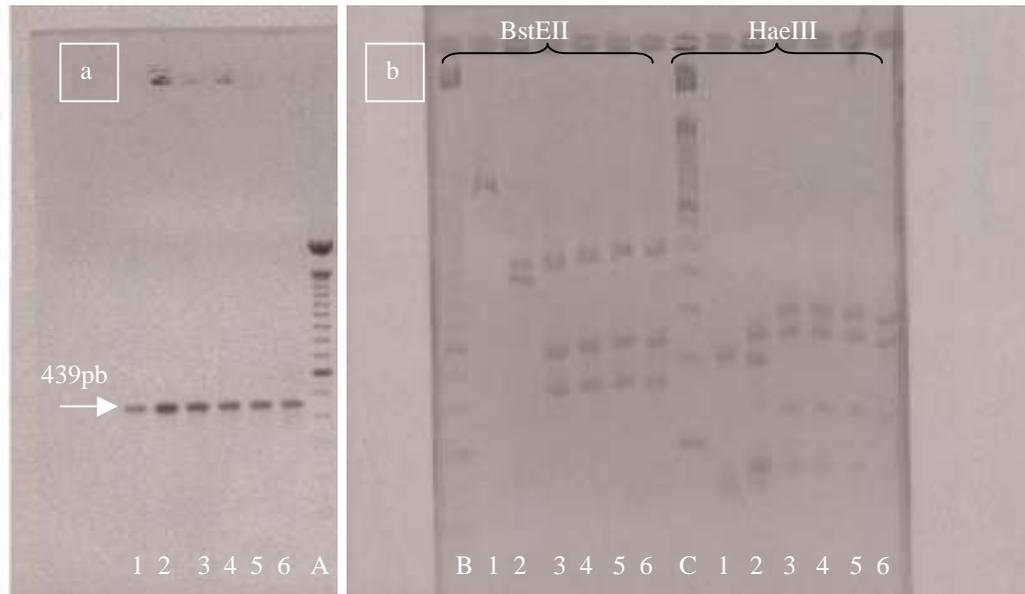


Figura 7. a) Resultado da análise da PCR por enzimas de restrição (PRA) realizada em amostras de colônias, utilizando *primers* Tb11 e Tb12. As colunas 1 a 6, correspondem as amostras que amplificaram fragmento de 439pb do gene *hsp65*, indicativo do gênero *Mycobacterium*. Coluna A indica *ladder* de 100pb. b) Resultado da digestão do fragmento de 439pb pelas enzimas de restrição BstE II e Hae III. Coluna B indica *ladder* de 25pb; C indica *ladder* de 50pb; coluna 1 gênero *Mycobacterium*, coluna 2 subespécie *Mycobacterium paratuberculosis* e colunas 3, 4, 5 e 6 complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

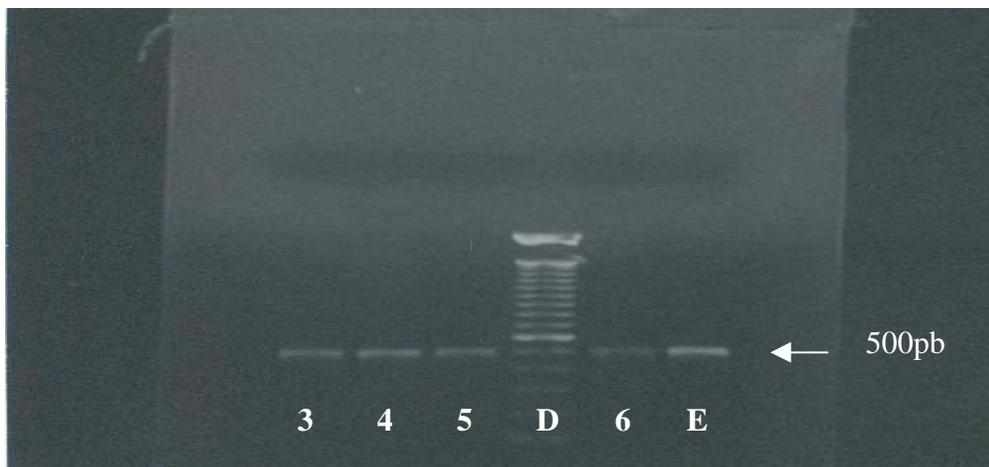


Figura 8. Resultado da detecção do fragmento de 500pb indicativo da espécie *M.bovis* pela PCR, utilizando *primers* JB21 e JB22. Coluna D indica *ladder* de 100pb. Coluna E indica o padrão *M. bovis* AN5. Colunas 3, 4, 5 e 6 correspondem as amostras de colônias que amplificaram o fragmento de 500pb.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que a tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* está presente em bovinos de corte do Estado de Mato Grosso. Também evidenciam a necessidade de otimização das técnicas de isolamento em cultivo, pesquisa de BAAR em granulomas, além da necessidade de padronização dos métodos moleculares para estabelecimento de diagnóstico definitivo a partir de amostras clínicas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. F. C. **Investigação de focos de tuberculose bovina em rebanhos de corte a partir de lesões sugestivas ao abate no Estado de Mato Grosso do Sul.** 2004. 52 p. UFMS. Dissertação de mestrado. Campo Grande, 2004.

AYELE, W. Y.; NEILL, S. D.; ZINSSTAG, J. et al. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. **The International Tuberculosis and Lung Disease**, v.8, n.8, p. 924-937, 2004.

ALVES, D. A. As dificuldades na inspeção de frigoríficos brasileiros no mercado internacional: Um estudo sobre comercialização da carne bovina *in natura*. **Revista Nacional da Carne**, n. 291, p. 96-114, 2001.

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P.V. et al. 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.

ARAÚJO, C. P. **Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação de polimerase em cadeia, a partir do cultivo de lesões sugestivas de tuberculose bovina oriundas de matadouros-frigoríficos de Mato Grosso do Sul, Brasil.** 2004. 59 p. UFMS. Dissertação de mestrado. Campo Grande, 2004.

ARAÚJO, C. P.; LEITE, C. Q. F.; JORGE, K. S. G. et al. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.1-4, 2005.

BAPTISTA, F.; MOREIRA, E. C.; SANTOS, W. L. M. et al. 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.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**, 2004. Brasília

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

CPZ - Centro Panamericano de Zoonosis - **Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis III. Sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas. La identificación de micobacterias**. Buenos Aires, 1988. 63 p.

DE KANTOR, I.N. & RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 5-14, 1994.

DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E. F.; GOMES, M. J. P. et al. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, n. 3-4,

FREITAS, J. A.; GUERRA, J. L.; PANETTA, J. C. Características da tuberculose observada em búfalos abatidos para consumo: aspectos patológicos e identificação de micobacterias. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.38, n. 4, p. 170-176, 2001.

JONES, T.C.; HURT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

JORDÃO JUNIOR, C. M. **Pesquisa de micobactérias em leite de bubalinos**. 2004. 80 p. UNESP. Dissertação de mestrado. Araraquara, 2004.

JORGE, K.S.G. **Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2001. 73 p. UFMS/FIOCRUZ. Dissertação de mestrado. Campo Grande, 2001.

LEITE, C.Q.F.; ANNO, I.S.; LEITE, S.R.A. et al. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, p.319-323, 2003.

LILENBAUM, W.; GOMES, M. J. P.; BARROS, C. S. L. Microbiologia veterinária: Paratuberculose no Brasil e no mundo, ocorrência, epidemiologia, diagnóstico e análise crítica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos. **Anais...**Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005. p. 23.

MATO GROSSO, INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE MATO GROSSO. **Legislações de defesa e inspeção sanitárias, dados cadastrais e epidemiológicos atualizados em 2005**. Disponível em: <http://www.indea.mt.gov.br>. Acesso em 04 mai. 2005 .

MARTINS, S. C. **Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em cortes histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos**. 2004. 46 p. UFMS. Dissertação de mestrado. Campo Grande, 2004.

MIGUEL, L.T.; SOFFIATI, F. L.; SANTOS, S. A. O. et al. Granuloma tuberculóide esplênico em jacaré-do-pantanal (*Caiman yacare*) de criatório comercial da região de Cáceres-MT. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, supl. 1, p. 1-130, 2005.

PINTO, P.S.A.; FARIA, J.E.; VILORIA, M.I.V. et al. 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.

PRASITE. **Identification of mycobacteria**. Hospices cantonaux. 2000. Disponível em: <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>. Acesso em 08 nov. 2005.

RODRIGUEZ, J. G.; MEJIA, G. A.; DEL PROTILLO, P. et al. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. **Microbiology**, v.141, p.2131-2138, 1995.

SCHENK, M.A.M. & SCHENK, J.A.P. Prevalência de tuberculose, cisticercose e hidatidose em bovinos abatidos nos matadouros frigoríficos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (1974 a 1979). **A Hora Veterinária**, v.1, n.5, p.28-31, 1982.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALTZ, M. et al. Rapid identification of micobacteria to the species level by polymerase chain reaction restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.2, p.175-178, 1993.

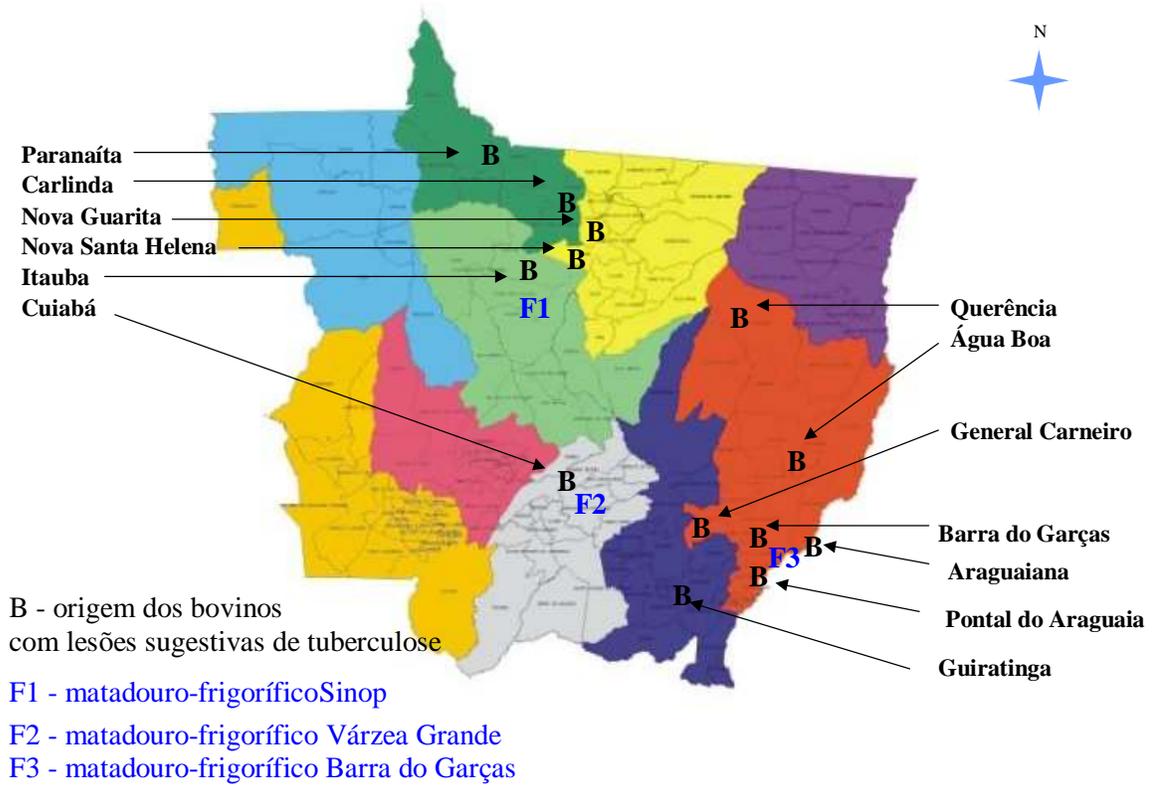
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O exame *post mortem* de rotina, associado a métodos diagnósticos complementares, efetivou a caracterização das lesões presuntivas de tuberculose evidenciando que, a realização da histopatologia, cultivo e isolamento bacteriano e provas moleculares, podem proporcionar o diagnóstico confirmatório da tuberculose bovina em rebanhos de corte no Estado de Mato Grosso.

Considerando o nível crescente de exigência no quesito segurança alimentar, torna-se necessário que, não só as carcaças portadoras de lesões sejam identificadas e condenadas, como também sejam estabelecidos procedimentos de combate às enfermidade dos animais, ainda nas propriedades, através de uma vigilância sanitária eficiente. Para tal, se faz necessária a concatenação dos dados levantados nos serviços de inspeção oficiais com os rastreamentos desenvolvidos pelos serviços de defesa oficiais. Muitas vezes, ambas as atividades de vigilância são realizadas dentro de uma mesma instituição, com banco de dados percorrendo trâmites paralelos.

APÊNDICES

Apêndice 1. Mapa do Estado de Mato Grosso caracterizando a área de estudo.



Apêndice 2. Guia acompanhatória.

GUIA ACOMPANHATÓRIA		
<i>Lesão sugestiva de tuberculose colhida em matadouro-frigorífico</i>		
Data da Colheita:	Número da amostra:	
1 - DADOS DO MATADOURO-FRIGORÍFICO		
Nome do matadouro-frigorífico:		
Endereço:	Nº do SISE :	
Cidade:		
Telefone:	Fax:	e-mail:
Médico veterinário responsável pelo SISE :		
2 - PROCEDÊNCIA DO ANIMAL		
Nome do proprietário:		
Nome da propriedade:		
Município:	Estado de Mato Grosso	
Número do GTA :	Emitido pelo INDEA/MT de:	Data:
3 - DADOS DA AMOSTRA		
Espécie: Bovina	Bubalina	Sexo: M F
Raça: Zebu Europeu leite Europeu corte Mestiço Outras raças		
Idade: até 12 meses 12 a 24 meses 24 a 36 meses mais que 36 meses		
Distribuição das lesões do animal:	Material Colhido:	
Cabeça	Linfonodo parotídeo	
Língua	Linfonodo Retrofaríngeo Linfonodo Sub-lingüal	
Pulmão	Parênquima Linfonodo apical Linfonodo esofágiano	Linfonodos mediastinais Linfonodo traqueobrônquico
Rins	Parênquima	Linfonodo renal
Fígado	Linfonodo hepático Parênquima	
Intestinos	Linfonodos mesentéricos	
Baço	Parênquima	
Linfonodos da carcaça	Costo-cervical Ilíaco Inguinal Isquiático Pré-peitorais	Pré-crural Pré-escapular Poplíteo Sub-escapular Supra-esternal
Outro, qual? Observações.		
<i>Assinatura e carimbo do responsável pelo SISE</i>		
<i>Data do envio da amostra</i>		
Data da chegada da amostra no laboratório da UFMS		

