

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

**TESTES DIAGNÓSTICOS *IN VIVO*, *IN VITRO* E
INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA
TUBERCULOSE BOVINA**

Robson Ferreira Cavalcante de Almeida

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
AGOSTO DE 2004**

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

**TESTES DIAGNÓSTICOS *IN VIVO*, *IN VITRO* E
INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA
TUBERCULOSE BOVINA**

Robson Ferreira Cavalcante de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Ana Liza Alves Rosa Osório

Co-orientador: Dr. Claudio Roberto Madruga

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.

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
AGOSTO DE 2004**

“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ...”

Martin Luther King

1 INTRODUÇÃO

1.1 Conceituação e histórico

A tuberculose bovina é uma doença bacteriana, infectocontagiosa e de evolução crônica, caracterizada por granulomas sugestivos denominados tubérculos, e afeta os animais domésticos e silvestres, sendo o mesmo agente o principal responsável pela transmissão da tuberculose dos animais ao homem (Acha & Szyfres 1986, Corrêa & Corrêa 1992).

O caráter zoonótico da tuberculose bovina começou a ser compreendido no século XIX, quando se observou que havia maior frequência de linfadenites tuberculosas em crianças alimentadas com leite de vaca do que naquelas alimentadas com o leite materno, sugerindo ser o leite a fonte dessa infecção. A confirmação dessa hipótese foi verificada por meio da reprodução da doença em coelhos a partir de leite de vacas doentes. Inicialmente, acreditava-se que existia um único agente para tuberculose, que determinava a doença tanto no homem como nos animais. Entretanto, estudos posteriores revelaram que o bacilo bovino era menor e seu crescimento era mais lento em meio de cultivo. Para o esclarecimento de dúvidas a respeito da natureza da tuberculose bovina e a sua associação com a tuberculose humana, o governo inglês, em 1901, criou a *Royal Comission on Tuberculosis* que trabalhou durante dez anos, e concluiu que existiam dois organismos distintos, um bacilo humano e um bovino, por diferenças apresentadas em cultivo. Foi verificado, também, que as lesões produzidas em humanos tuberculosos eram em parte idênticas as dos bovinos doentes, e que o bacilo bovino era altamente patogênico para humanos. A Comissão relatou que uma considerável proporção de tuberculose em crianças era de origem bovina, em especial as afetadas nos órgãos abdominais e linfonodos cervicais, e que homens adultos poderiam adquirir tuberculose pulmonar de bovinos pela inalação (Woodhead 1911, Corrêa & Corrêa 1992).

1.2 Agente etiológico

As micobactérias são microorganismos pertencentes à ordem Actinomicetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium*. A tuberculose bovina é determinada por *Mycobacterium bovis*, uma micobactéria intracelular que integra um grupo, cujas espécies são responsáveis pela tuberculose dos mamíferos, caracterizado pelo

crescimento lento em meio de cultura (Miltgen et al. 2002). A este grupo denominado “complexo *Mycobacterium tuberculosis*”, também pertencem *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microtti* (Shinnick & Good 1994, Wards et al. 1995, Roxo 1996a) *Mycobacterium canetti* (Miltgen et al. 2002), *Mycobacterium pinnipedii* (Cousins et al. 2003) e *Mycobacterium caprae* (Aranaz et al. 2003).

O gênero *Mycobacterium* é constituído por bacilos pequenos e finos, medindo 0,2 a 0,6 µm de largura e de 1 a 10 µm de comprimento, imóveis, não esporulados, não capsulados e não flagelados (Brasil 1994). São bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR), ou seja, quando corados pela fucsina a quente resistem a descoloração com álcool-ácido (coloração de Ziehl-Neelsen), retendo a coloração vermelha da fucsina, sua propriedade característica mais comum (Corrêa & Corrêa 1992, Roxo 1996a). Na baciloscopia, *M. bovis* aparece como cocobacilo de coloração vermelha intensa e tamanho compreendido entre 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento (Corner 1994).

As micobactérias apresentam parede celular complexa constituída por lipídeos e polipeptídeos, que estão relacionados com a capacidade de sobrevivência dentro das células do hospedeiro, e também atuam como uma camada de cera que impermeabiliza a superfície micobacteriana, o que a torna altamente resistente a compostos hidrofílicos (Corner 1994). O alto conteúdo lipídico da parede celular da micobactéria é responsável por importantes efeitos biológicos no hospedeiro, como a formação do granuloma e a antigenicidade (Brasil 1994).

Mycobacterium sp. tem preferência de crescimento em meios de cultivos à base de ovos, enriquecidos por asparagina e contendo verde malaquita para inibir os contaminantes, sendo dos meios mais utilizados o Loewenstein-Jensen com baixo teor de glicerol (Corrêa & Corrêa 1992), onde aparecem como colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarela pálida, com borda irregular e superfície granular (Corner 1994). O glicerol favorece o crescimento de todas as espécies do gênero, mas dificulta o crescimento de *M. bovis* (Corrêa & Corrêa 1992), o qual necessita de fontes ricas em piruvato, como o meio de Stonebrink (Haasgma 1995, Jorge 2001).

1.3 Epidemiologia

Mycobacterium bovis é um microorganismo de parasitismo obrigatório; no entanto, pode sobreviver por longos períodos no meio ambiente sob condições favoráveis. Essa

habilidade tem sido demonstrada em alguns estudos de sobrevivência do organismo por contaminação natural ou artificial de vários locais. A adequada disponibilidade de nutrientes na matéria orgânica é um importante fator para essa sobrevivência. No caso de escassez de nutrientes, o microorganismo torna-se mais suscetível aos efeitos adversos da ação da temperatura, que causará a morte da bactéria (Morris et al. 1994). A luz solar é o principal fator que influencia a sobrevivência do microorganismo por causa dos efeitos provocados pela dessecação, e áreas com clima temperado, os efeitos diretos da luz ultravioleta são menos evidenciados do que nos trópicos. Fatores com pH baixo e certos íons inorgânicos também reduzem essa sobrevivência, bem como a competição com outros microorganismos (Kelly & Collins 1978, Morris et al. 1994). A sobrevivência das bactérias patogênicas nas pastagens pode ser afetada por sua localização (na parte aérea da planta, no solo ou no subsolo), visto que cada localização possui diferenças na disponibilidade de nutrientes e na estrutura física do substrato, em especial no solo (Wray 1975).

A persistência do agente após a morte de hospedeiros selvagens pode ser a fonte da infecção para animais comedores de carniças e, possivelmente, depois para os animais domésticos, que comem o capim disponível no local de decomposição. O período de tempo que *M. bovis* pode ser recuperado das carcaças com tuberculose depende da velocidade da putrefação e de decomposição, além da temperatura ambiente e da condição de proteção ambiental à carcaça (Morris et al. 1994).

Mycobacterium bovis é moderadamente resistente ao calor, e pode permanecer viável em estábulos, pastos, esterco e em locais onde se enterrem cadáveres, por períodos de seis meses a quatro anos (Corrêa & Corrêa 1992, Roxo 1996a). A água parada também pode ser uma importante fonte de contaminação, pois o bacilo pode permanecer efetivo nesse local por até um ano (Roxo 1996a). Apesar do microorganismo sobreviver por longos períodos nos pastos, alguns estudos revelam que a contaminação destes não é de grande importância na epidemiologia da tuberculose em bovinos (Radostits et al. 1994).

1.3.1 Hospedeiros e transmissão

A tuberculose é uma doença com ampla variedade de hospedeiros, freqüente em bovinos e suínos (Morris et al. 1994), menos comum em ovinos, caprinos, carnívoros e eqüinos (Corrêa & Corrêa 1992, Neill et al. 1994). Muitos animais selvagens são

suscetíveis à tuberculose, e isso é de particular importância para os programas de controle e erradicação dessa enfermidade, pois constituem uma fonte de infecção para bovinos. Dentre os principais animais reservatórios, destacam-se o veado-vermelho (*Cervus elaphus*) e o gambá (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia, o texugo (*Meles meles*) na República da Irlanda e Reino Unido, o veado-da-cauda branca (*Odocoileus virginianus*) e o bisão (*Bison bison*) na América do Norte e o búfalo africano (*Syncerus caffer*) (Keet et al. 1996, Wedlock et al. 2002), leões e primatas, na África, em especial no Parque Nacional de Kruger.

A resistência genética dos hospedeiros à infecção por *M. bovis* nunca foi solidamente demonstrada. Algumas poucas evidências sugerem que as raças zebuínas são mais resistentes aos efeitos da doença do que as européias, entretanto, este fato pode estar mais relacionado ao manejo do que a raça dos animais. Existem indícios de que o estado fisiológico, imunitário do animal e o estresse ambiental influenciam o curso da tuberculose, mas não foram produzidas evidências experimentais em outros bovinos ou veados que reforçassem tais observações. Não há dados experimentais consistentes para afirmar que idade, sexo, estado reprodutivo ou outras características similares do hospedeiro influenciem diretamente a transmissão ou o curso da doença no animal (Morris et al. 1994), mas se sabe que existe uma maior incidência de tuberculose em animais adultos por causa da maior possibilidade de adquirir a infecção com o passar dos anos (Corrêa & Corrêa 1992).

Em condições naturais, *M. bovis* causa a doença primeiro em bovinos, depois em humanos, suínos e, de forma ocasional, em eqüinos, caninos, felinos e ovinos. A via pela qual os animais são infectados, a resposta imune do hospedeiro e a virulência do microorganismo são de grande importância para a sobrevivência, multiplicação e manifestação da doença no hospedeiro (Collins 2001). As principais vias de infecção por *M. bovis* são a respiratória (McIlroy et al. 1986, Neill et al. 1989, Neill et al. 1994, Menzies & Neill 2000, Palmer et al. 2002, Wedlock et al. 2002) e a alimentar, entretanto, existem várias outras portas de entrada disponíveis para o bacilo (Radostits et al. 1994). A infecção pode ocorrer também por vias menos comuns, como a congênita, por meio dos vasos umbilicais, genitais e lesões cutâneas (Neill et al. 1994).

1.3.2 Distribuição geográfica

A tuberculose bovina é responsável por determinar morbidade e mortalidade em bovinos em várias partes do mundo. Em países em desenvolvimento, a prevalência é maior, e assume grande importância para a saúde pública, pecuária e comércio internacional de animais e seus subprodutos (Acha & Szyfres 1986, Jorge 2001, Wedlock et al. 2002).

Nos continentes africano e asiático, vários países relatam a ocorrência da doença em seus rebanhos, e a maioria não possui medidas de controle efetivas. Nesses países, 80% a 90% da população vive em áreas onde não há o controle da tuberculose bovina, ou, quando realizado, é de forma parcial (Cosivi et al. 1998).

Na América Central e no Caribe, muitos países são livres da tuberculose bovina. Cuba, com aproximadamente cinco milhões de bovinos, é declarada livre desde 1984. No Panamá, desde 1983 não são encontrados casos de animais reagentes à tuberculina nem com lesões da doença. Na Jamaica, as condenações de carcaças com lesões sugestivas macroscópicas de tuberculose foram menores que 0,01% (Kantor & Ritacco 1994). No rebanho leiteiro mexicano, em uma população de seis milhões de animais, foi encontrada prevalência de 2%, enquanto que no rebanho de corte esta foi menor que 0,1% (Kantor & Ritacco 1994).

No Brasil, dados oficiais indicam que a prevalência de animais infectados no rebanho nacional é de 1,3% (Brasil 2003). Estudos isolados de prevalência em bovinos abatidos de matadouros-frigoríficos revelaram, no município de Patos, PB, ocorrência de 0,48% de lesões tuberculosas em carcaças (Tabosa et al. 2000). Reis & Almeida (2001), no município de Uberlândia, MG, encontraram 0,08% de carcaças condenadas, de um total de 317.372 animais abatidos, no período de 1984 a 1998. No Estado de Minas Gerais, estudos de tuberculinização demonstraram prevalência aparente de animais infectados de 0,8% (Brasil 2003).

1.3.3 Importância

A tuberculose bovina ocorre em várias partes do mundo, com maior prevalência em rebanhos leiteiros (Roxo 1997, Souza et al. 1999, Buzatto et al. 2002). A doença está sob rigoroso controle em muitos países desenvolvidos, mas é ainda responsável por

perdas nos países em desenvolvimento. Além das mortes, os animais infectados perdem de 10% a 25% da sua capacidade produtiva (Radostits et al. 1994, Ferreira-Neto & Bernardi 1997). Em relação à saúde e produção animal, *M. bovis* causa doença nas principais espécies domésticas e em várias espécies silvestres, que, além de se infectarem, também permanecem como reservatório do agente, o que contribui para a disseminação da doença (Wedlock et al. 2002). No âmbito de saúde pública, *M. bovis* é transmitido ao homem e causa doença clinicamente indistinta daquela determinada por *M. tuberculosis* (Acha & Szyfres 1986, Grange & Yates 1994, Collins 2001), portanto, deve ser considerada e tratada com o rigor de uma doença infecciosa e transmissível (Jorge 2001).

Na cadeia pecuária bovina, a tuberculose é responsável por perdas significativas principalmente na produção leiteira, além da queda da eficiência reprodutiva de machos e fêmeas, transmissão do agente ao bezerro por meio do leite e condenação de carcaças (Cafrey 1994, Morris et al. 1994, Roxo 1997, Jorge 2001). No Brasil, a doença é endêmica e estima-se que afeta cerca de 20% das propriedades de rebanhos leiteiros (Lilenbaun et al. 1998), justificada pela proximidade dos animais que facilita a infecção pela via aerógena (Menzie & Neill 2000, Goodchild & Clifton-Hadley 2001, Palmer et al. 2002). Em rebanhos de corte, o grau de infecção é menor. Todavia, rebanhos isolados de gado de corte poderão apresentar alta morbidade, se neles, forem introduzidos animais infectados (Radostits et al. 1994). Salienta-se, que a crescente exigência em relação ao manejo sanitário dos animais feita pelos países desenvolvidos, bem como o entrave comercial em busca de produtos atestados sanitariamente, torna provável o fechamento do mercado para as exportações de carne e de seus subprodutos de países que não erradicarem a tuberculose bovina de seus rebanhos (Kantor & Ritacco 1994).

1.4 Tuberculose como zoonose

Dentre as zoonoses, a tuberculose recebe especial atenção por parte das autoridades de saúde pública, por causa do aumento da incidência na população humana (Moda et al. 1996). Com o surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), tem-se observado, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, crescente número de notificações de tuberculose associado a pacientes soropositivos (Schwarz et al. 2002).

Apesar de a maioria dos casos em humanos serem por *M. tuberculosis*, aqueles cuja etiologia é *M. bovis* podem alcançar índices importantes em algumas regiões. Estudos publicados em vários países, entre 1954 e 1970, estimaram que, do total de casos de tuberculose humana, 3,1% eram determinados por *M. bovis* (Gervois et al. 1972 citado por Cosivi et al. 1998). No Brasil, estima-se que *M. bovis* seja responsável por aproximadamente 5% da incidência de tuberculose humana (TbBovNet 2001). O número exato da infecção pelo bacilo bovino é difícil de ser quantificado, pois o diagnóstico de rotina em humanos baseia-se na baciloscopia do escarro, método que não permite diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, e quando é realizado o cultivo, não são empregados meios de cultura adequados a *M. bovis* (Haasgma 1995, Jorge 2001).

Mesmo com o processo de pasteurização do leite, que contribuiu para redução da incidência da doença por *M. bovis* em humanos, a maioria dos casos está associada à ingestão de leite não pasteurizado proveniente de bovinos doentes (O'Reilly & Daborn 1995, Cosivi et al. 1998, Schwarz et al. 2002). O risco de contrair a doença pela ingestão de produtos cárneos de animais infectados torna-se menor, em decorrência da baixa incidência do agente em tecidos musculares. No entanto, pode-se contrair a infecção, com acometimento cutâneo em humanos, pela manipulação de carcaças contaminadas. As classes mais afetadas são os magarefes, auxiliares de inspeção e médicos-veterinários. Tais lesões, na maioria das vezes, são pouco extensas e regressivas, manifestando-se na forma de pequenas pápulas, semelhantes a verrugas, conhecidas como “verrugas do magarefe” (Grange & Yates 1994). *M. bovis* pode causar as mesmas formas clínicas e lesões patológicas que *M. tuberculosis*, e a forma extrapulmonar afeta, principalmente, crianças em decorrência da ingestão de leite e produtos lácteos crus contaminados (Acha & Szyfres 1986, Grange & Yates 1994).

1.5 Imunopatogenia

A proteção imune contra micobactérias foi conhecida por meio de infecção experimental em ratos, análise da resposta imune em pacientes humanos com tuberculose e em animais infectados com *M. bovis* (Wedlock et al. 2002). Quando o agente invade o organismo ocorre a fagocitose pelos macrófagos e apresentação dos antígenos micobacterianos no contexto do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Tendo alcançado a superfície celular com sua carga de peptídeos antigênicos, as moléculas MHC de classe II, são reconhecidos pelos linfócitos T inflamatórios (Th1)

e linfócitos T de memória (Wedlock et al. 2002). Ao reconhecer seus alvos, os linfócitos ativados iniciam a produção de moléculas efetoras (citocinas), as quais afetam diretamente suas células-alvo e ajudam a recrutar outras células efetoras. Entre as citocinas, a mais destacada é o interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$), que tem papel crucial na ativação da função efetora do macrófago e dos linfócitos Th1 (Janeway-Jr & Travers 1997, Tizard 1998, Wedlock et al. 2002). Uma vez ativados, os macrófagos infectados podem realizar sua função efetora, por meio da redução no pH intrafagossomal e da exposição do agente ao oxigênio reativo, produtos nitrogenados e enzimas lisossômicas, que vão provocar a morte da micobactéria (Janeway-Jr & Travers 1997, Tizard 1998, Wedlock et al. 2002). Outros dois componentes que participam para defesa do organismo em hospedeiros tuberculosos são o óxido nítrico (NO) e o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) (Flesch & Kaufmann 1990, Bean et al. 1999, Waters et al. 2003). A síntese de NO, a partir da estimulação de macrófagos e subsequente geração de nitrogênio reativo, são potentes mecanismos que provocam a morte da micobactéria (Chan et al. 1995).

Quando as bactérias resistem aos efeitos bactericidas dos macrófagos ativados, pode-se desenvolver uma infecção crônica com inflamação. Essa possui padrão característico, constituído de uma área central de macrófagos circundada por linfócitos ativados. Esse padrão patológico é chamado de granuloma. No centro desses granulomas, os macrófagos muitas vezes apresentam-se alongados com características de células epitelióides, e células gigantes do tipo Langhans, também, são formadas pela fusão dos macrófagos (Cassidy et al. 1999, Ameni et al. 2000). Isto serve para isolar os microorganismos resistentes à destruição. O centro dos grandes granulomas pode se isolar, com morte das células provavelmente por causa da combinação da falta de oxigênio e dos efeitos citotóxicos dos macrófagos ativados (Janeway-Jr & Travers 1997). Existem evidências de que o $\text{TNF-}\alpha$ também contém a infecção por meio da organização local do granuloma (Roach et al. 1999, Waters et al. 2003). Com a progressão da lesão, o tubérculo desenvolve fibroplasia periférica e necrose central caseosa ou caseo-calcificada (Neill et al. 1994, Cassidy et al. 1999, Ameni et al. 2000).

A tuberculose generaliza-se no organismo em duas fases: o complexo primário e o pós-primário. O complexo primário consiste na lesão no ponto de entrada e no linfonodo regional. Um foco primário visível desenvolve-se em um prazo de oito horas após a

entrada da micobactéria. As micobactérias passam desse foco primário — que em 90% a 95% dos casos em bovinos são no trato respiratório — ao linfonodo regional, causando, aí, o desenvolvimento de lesões similares. Nos bovinos, as lesões nos pulmões ocorrem nos lobos caudais em 90% dos casos. Em bezerros alimentados com leite contaminado, o foco primário, provavelmente, são nos linfonodos mesentéricos e faríngeos, e neles a principal manifestação da disseminação pós-primária é constituída pelas lesões hepáticas (McIlroy et al. 1986, Radostits et al. 1994, Roxo 1997, Cassidy et al. 1999, Menzies & Neill 2000, Palmer et al. 2002).

A disseminação pós-primária de um complexo primário pode ter a forma de tuberculose miliar aguda, que consiste de discretas lesões nodulares em vários órgãos, ou de tuberculose orgânica crônica causada por reinfecção (Radostits et al. 1994). Após uma reinfecção exógena ou endógena, pela recrudescência da lesão, esta se torna necrosada formando nódulos caseosos de tamanhos variados e, quando a resistência orgânica é baixa, pode atingir todo o parênquima pulmonar e os tecidos vizinhos formando lesões confluentes, que podem formar lesões cavitárias com a expectoração de material bacilífero (Pritchard 1988, Roxo 1996b).

1.6 Sinais clínicos

Em bovinos, a doença apresenta-se assintomática no início, mas na sua evolução pode apresentar perda de peso, febre, debilidade, anorexia, episódios de diarreia intercalados com constipação, sinais respiratórios caracterizados por dispnéia, tosse seca não produtiva, secreção nasal serosa ou purulenta e perda produtiva. Podem-se observar linfonodos superficiais, principalmente os da cabeça e os pré-escapulares aumentados de tamanho (Corrêa & Corrêa 1992, Radostits et al. 1994, Roxo 1997). Embora os sintomas descritos possam ser evidenciados, a tuberculose bovina é considerada uma doença insidiosa, pois o foco primário pode ser localizado e os animais infectados apresentarem-se aparentemente saudáveis (Brasil 2003).

1.7 Diagnóstico

Pelo exame clínico podem-se ter indícios da tuberculose bovina por meio da palpação, percussão, termometria, palpação de linfonodos superficiais (Monaghan et al. 1994). Na forma pulmonar, que corresponde a maioria dos casos bovinos, há tosse crônica que pode progredir para dispnéia (Radostits et al. 1994).

O diagnóstico *in vivo* é realizado de forma indireta por meio dos testes tuberculínicos, que utilizam derivado protéico purificado (PPD) de colônias de *M. bovis* e *M. avium*. Quando o animal tuberculoso entra em contato pela segunda vez com os antígenos micobacterianos (PPD), estando ele sensibilizado, irá desenvolver uma resposta contra *M. bovis* caracterizada como uma reação de hipersensibilidade tardia tipo IV, mediada por linfócitos T específicos (Janeway-Jr & Travers 1997, Tizard 1998). A injeção de pequenas quantidades de PPD de *M. bovis* provoca uma reação inflamatória local, nos animais que responderam previamente a esse patógeno. A resposta é mediada por linfócitos T inflamatórios (Th1), antígeno-específicas, que migram para o sítio da injeção do antígeno e reconhecem os complexos de peptídeos MHC de classe II nas células apresentadoras de antígeno. Após o reconhecimento, inicia-se a liberação de citocinas inflamatórias que aumentam a permeabilidade local dos vasos sanguíneos, com aumento de fluidos e proteínas do tecido, e recrutamento de células acessórias para o sítio inflamatório. Finalmente, os linfócitos Th1 ativam os macrófagos, pela liberação de interferon-gama (IFN- γ), que é a célula responsável pela função efetora antibacteriana (Janeway-Jr & Travers 1997).

O recrutamento de linfócitos T, fagócitos, fluidos e proteínas, para o sítio da injeção do antígeno, produzem uma lesão visível, caracterizada, no exame histopatológico, por um infiltrado de células mononucleares, com formação de edema mais ou menos pronunciado, o que define uma reação de hipersensibilidade tardia mediada por linfócitos T sensibilizados (Monaghan et al. 1994, Neill et al. 1994, Souza et al. 1999). A reação à tuberculina em animais infectados tem resposta máxima 72 horas após a injeção intradérmica, e consiste de uma área cutânea elevada, avermelhada e endurecida, que desaparece à medida que o antígeno for degradado (Monaghan et al. 1994, Souza et al. 1999).

Os testes tuberculínicos podem ser realizados de forma simples, apenas com a tuberculina bovina, ou comparada onde utiliza a tuberculina bovina e aviária de forma simultânea. Mesmo sendo descritas como puras, as tuberculinas são uma complexa mistura de proteínas, açúcares e ácidos nucleicos incluindo uma grande variedade de antígenos, comuns a várias espécies de micobactérias (Monaghan et al. 1994). O teste comparativo possibilita a diferenciação entre a micobactéria patogênica (*M. bovis*) e a comensal, mas nem todas as reações inespecíficas são eliminadas (Collins et al. 1994,

Waters et al. 2003). As reações inespecíficas podem levar a ocorrência de reações falso-positivas nos testes tuberculínicos simples. Infecções por *M. avium* subespécie *paratuberculosis* são responsabilizadas por grande número dessas reações (Monaghan et al. 1994, O'Reilly & Daborn 1995).

As reações falso-negativas nos testes tuberculínicos podem ocorrer por causa de infecções recentes, pois a reatividade ao teste aparece 30 a 50 dias após a infecção (Francis 1947), e em casos de tuberculose bovina generalizada (Lepper et al. 1977). O uso de tuberculinas com baixo ou reduzido potencial, injeção de quantidade insuficiente de tuberculina, também aumenta os casos de reações falso-negativas (Monaghan et al. 1994). Outros fatores que podem reduzir a eficiência da tuberculina é a imunossupressão pré e pós-parto (Kehrli et al. 1989) e a dessensibilização depois de repetidas tuberculinizações, por redução da capacidade do animal tuberculoso em reagir ao teste (Kerr et al. 1946).

Outro recurso indireto para o diagnóstico da tuberculose bovina é a detecção de IFN- γ bovino. Esse ensaio é realizado *in vitro* a partir de sangue total, e tem como princípio a detecção rápida de IFN- γ , que é produzido por linfócitos sensibilizados, em resposta à estimulação por PPD bovino na presença da infecção por tuberculose (Wood et al. 1990, 1992, Wood & Rothel 1994, Scacchia et al. 2000, Wood & Jones 2001, Walravens et al. 2002, Waters et al. 2003). Os linfócitos do sangue do animal infectado com *M. bovis* reconhecem os antígenos micobacterianos específicos presentes no PPD bovino e liberam IFN- γ , que será quantificado por ELISA de captura (Wood et al. 1990, 1992, Wood & Rothel 1994, Scacchia et al. 2000, Wood & Jones 2001).

O diagnóstico presuntivo da tuberculose bovina também pode ser realizado pela inspeção de abate a partir de lesões nodulares de coloração amarela e aspecto caseoso, caseo-calcificado ou calcificado (Neill et al. 1994, Reis et al. 1996). Essas lesões distribuem-se, principalmente, nos linfonodos mediastínicos e pulmão, ou, conforme a via de infecção, a lesão pode ser encontrada em linfonodos regionais próximos à porta de entrada do agente (Neill et al. 1994).

A partir da detecção das lesões sugestivas de tuberculose no abate, são realizados o diagnóstico histológico e o cultivo em meios diretos. No histopatológico são investigados granulomas e outras características indicativas de tuberculose bovina,

como a presença de células gigantes multinucleadas (Cassidy et al. 1999, Ameni et al. 2000).

Para o cultivo e isolamento de *M. bovis*, as lesões devem ser encaminhadas para o laboratório acondicionadas de forma asséptica para evitar contaminação. Entretanto, por se tratar, na maioria das vezes, de amostras provenientes de matadouros-frigoríficos, as peças com lesões nem sempre são coletadas dessa forma, necessitando de um processo de descontaminação para serem cultivadas (Jorge 2001). O processo de descontaminação objetiva eliminar outros microorganismos que porventura impossibilitem o crescimento de *M. bovis*. Vários métodos de descontaminação disponíveis podem ser utilizados, como o do cloreto de hexadecilpiridínio, do ácido oxálico, do cloreto de benzalcônio e de Petroff (Brasil 1994, Jorge 2001, Jorge et al. 2002).

O isolamento de *M. bovis* é fator indispensável para o diagnóstico conclusivo ou diagnóstico “padrão-ouro” da tuberculose bovina. Este é realizado a partir de lesões descontaminadas e meio de cultura específico, à base de ovos, denominado Stonebrink (Roxo 1996b, Jorge 2001).

O crescimento de micobactérias em cultivo permite a identificação dos BAAR sob coloração de Ziehl-Neelsen; no entanto, não permite a identificação da espécie, que pode ser conseguida por meio das provas bioquímicas ou moleculares (Zanini et al. 2001). Algumas características na cultura, como meio utilizado, temperatura, tempo de crescimento, formato e pigmentação das colônias, aliadas às provas bioquímicas, como o acúmulo de niacina, prova da uréase, redução de nitrato a nitrito e produção de catalase e pela análise dos ácidos micólicos, permitem uma seleção prévia da micobactéria (Brasil 1994, Roxo 1996b, Leite et al. 1998, Jorge 2001). Nos métodos moleculares utilizam-se para o diagnóstico, a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR baseia na síntese enzimática do ácido desoxiribonucleico (DNA) celular bacteriano orientado por oligonucleotídeos iniciadores da amplificação (*primers*). Os *primers* correspondem a uma parte conhecida da sequência de DNA bacteriano que se deseja sintetizar e amplificar. O conhecimento da sequência de genes que se deseja amplificar é o ponto-chave para o sucesso dessa técnica (Magdalena et al. 1998). A PCR permite uma rápida identificação dos membros do “complexo *M. tuberculosis*” do qual *M. bovis* faz parte, utilizando *primers* como o IS6110 (Leite et al. 2003), ou identificação de *M. bovis* utilizando os *primers* JB21 e JB22 (Rodriguez et al. 1999, Sechi et al. 2000).

Seqüências para amplificação do DNA também podem ser utilizadas para o diagnóstico rápido de *M. bovis* direto de amostras do tecido com a lesão tuberculosa (Liebana et al. 1995, Wards et al. 1995, Vitale et al. 1998, Zanini et al. 1998, 2001, Romero et al. 1999).

1.8 Controle

A erradicação da tuberculose bovina nos Estados Unidos da América encontra-se em estágio bastante avançado. O programa norte-americano foi criado em 1917, e acredita-se que a prevalência da tuberculose é estimada em 0,003% (Essey & Koller 1994). Neste país as operações de saneamento basearam-se no diagnóstico da doença por meio da tuberculinização caudal ou vulvar, sacrifício dos reatores e indenização parcial dos criadores. O programa canadense foi instituído um pouco depois, em 1923, seguindo o mesmo modelo americano. Hoje, a ocorrência de tuberculose bovina, na América do Norte, é rara e esporádica, e existem os programas nacionais baseados na notificação obrigatória, quarentena, controle da movimentação de animais, tuberculinização e sacrifício de reatores (Essey & Koller 1994).

Na Austrália, todas as áreas foram consideradas controladas para tuberculose bovina, desde 1992 (Tweddle & Livingstone 1994). Na Nova Zelândia, as medidas obrigatórias para controle da tuberculose em gado de leite reduziram prontamente a doença naquele rebanho, exceto em pequenas áreas geograficamente definidas, onde se acredita que os bovinos de corte não testados foram a provável fonte de reinfecção. Em escala nacional, os testes obrigatórios para bovinos de corte foram muito bem sucedidos, porém, algumas áreas foram identificadas onde o programa de teste e abate não foi eficiente para erradicar a tuberculose. Em algumas dessas regiões, existem evidências epidemiológicas de que marsupiais (*Trichosurus vulpecula*) sejam os principais disseminadores da tuberculose para os bovinos, fator que dificulta a erradicação (Tweddle & Livingstone 1994). Os programas da Austrália e da Nova Zelândia seguiram os mesmos moldes de outros países, e deram maior ênfase para a queda de produtividade e acesso ao mercado internacional, do que para saúde pública, pois com a difusão das rotinas de pasteurização ou fervura do leite e inspeção de carnes, a tuberculose como zoonose passou a ter um caráter mais ocupacional (Ferreira-Neto & Bernardi 1997). Os objetivos do programa australiano, a princípio, eram controlar a doença até 1992, limitando sua ocorrência a algumas poucas áreas, com a pretensão de

ser declarado país oficialmente livre em 1997, registrar o último caso em 2000 e ser confirmada bacteriologicamente livre em 2008. Na Nova Zelândia, a tuberculose bovina ainda é enzoótica e sua erradicação depende da resolução do problema dos reservatórios. Os maiores entraves enfrentados pela Austrália foram a falta de infraestrutura de muitas criações extensivas, localizadas principalmente no Norte do país, e a dificuldade de atuação nos rebanhos da zona central árida. Nessa região, por razões climáticas, o trabalho só é possível seis meses por ano. Além disso, a má-qualidade da pastagem no período seco, aliada ao estresse do manejo, que diminuem a sensibilidade da prova tuberculínica, dificultaram as ações do programa (Tweddle & Livingstone 1994).

O continente europeu, com a criação da Comunidade Européia (CE), estabeleceu uma série de critérios para o combate e erradicação da tuberculose bovina em seus rebanhos. Dentre essas medidas, os estados-membros decidiram não aceitar o trânsito de animais em seus territórios, considerando isso como uma situação de risco para reintrodução da tuberculose nos rebanhos. A posição atual da CE foi utilizar o capital de investimento para melhorar a situação de alguns estados-membros. A erradicação ainda não foi concluída com êxito na Itália (Cafrey 1994) e Irlanda (Gormley & Collins 2000), que possuem prevalência de rebanhos infectados de 3,71% e 8,8%, respectivamente (Cafrey 1994). A doença também ocorre esporadicamente na França e na Grécia (Cafrey 1994). Na Espanha, o programa nacional de erradicação indica que os dados de prevalência da doença são superiores a 10% (Cafrey 1994). Outros países membros da CE, como Dinamarca, Luxemburgo, Países Baixos, Bélgica e Alemanha, têm a prevalência de tuberculose em seus rebanhos próximo a 0% ou erradicada (Cafrey 1994). Pode-se dizer que um dos fatores determinantes para que atingissem a condição de controle ou erradicação da doença foi o empenho com que esses países perseguiram essa meta.

Na América do Sul, a prevalência em alguns países é bastante baixa. No Uruguai, as campanhas de erradicação da doença começaram por volta de 1963, quando a prevalência da infecção era de 4,5%. Quatorze anos depois era de 0,03%, atingindo 0,01% em 1984. As estimativas de prevalência em 10,5 milhões de bovinos são de 0,005% (Kantor & Ritacco 1994). O programa uruguaio teve alguns problemas e precisou ser interrompido por um certo período. O fracasso foi atribuído às altas indenizações, 75% do valor do animal, e a não fixação de um prazo para o criador sanear a propriedade. Na Venezuela, o programa iniciou-se em 1954, e ocasionou uma

redução no grau de infecção de 3,48% para 0,37 % nos primeiros dez anos (Kantor & Ritacco 1994). No Paraguai, a prevalência de animais reagentes aos testes tuberculínicos diminuiu de 1,4% para 0,24% no período de 1981 a 1990, resultado de campanhas conduzidas para gado de leite (Kantor & Ritacco 1994). Na Colômbia, a doença está restrita a pequenas áreas geograficamente delimitadas, e o Serviço de Inspeção Veterinária Colombiano não tem detectado lesões compatíveis de tuberculose. Já na Argentina, que é o 15º maior produtor de leite (responsável por 1,67% da produção mundial de leite) e o 12º em tamanho de rebanho leiteiro, a doença é considerada endêmica (Kantor & Ritacco 1994). Chile e Peru adotaram em seus programas o sistema de identificação dos animais reagentes e eliminação. Na Bolívia e Equador não existem informações atuais sobre a doença (Kantor & Ritacco 1994).

Todos os programas de controle e erradicação da tuberculose bovina que obtiveram sucesso foram baseados no saneamento de rebanhos infectados, por meio da realização de testes de tuberculinização periódicos, sacrifício dos animais reagentes e confirmação do diagnóstico por meio de exames histopatológicos e bacteriológicos. Também se baseavam na adoção de métodos de desinfecção, controle do trânsito de animais, quarentena, notificação, controle de reservatórios, quando necessário, e criação de divisões entre regiões e propriedades conforme a ocorrência da doença (Ferreira-Neto & Bernardi 1997).

Outra medida que facilitou o controle foi a adoção de medidas indenizatórias por parte do governo aos proprietários que tinham seus animais reagentes e, conseqüentemente, sacrificados, mesmo sendo essa indenização, em muitos casos, de forma parcial.

Com a finalidade de erradicar a tuberculose bovina, o governo brasileiro regulamentou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), instituído pela Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001, que estabelece a realização do diagnóstico dessa zoonose e normatiza as medidas de controle. As propostas técnicas do PNCEBT objetiva a certificação de propriedades livres ou monitoradas; controle de trânsito de animais e normas sanitárias para participação em exposições, feiras, leilões e outras aglomerações de animais; credenciamento e capacitação de médicos-veterinários; diagnóstico e apoio laboratorial; participação do serviço social e educação sanitária (Brasil 2001).

A proposta do PNCEBT segue o modelo de muitos outros países que instituíram em seus territórios programas de erradicação, e hoje, muitos deles já comemoram o *status* de área livre. O Brasil reúne algumas condições que favoreceram a implementação desse programa, dentre as quais destacam-se as existências de serviços veterinários em órgãos oficiais, laboratórios capacitados para a produção de antígenos e realização de diagnóstico e, além disso, a existência de bacias leiteiras relativamente organizadas. Entretanto, dentre os fatores que dificultam tal ação seria a dimensão do rebanho bovino brasileiro, maior rebanho comercial do mundo; a grande extensão territorial; a existência de fronteiras com outros dez países; as grandes diferenças regionais quanto à infra-estrutura e condições socioeconômicas; a grande heterogeneidade das criações quanto ao modo de produção e situação sanitária e a insuficiência dos recursos financeiros destinados aos órgãos oficiais que se ocupam da saúde animal (Ferreira-Neto & Bernardi 1997).

Tendo em vista a importância da tuberculose bovina para o setor pecuário e para a saúde pública propôs-se realizar um estudo de investigação retrospectiva em rebanhos de corte com o objetivo de rastrear a infecção por *M. bovis* em bovinos de diferentes procedências do Estado de Mato Grosso do Sul, a partir da inspeção de abate.

Considerando que os testes diagnósticos previstos para investigação epidemiológica de tuberculose bovina são influenciados por fatores biológicos, como a resposta imune natural induzida pela infecção, decidiu-se realizar a reprodução experimental da infecção por *M. bovis* e *M. avium* em bovinos com os objetivos de acompanhar a resposta celular aos testes indiretos e identificar a interferência de reações inespecíficas por *M. avium* nos resultados dos testes.

Resposta imune específica à infecção por *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium* inativados em bovinos

Resumo

O diagnóstico presuntivo da tuberculose bovina é baseado na análise da resposta imune celular a antígenos micobacterianos. Procedeu-se a simulação experimental de infecção por *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium* em bovinos a fim de acompanhar a resposta imune, a partir do teste cervical comparativo e da evolução da produção específica de interferon-gama, além de identificar a interferência de reações inespecíficas por *M. avium* nos resultados dos testes. Verificou-se que os animais experimentais desencadearam resposta de hipersensibilidade tardia contra os bacilos inativados, e que ambos os testes diagnósticos da tuberculose bovina foram eficientes na identificação dos animais sensibilizados com *M. bovis* e na discriminação das reações geradas pela inoculação dos bovinos com *M. avium*.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, interferon-gama, tuberculina, resposta imune.

Specific immune response to infection by *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* inactivated in bovines

Abstract

The presumptive diagnosis of bovine tuberculosis is based on the analysis of the immune response confronting micobacterial antigens. The objective of this experimental simulation of infection by *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* in bovines was to assist the immune response from cervical comparative test and the evolution of the specific production of gamma-interferon, besides identifying the interference of unspecified reactions by *M. avium* in the tests results. According to the results obtained it was possible to conclude that the experimental animals started a response of delayed hypersensitivity against the inactivated bacilli and that both diagnostic tests for bovine tuberculosis were efficient while identifying the animals sensitized with *M. bovis* and in the discrimination of the reactions generated by the inoculation of bovines with *M. avium*.

Key words: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, gamma-interferon, tuberculin, immune response.

Introdução

A tuberculose bovina é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica, determinada por *Mycobacterium bovis*, que provoca lesões granulomatosas e infecta também o homem, outros animais de exploração zootécnica, animais silvestres e de zoológico (Acha & Szyfres 1986, Pritchard 1988, Corrêa & Corrêa 1992).

Mycobacterium bovis é um bacilo intracelular facultativo, que com outras micobactérias causadoras de tuberculose em mamíferos, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium microtii*, constituem o “complexo *Mycobacterium tuberculosis*” (Shinnick & Good 1994, Wards et al. 1995, Roxo 1996, Miltgen et al. 2002). Outro grupo de micobactérias que deve ser considerado é o “complexo MAIS”, formado por *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* e *Mycobacterium scrofulaceum*. *M. avium* é o agente da tuberculose em várias espécies de aves, e as micobactérias do complexo MAIS causam a linfadenite granulomatosa dos suínos. As bactérias desse complexo não são patogênicas para os bovinos e bubalinos, entretanto, são responsáveis por reações à tuberculinização, o que dificulta o diagnóstico espécie-específico de *Mycobacterium* sp. (Brasil 2003).

O diagnóstico presuntivo da tuberculose bovina é realizado por meio de testes tuberculínicos. Tais testes foram desenhados para determinar a infecção espécie-específica por *M. bovis*. Por essa razão, a inoculação intradérmica de pequenas quantidades de antígenos micobacterianos gera naqueles animais que responderam imunologicamente a infecção prévia por *M. bovis*, uma reação inflamatória local, em um período de 24 a 72 horas. A resposta é mediada por linfócitos T (Th1) que migram ao sítio de injeção do antígeno e reconhecem os peptídeos apresentados em conjunção com o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II na superfície celular de macrófagos. Os linfócitos Th1 liberam citocinas, tais como interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ), que agem sobre o endotélio vascular recrutando células do sistema imune para o sítio de deposição do antígeno. O recrutamento de linfócitos Th1, fagócitos, fluidos e proteínas produz uma lesão visível (Janeway & Travers 1997, Tizard 1998, Wedlock et al. 2002).

No local da inoculação ocorre edema endurecido que resulta do processo inflamatório, da deposição de fibrina e trombose local, que atinge sua maior intensidade por volta de

72 horas (Monaghan et al. 1994). Esse edema pode persistir por semanas ou desaparecer gradualmente. Nas reações muito severas, pode ocorrer destruição e necrose tecidual no local da injeção (Monaghan et al. 1994, Tizard 1998). No exame histológico, a reação revela infiltrado de células mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos, e poucos neutrófilos (Macruz & Bueno 1963, Monaghan et al. 1994, Roxo et al. 1998, Tizard 1998).

As tuberculinas disponíveis para o diagnóstico indireto *in vivo* da tuberculose bovina são extratos antigênicos de proteínas purificadas, conhecidas como PPD (*purified protein derivative*), de isolados AN5 de *M. bovis* (PPD bovino) e D4 de *M. avium* (PPD aviário). A purificação desses extratos é feita a partir de cultivo dos microorganismos em meio sintético de Dorset & Henley, precipitação com ácido tricloracético e filtração. Embora as tuberculinas sejam descritas como puras, elas são formadas por uma mistura complexa de proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos nucléicos, o que inclui uma grande variedade de antígenos, alguns comuns a várias espécies de micobactérias (Monaghan et al. 1994), sendo este um fator que contribui para as reações inespecíficas.

Os testes tuberculínicos podem ser simples ou comparativos. Os testes simples utilizam apenas a tuberculina bovina (teste da prega caudal – TPC ou o teste cervical simples – TCS). O teste cervical comparativo (TCC) utiliza as tuberculinas bovina e aviária de forma simultânea. Esse é mais específico que os testes simples, pois permite distinguir infecção por *M. bovis* do “complexo MAIS” e micobactérias ambientais (OIE 1992, Radostits et al. 1994, Brasil 2003, Waters et al. 2003).

Outra possibilidade de diagnóstico indireto da tuberculose bovina é o teste para a detecção de IFN- γ bovino. O ensaio é realizado *in vitro* e baseia-se na detecção de IFN- γ liberado por linfócitos sensibilizados durante incubação com material antigênico que contém antígenos espécie-específicos (Walravens et al. 2002). Se o animal foi previamente sensibilizado com *M. bovis*, ocorrerá o reconhecimento desses antígenos pelos linfócitos Th1 e liberação de IFN- γ . Após liberação de IFN- γ no plasma, esse é detectado por um teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) de captura, também denominado de sanduíche, que emprega anticorpo monoclonal (Wood et al. 1990, 1992, Wood & Rothel 1994, Scacchia et al. 2000, Wood & Jones 2001, Walravens et al. 2002, Waters et al. 2003). Esse teste já foi utilizado para o diagnóstico da tuberculose bovina na Austrália (Wood et al. 1990, 1992), Espanha (Domingo et al. 1995, Gonzales-

Llamazares et al. 1999), Brasil (Lilenbaum et al. 1999), Etiópia (Ameni et al. 2000), Bélgica (Walravens et al. 2002) e Estados Unidos (Wipple et al. 1995).

Os testes indiretos para o diagnóstico da tuberculose bovina são influenciados por fatores biológicos, como a cinética e a resposta imune natural induzida pela infecção, e reações cruzadas com outros microorganismos que interferem com a especificidade e mensuração da resposta (Walravens et al. 2002). Tais fatores justificam a reprodução experimental da infecção por *M. bovis* e *M. avium* em bovinos com os objetivos de acompanhar a resposta celular aos testes indiretos e identificar a interferência de reações inespecíficas por *M. avium* nos resultados dos testes.

Materiais e métodos

Animais experimentais e inóculo

Foram utilizados 26 bovinos mestiços (cruzamento industrial e pardo suíço), machos de 16 a 20 meses de idade, em bom estado nutricional e sanitário e, negativos no TCC. O animal número 17 foi reagente para *M. avium*. Os animais ficaram em regime extensivo no Núcleo de Ciências Veterinárias (NCV) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Dos 26 bovinos utilizados no experimento, 16 foram sensibilizados com 10 mg do inóculo da amostra AN5 de *M. bovis* e três com 10 mg do inóculo da amostra D4 de *M. avium*. A inoculação foi realizada na região da barbel por via subcutânea. Os sete animais restantes integraram o grupo-controle negativo para os testes de imunoadsorção enzimática (ELISA) de captura para detecção de IFN- γ bovino e do TCC.

Deteção de interferon-gama (IFN- γ) bovino

Foram realizadas em todos os animais cinco coletas de sangue, a partir do dia da inoculação, sendo a primeira antes da sensibilização e as demais com intervalos de 15 dias até o 60º dia pós-inóculo.

O sangue foi coletado em tubos heparinizados, mantidos em temperatura ambiente e processado no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte em até três horas após a colheita. Volumes de 1,5 mL de cada amostra de sangue total foram distribuídos em placas de poliestireno com 24 orifícios para cultura de células. Para

cada amostra adicionou-se no orifício 1, 100 µL de tampão salino fosfatado (PBS), no orifício 2, 100 µL de PPD aviário e no orifício 3, 100 µL de PPD bovino. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 horas a 37°C com 5% de CO₂, e o plasma foi removido e congelado a -80°C.

O ELISA *Bovine Gamma Interferon Test* (BOVIGAM-CSL Veterinary Limited), foi executado de acordo com as recomendações do fabricante para mensurar a produção de IFN-γ. As densidades ópticas (DO) foram determinadas sob filtro de 450 nm e usadas para interpretação do teste e análise dos dados como descrito pelo fabricante.

Teste cervical comparativo

Sessenta dias após a sensibilização foi realizado o TCC de acordo com o artigo 32 do regulamento técnico do Programa Nacional de Controle da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil 2001), que define o diagnóstico indireto confirmatório da tuberculose bovina.

As inoculações das tuberculinas (PPD aviária e bovina – TECPAR) foram realizadas por via intradérmica, na dosagem de 0,1 mL, na região cervical, em locais previamente demarcados por tricotomia. Antes da inoculação da tuberculina foi realizada a primeira mensuração da espessura da dobra da pele com o auxílio de um cutímetro. Após 72 horas da inoculação, realizou-se nova medida da dobra da pele, no local de inoculação das tuberculinas PPD aviária e bovina. Os resultados foram interpretados conforme o PNCEBT (Brasil 2001):

- a) quando o aumento da espessura da pele foi maior no local da injeção do PPD aviário, o animal foi considerado reagente para outras espécies micobacterianas, mas não para *M. bovis*.
- b) quando o aumento da espessura da pele ocorreu em ambos os locais de inoculação, a diferença entre os dois foi considerada. Se o aumento da pele no local de injeção do PPD bovino (ΔB) foi maior do que o aumento da pele no local de injeção do PPD aviário (ΔA), e $\Delta B - \Delta A$ foi < 2 mm, entre 2 e 3,9 mm, ou ≥ 4 mm, os animais foram classificados como negativos, inconclusivos ou positivos para tuberculose bovina, respectivamente.

Os resultados negativos e inconclusivos foram agrupados na categoria negativos, para efeito de cálculo de concordância (Mathias et al. 1995) entre os métodos de diagnósticos utilizados. O teste estatístico utilizado foi o teste de Qui-quadrado de McNemar.

Histopatologia

Realizou-se em todos os animais biópsia de pele no local da reação ao TCC, após 72 horas da tuberculinização. Os fragmentos obtidos foram fixados em formol a 10% por um período mínimo de 48 horas. As amostras já fixadas foram encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica do NCV da UFMS, onde foram processadas, e as lâminas histológicas coradas em hematoxilina-eosina (HE) examinadas ao microscópio fotômico ao aumento de 1000X.

Resultados

Nos animais sensibilizados com *M. bovis* e *M. avium* ocorreu, após trinta dias da infecção experimental, uma reação no local da inoculação, caracterizada por aumento de volume de consistência firme e superfície irregular, de tamanho variável, entre seis e 12 cm de diâmetro. Em alguns animais, a reação estava aderida à fáscia e sem mobilidade e, em outros, apresentava-se móvel.

A Tabela 1 registra o resultado do ensaio para a detecção de IFN- γ nos bovinos sensibilizados e nos bovinos-controle, antes e após a inoculação experimental.

Tabela 1. Detecção seriada do interferon-gama bovino observada nos animais submetidos a infecção experimental com *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* e bovinos-controle

	1ª colheita Dia zero	2ª colheita Dia 15	3ª colheita Dia 30	4ª colheita Dia 45	5ª colheita Dia 60
Bovinos sensibilizados com <i>Mycobacterium bovis</i>					
1	-	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+
4	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+
6	-	-	+	+	+
7	-	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+
9	-	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+
11	-	+	+	+	+
12	-	+	+	+	+
13	-	-	+	+	+
14	-	-	+	+	+
15	-	+	+	+	+
16	-	+	+	+	+
Bovinos sensibilizados com <i>Mycobacterium avium</i>					
17	R/Ma	R/Ma	R/Ma	R/Ma	R/Ma
18	-	R/Ma	R/Ma	R/Ma	R/Ma
19	-	R/Ma	R/Ma	R/Ma	R/Ma
Bovinos-controle					
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-

-: animais negativos; +: animais positivos (reagentes para *M. bovis*); R/Ma: animais reagentes para *M. avium*

A Tabela 2 registra a interpretação do TCC nos bovinos sensibilizados e nos bovinos-controle, após sessenta dias da inoculação experimental.

Tabela 2. Tuberculinização dos bovinos utilizados na simulação experimental da infecção por *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* e bovinos-controle

Animal	Tuberculina bovina (mm)			Tuberculina aviária (mm)			$\Delta B - \Delta A$	Interpretação
	B 0h	B 72 h	ΔB	A 0 h	A 72 h	ΔA		
	(B 72h – B 0h)			(A 72h - A 0h)				
Bovinos sensibilizados com <i>Mycobacterium bovis</i>								
1	6,8	17,2	10,4	9,0	11,0	2	8,4	Positivo
2	5,3	10,3	5,0	5,5	7,8	2,3	2,7	Inconclusivo
3	6,1	14,2	8,1	6,3	8,5	2,2	5,9	Positivo
4	8,0	17,5	9,5	7,0	8,9	1,9	7,6	Positivo
5	7,5	17,3	9,8	8,5	9,7	1,2	8,6	Positivo
6	5,1	12,2	7,1	6,0	7,7	1,7	5,4	Positivo
7	6,5	14,0	7,5	8,0	9,0	1,0	6,5	Positivo
8	6,5	12,0	5,5	7,0	8,5	1,5	4,0	Positivo
9	5,9	15,4	9,5	6,1	9,2	3,1	6,4	Positivo
10	5,3	22,2	16,9	6,2	12,8	6,6	10,3	Positivo
11	7,2	17,0	9,8	8,5	10,0	1,5	8,3	Positivo
12	6,4	12,0	5,6	5,7	8,7	3,0	2,6	Inconclusivo
13	5,8	12,7	6,9	5,3	8,7	3,4	3,5	Inconclusivo
14	12,0	18,3	6,3	7,1	11,3	4,2	2,1	Inconclusivo
15	5,5	15,2	9,7	5,0	7,2	2,2	7,5	Positivo
16	5,2	13,8	8,6	5,1	8,8	3,7	4,9	Positivo
Bovinos sensibilizados com <i>Mycobacterium avium</i>								
17	7,2	10,8	3,6	7,0	15,2	8,2	-4,6	Negativo
18	5,6	6,2	0,6	5,9	11,2	5,3	-4,7	Negativo
19	4,8	5,2	0,4	5,3	12,8	7,5	-7,1	Negativo
Bovinos-controle								
20	4,6	6,0	1,4	5,7	6,1	0,4	1,0	Negativo
21	8,5	8,6	0,1	9,0	10,5	1,5	-1,4	Negativo
22	5,5	5,5	0,0	7,5	6,1	-1,4	-1,4	Negativo
23	5,0	6,1	1,1	4,5	5,9	1,4	-0,3	Negativo
24	4,1	4,6	0,5	4,5	4,6	0,1	0,4	Negativo
25	5,6	7,4	1,8	5,7	6,0	0,3	1,5	Negativo
26	5,8	5,9	0,1	6,2	7,2	1,0	-0,9	Negativo

Todos os animais inoculados com *M. bovis* apresentaram no TCC sinais de reação inflamatória localizada, de consistência firme, sensível e com aumento de temperatura. Essa constatação foi a mesma tanto nos animais positivos ($\Delta B - \Delta A \geq 4$ mm) como nos inconclusivos ($\Delta B - \Delta A$ entre 2 e 3,9 mm) (Tabela 2)..

Os testes de detecção de IFN- γ e o TCC apresentaram concordância de 75% e diferença estatística quando comparados ($\alpha = 5\%$) por meio do teste de Qui-quadrado de McNemar (g.l = 1).

O exame histológico das biópsias das reações positivas e inconclusivas ao TCC revelou edema, raros polimorfonucleares, reação inflamatória com predominância de células mononucleares em processo de diferenciação para macrófagos, e alguns deles se apresentavam alongados com características de células epitelióides. Algumas reações

evidenciaram células gigantes do tipo Langhans, restos celulares, discreta vasculite com áreas de necrose não delimitadas (Figura 1).

As reações observadas nos animais reagentes para *M. avium* evidenciaram as mesmas características morfológicas daquelas detectadas nos animais sensibilizados com *M. bovis*, positivos e inconclusivos ao TCC.

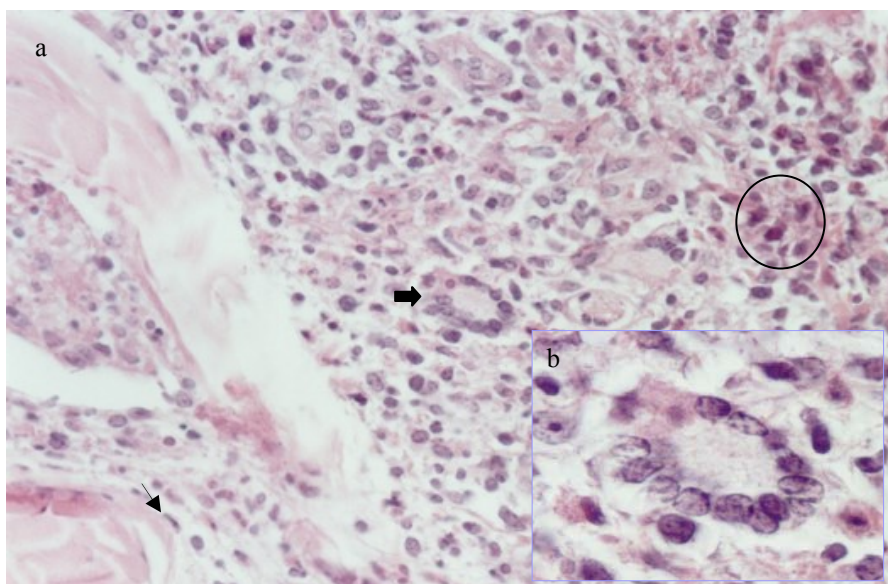


Figura 1 Infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares observado na reação positiva no teste cervical comparativo; a - diferenciação monócito/macrófago ○, células epitelióides ↘ e células gigantes tipo Langhans (400X) ➡ ; b – detalhe de célula gigante tipo Langhans (1000X) HE.

Discussão

O ensaio de detecção de IFN- γ identificou como positivos todos os animais sensibilizados com *M. bovis*, em diferentes momentos (Tabela 1), o que possibilitou a determinação precoce da resposta imune dos animais aos antígenos micobacterianos, entre 15 e 30 dias após a sensibilização. Esse resultado concorda com Walravens et al. (2002), que, ao avaliarem animais infectados experimentalmente com *M. bovis*, detectaram resposta ao teste de IFN- γ duas a quatro semanas após inoculação.

O TCC identificou como positivos 75% dos animais sensibilizados com *M. bovis*, pois quatro animais revelaram reação inconclusiva (Tabela 2). Se esses animais se tratassem de casos naturais, seriam, conforme regulamento técnico do PNCEBT, considerados positivos e sacrificados ou, submetidos a um segundo TCC com intervalo mínimo de 60 dias (Brasil 2001). Os bovinos 02, 12, 13 e 14, embora considerados inconclusivos

revelaram, ao exame histológico da reação cutânea, as mesmas características daquelas dos animais que apresentaram $\Delta B > \Delta A \geq 4$. Ressalta-se que os animais inconclusivos foram positivos no ensaio para detecção de IFN- γ após quinze dias da inoculação nos bovinos 2 e 12 e trinta dias, nos bovinos 13 e 14.

Os resultados encontrados nesse estudo diferem dos observados por Ameni et al. (2000), que ao estudarem tais testes de diagnóstico, de forma comparada com exame histopatológico e baciloscopia, não encontraram diferença significativa. Cabe ressaltar que, o TCC só foi realizado 60 dias após a sensibilização, o que não permitiu avaliar se esse teste também identificaria a infecção já a partir de 15 dias como ocorreu com a detecção do IFN- γ . Para esclarecer essa questão seria necessário prosseguir a investigação e realizar o TCC em diferentes momentos e grupos experimentais, já que esse teste não deve ser repetido no mesmo animal em intervalo menor que 60 dias, em função da possibilidade de dessensibilização (Langrange & Hurtrel 1988, Monaghan et al. 1994).

Os resultados obtidos nos exames histológicos das reações estão de acordo com os achados de Macruz & Bueno (1963) que concluíram que as reações cutâneas à tuberculinização correspondiam histologicamente a processo inflamatório indicativo de alergia. Da mesma forma, Roxo et al. (1998), ao estudarem tais reações em bovinos e bubalinos encontraram intenso infiltrado celular, com predomínio de mononucleares e, em alguns casos, edema e necrose.

Tendo em vista que os testes indiretos para o diagnóstico da tuberculose bovina são baseados na análise da resposta imunológica celular (IFN- γ e DTH) perante os antígenos micobacterianos PPDs bovino e aviário, pode-se afirmar que a detecção de IFN- γ e a reação tuberculínica indicaram que os bovinos estavam sensibilizados pelos bacilos inativados, e que ambos os testes discriminaram as reações inespecíficas geradas pelo inóculo de *M. avium*.

Referências

Acha P.N. & Szyfres B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Parte I: Bacteriosis – Tuberculosis zoonótica. Organization Mundial de la Salud. 2º edicion. 174–185.

Ameni G., Miörner H., Roger F. & Tibbo M. 2000. Comparasion between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 32:267–276.

Brasil 2001. Legislação do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 55p.

Brasil 2003. Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 126p.

Corrêa W.M. & Corrêa C.N.M. 1992. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos - Tuberculose. Edit. Médica e Científica. 2º ed. 317-337.

Domingo M., Liebana E., Vilafranca M., Aranaz A., Vidal D., Proets N., Mateos A., Casal J. & Dominguez L. 1995. A field evolution of the interferon gama assay and the intradermal tuberculin test in dairy cattle in Spain, p.304-306. In: Griffin F. & Leslie G. (ed.). *Tuberculosis in wildlife and domestic animals*. Otago Conference. Series nº 3, University of Otago Press, Dunedin.

Gonzales-Llamazares O.R., Martín C.B.G., Nistal D.A., Redondo V.A.P., Rodríguez L.D. & Ferri E.F.R. 1999. Field evaluation of the intradermal cervical tuberculin test and the interferon- γ assay for detection and eradication of tuberculosis in Spain. *Vet. Microbiol.* 70:55–66.

Janeway-Jr C.A. & Travers P.O. 1997. O sistema imunologico na saúde e na doença. Edit. Artes Médicas. 2º ed. 1:1–12:34 (paginação irregular).

Langrange P.H. & Hurltel B. 1988. Anergy and other immunologic disturbance in micobacterial infections, p.171–205. In: Bendinelli M. & Friedman H. (ed.), *Mycobacterium tuberculosis*, interaction with the immune system. Plenum Press, New York.

Lilenbaun W., Ribeiro E.R., Souza G.N., Moreira E.C., Fonseca L.S., Ferreira M.A. S. & Schettini J. 1999. Evaluation of na ELISA – PPD for the diagnosis of tuberculosis in field trials in Brasil. *Res. Vet. Sci.* 66:191–195.

- Macruz R. & Bueno P. 1963. Exame histológico da reação cutânea tuberculínica para comprovação do diagnóstico da tuberculose em bovinos. Rev. Paul. Med. Vet. 1:27-29.
- Mathias L.A., MacMillan A.P., Greiser-Wilke I. & Moenning E.V. 1995. Comparação entre a reação de fixação de complemento, teste imunoenzimático indireto e teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos procedentes de rebanhos com histórico da enfermidade. ARS Veterinária, 11:47-55.
- Miltgen J., Morrillon M., Koeck J.L., Varnerot A., Briant J.F. & Nguyen G. 2002. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*. Emerg. Infect. Dis. 8:02
- Monaghan M., Doherty M.L., Collins D., Kazda J.D. & Quinn, P.J. 1994. The tuberculin test. Vet. Microbiol. 40:111-124.
- OIE. 1992. Bovine tuberculosis. OIE manual for diagnosis techniques of livestock diseases. Office International Epizooties. 287–296.
- Pritchard D.G. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888–1988, conquest and controversy. J. Comp. Pathol. 99:357-399.
- Radostits O.M., Blood D.C. & Gray C.C. 1994. Diseases caused by micobacterial species in veterinary medicine. A text book of cattle, sheep, goats and horses. 8º ed. 748-785.
- Roxo E. 1996. Tuberculose bovina. Arq. Inst. Biológico. 63:91-97.
- Roxo E., Vasconcellos S.A., Pinheiro S.R., Baruselli P.S., Macruz R. & Leite C.Q.L. 1998. Evaluation of tuberculin skin reaction in buffalões (*Bubalus bubalis*). Arq. Inst. Biol. 65:81–92.
- Scacchia M., Lelli R., Petrini A., Prencipe V., Calistri P. & Giovannini A. 2000. Use of innovative methods in the eradication of bovine tuberculosis. J. Med. Vet. Bras. 47:321-327.
- Shinnick T.M. & Good R.C. 1994. Mycobacterial taxonomy. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13:884–901.

Tizard I. R. 1998. *Imunologia Veterinária – Uma introdução*. Editora Roca; 5º ed.. 545p.

Walravens K., Marché S., Rosseels V., Wellemans V., Boelaert F., Huygen K. & Godfroid J. 2002. IFN- γ diagnostic test in the context of bovine micobacterial infections in Belgium. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87:401–406.

Wards B.J., Collins D.M. & Lisle G.W. 1995 Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 43:227–240.

Waters W.R., Palmer M.V., Whipple D.L., Carlson M.P. & Nonnecke B.J. 2003. Diagnosis implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis* – infected cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:960–966.

Wedlock D.N., Skinner M.A., Lisle G.W. & Buddle B.M. 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microb. Infect.* 4:471-480.

Whipple D.L., Bolin C.A., Davis A.J., Jarnagin J.L., Johnson D.C., Nabors R.S., Payeur J.B., Saari D.A., Wilson A.J. & Wolf M.M. 1995. Comparasion of the sensitivity of the caudal fold skin test and the commercial γ -interferon assay for the diagnosis of the bovine tuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 56:415–419.

Wood P.R., Corner L.A. & Plackett P. 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of the γ -interferon. *Res. Vet. Sci.* 49:46-49.

Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., Ripper J.L., Fifis T., McCornick B.S., Francis B., Melville L., Small K., De Witte K., Tolson J., Ryan T.J., Lisle G.W., Cox J.C. & Jones S.L. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 31:71–79.

Wood P.R. & Rothel J.S. 1994. *In vitro* imunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 40:125-135.

Wood P.R. & Jones S.L. 2001. Bovigam: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. 81:147-155.

Investigação de focos de tuberculose bovina em rebanhos de corte a partir de lesões sugestivas ao abate no Estado de Mato Grosso do Sul.

Resumo

Com o objetivo de rastrear a infecção por *Mycobacterium bovis* em bovinos de corte de diferentes procedências do Estado de Mato Grosso do Sul, procedeu-se à investigação retrógrada em rebanhos considerados focos segundo inspeção sanitária após abate em cinco matadouros-frigoríficos. As lesões sugestivas de tuberculose foram responsáveis por 63 condenações em 483.047 bovinos abatidos (0,013%). As lesões macroscópicas distribuíram-se nas regiões do tórax (49,21%), da carcaça (33,33%), da cabeça (11,11%) e do abdome (6,35%). O diagnóstico histopatológico demonstrou que 74,6% das lesões tratavam-se de granulomas. As carcaças condenadas por tuberculose foram provenientes de 45 propriedades, das quais três disponibilizaram 865 bovinos para a realização da investigação por meio do teste cervical comparativo (TCC), que não identificou animais reagentes. A não identificação de animais reagentes ao TCC durante a investigação dos focos pode refletir a baixa prevalência de tuberculose bovina em rebanhos de corte.

Palavras-chave: Tuberculose bovina, *Mycobacterium bovis*, teste tuberculinico, lesão tuberculosa, teste cervical comparativo.

Bovine tuberculosis outbreaks investigation through suggestive examination from beef cattle slaughtered in Mato Grosso do Sul.

Abstract

To investigate *Mycobacterium bovis* infection in beef cattle from different origins in Mato Grosso do Sul State, a retrospective study was carried out considering infected herds by the finding of suggestive lesions at carcass inspection in five different slaughterhouses. The suggestive tuberculous lesions were responsible for 65 condemnations in 483.047 animals (0,013%). The macroscopic lesions were observed in the thorax (49,21%), carcass (33,33%), head (11,11%) and abdomen (6,35%). The histopathological diagnosis demonstrated that 74,6% of the finding lesions were granuloma. The tuberculous carcasses were from 45 different herds, from within 3 of them could be investigated by cervical comparative test (CCT), but no positive animals were observed. The absence of reagent animals in the infected herds may reflect the low prevalence observed in beef cattle in Brazil.

Key words: Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, tuberculin test, tuberculous lesion, cervical comparative test.

Introdução

A tuberculose bovina possui distribuição mundial e maior prevalência em países em desenvolvimento. No Brasil, cuja população bovina ultrapassa 185 milhões de cabeças, dados oficiais revelam que aproximadamente 1,3% do rebanho nacional está infectado com *Mycobacterium bovis* (Brasil 2003). O Estado de Mato Grosso de Sul (MS) conta com mais de 24,9 milhões de bovinos (Iagro 2003) e não existem dados oficiais atualizados quanto à prevalência de tuberculose nesses animais.

No âmbito da saúde pública, *M. bovis* agente da tuberculose bovina, é transmitido ao homem e causa doença clinicamente indistinta daquela determinada por *Mycobacterium tuberculosis* (Acha & Szyfres 1986, Grange & Yates 1994). Em relação à saúde e produção animal, *M. bovis* provoca tuberculose nas principais espécies domésticas, além de espécies silvestres (Acha & Szyfres 1986, Morris et al. 1994). No setor pecuário, a tuberculose determina perdas significativas para a produção leiteira, além da queda da eficiência reprodutiva de machos e fêmeas, transmissão do agente ao bezerro por meio do leite e condenação de carcaça (Cafrey 1994, Morris et al. 1994, Roxo 1997).

Um dos métodos de se avaliar a prevalência da tuberculose bovina é a realização de inquérito epidemiológico em matadouros-frigoríficos, onde, a partir das carcaças e vísceras desviadas ao departamento de inspeção final, se identificam alterações anatomopatológicas características. Tabosa et al. (2000) estudaram a ocorrência de tuberculose em bovinos abatidos em matadouro no município de Patos, PB, onde encontraram a ocorrência de 0,48% de lesões em carcaças. Reis & Almeida (2001) estudaram a frequência de tuberculose em bovinos abatidos no município de Uberlândia, MG, e encontraram 0,08% de carcaças condenadas, de um total de 317.372 animais abatidos, no período de 1984 a 1998.

A tuberculose é uma das principais zoonoses transmitidas pelo bovino ao homem. O controle dessa enfermidade depende da constante vigilância sanitária veterinária dentro do contexto de um programa nacional de controle da doença. Os países que obtiveram êxito em seus programas de erradicação adotaram medidas efetivas de diagnóstico e identificação do agente. Os meios diagnósticos utilizados, em sua maioria, foram os testes de tuberculinização intradérmica, com auxílio de exames histopatológicos e de

bacteriologia. A inspeção de abate em matadouros-frigoríficos também foi utilizada como ferramenta importante nas campanhas de erradicação da tuberculose bovina. A Austrália rastreia a origem das carcaças condenadas por lesões sugestivas de tuberculose bovina, por meio do monitoramento do abate, iniciado em 1997, com o objetivo de alcançar o *status* de país livre, previsto para 2008. Os Estados Unidos da América (EUA) e o Canadá iniciaram programas de controle em 1917 e 1923, respectivamente (Essey & Koller 1994), baseados na identificação e sacrifício dos animais reagentes. Hoje, a ocorrência da tuberculose nesses países é rara, e o controle baseia-se no rastreamento retrógrado a partir dos achados de matadouros (Gonçalves 1998).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) brasileiro tem como estratégia certificar propriedades livres ou monitoradas por meio de tuberculinizações e rastreamento das lesões de abate. Com o reconhecimento de área livre da tuberculose bovina será possível oferecer ao consumidor produtos de maior qualidade e de baixo risco sanitário. Além disso, com a melhoria sanitária do rebanho, aumentará a competitividade do país perante os mercados internacionais, com o aumento das exportações de carne e de seus subprodutos (Ferreira-Neto & Bernardi 1997, Brasil 2001).

O objetivo deste trabalho foi rastrear a infecção por *M. bovis* em bovinos de corte de diferentes procedências do Estado de MS, a partir da vigilância sanitária de abate em matadouros-frigoríficos.

Materiais e métodos

Lesões sugestivas de tuberculose a partir da inspeção de abate

As lesões sugestivas de tuberculose bovina colhidas de carcaças condenadas durante a inspeção sanitária *post mortem*, segundo normas técnicas do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (Brasil 1997), de cinco matadouros-frigoríficos de MS, no período de maio a novembro de 2003, foram enviadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) ao Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). As amostras encaminhadas em formol foram processadas para realização do exame histopatológico, sob a coloração de hematoxilina-eosina (HE).

As lesões foram enviadas acompanhadas de formulário (Anexo 1) que incluíam informações de identificação do bovino abatido e sobre as amostras colhidas. A análise das informações permitiu quantificar a ocorrência de carcaças condenadas segundo a propriedade, o matadouro-frigorífico e a distribuição das lesões. Essas foram identificadas em linfonodos, segundo a localização na cabeça, no tórax, abdome e carcaça (Brasil 1997).

Investigação em rebanhos considerados foco

Por meio da análise das informações contidas nos formulários selecionaram-se as propriedades cujo sistema de criação de bovinos de corte incluía cria, recria e engorda para a investigação indireta da tuberculose pelo teste cervical comparativo (TCC). De 45 propriedades que tiveram carcaças condenadas em decorrência de lesões sugestivas de tuberculose, 12 apresentavam esse sistema de criação, e em três propriedades foi possível proceder o TCC.

Realizou-se o TCC nos bovinos adultos de maior permanência nas propriedades e naqueles pertencentes à categoria, que deu origem aos animais que haviam apresentado lesões sugestivas na inspeção de abate (Tabela 1).

Tabela 1. Animais tuberculinizados nas propriedades de criação extensiva cadastradas a partir da detecção de lesões suspeitas de tuberculose ao abate, segundo categoria animal, durante o período de maio a novembro de 2003

Propriedade	Raça	Categoria animal submetida ao teste cervical comparativo						Total
		Bois	Novilhas	Vacas	Touros	Sinuelos	Descartes	
1	Nelore	–	–	36	3	35	–	74
2	Nelore	–	–	19	1	–	–	20
3	Brangus e Nelore	57	494	73	71	36	40	771
Total		57	494	240	74	71	40	865

Tuberculinização

As tuberculinizações foram realizadas e interpretadas de acordo com o artigo 32 do Regulamento Técnico do PNCEBT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), que se refere ao diagnóstico indireto da tuberculose por meio do TCC (Brasil 2001).

Abate após tuberculinização

Após a realização do TCC nos 57 bois e nas 494 novilhas da propriedade 3 (Tabela 1), os animais foram abatidos e a inspeção de abate acompanhada.

Resultados

A Tabela 2 registra o número de carcaças bovinas desviadas na linha de abate em decorrência da detecção de lesões sugestivas de tuberculose durante a inspeção sanitária *post mortem*, segundo o matadouro-frigorífico.

Tabela 2. Número de carcaças desviadas na linha de abate pela detecção de lesões sugestivas de tuberculose durante a inspeção sanitária *post mortem* de animais abatidos segundo o matadouro-frigorífico, durante o período de maio a novembro de 2003

Matadouro-frigorífico	Nº animais abatidos	Nº de condenações	% de condenações
1	80.919	26	0,032
2	102.601	3	0,003
3	65.822	11	0,017
4	68.932	2	0,003
5	164.773	21	0,013
Total	483.047	63	0,013

As lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina, detectadas na inspeção de abate, distribuíram-se nas regiões do tórax (49,21%), da carcaça (33,33%), da cabeça (11,11%) e do abdome (6,35%). No tórax, os principais linfonodos comprometidos foram os traqueobrônquicos, mediastinais e esofagianos; na carcaça, os pré-escapulares e pré-peitorais; na cabeça, o retrofaríngeo; e no abdome, o hepático. O aspecto macroscópico da maioria dessas lesões era nodular, de diferentes tamanhos e de coloração amarela, às vezes calcificada. O exame histológico das lesões sugestivas de tuberculose bovina revelou, além de granulomas, outras patologias (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado do exame histopatológico sugestivos de tuberculose bovina durante a inspeção sanitária *post mortem* de animais abatidos, durante o período de maio a novembro de 2003

Diagnóstico microscópico	Nº	%
Granuloma	47	74,6
Abscesso	11	17,5
Inconclusivo	5	7,9
Total	63	100

O achado de granuloma ao exame histopatológico ocorreu em amostras de 36 das 45 propriedades que tiveram carcaças condenadas, incluindo as três propriedades selecionadas para investigação retrospectiva por meio da tuberculinização.

A maioria dos granulomas consistiu de um centro de necrose caseosa ou de calcificação circundada por intensa proliferação de células mononucleares, muitas vezes alongadas

com características de células epitelióides, e células gigantes do tipo Langhans. Algumas lesões estavam envolvidas por cápsula fibrosa.

Investigação retrógrada em focos por meio da tuberculinização

Das 12 propriedades selecionadas para a investigação retrógrada, em nove não foi possível realizar os exames, pois os proprietários não disponibilizaram o acesso. A Tabela 4 sistematiza o resultado do TCC em bovinos de corte provenientes, de focos segundo a vigilância sanitária, após abate.

Tabela 4. Sistematização do estudo retrospectivo por meio da teste cervical comparativo em rebanhos considerados focos à partir da detecção das lesões sugestivas de tuberculose ao abate

Propriedade	Rebanho	Nº animais abatidos	Carcaças condenadas	Total de animais examinados	Teste cervical comparativo
1	2700	306	3	74	negativo
2	400	40	2	20	negativo
3	8000	796	4	771	negativo

O abate realizado no lote da propriedade 3, após TCC negativo, teve uma carcaça condenada em decorrência de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose.

Discussão

O diagnóstico presuntivo *post mortem* de tuberculose bovina revelou menor prevalência aparente (Tabela 2) quando comparado com outros trabalhos isolados realizados no Brasil, pois Schenk & Schenk (1982), em levantamento realizado, entre 1974 e 1979, no Estado de MS em matadouros-frigoríficos encontraram 0,2%. Na Paraíba, Tabosa et al. (2000), em estudo semelhante com bovinos abatidos no município de Patos, encontraram 0,48% de lesões em carcaças. Da mesma forma, em Minas Gerais, Reis & Almeida (2001) encontraram 0,08% de carcaças condenadas em animais abatidos no município de Uberlândia, no período de 1984 a 1998.

As lesões sugestivas de tuberculose bovina encontradas, neste estudo, apresentaram-se na avaliação macroscópicas semelhante às descritas por Reis et al. (1996), os quais também observaram lesões de diferentes tamanhos, de coloração amarela e aspecto caseoso ou caseo-calcificado. Tais lesões concentraram-se na região torácica (49,21%), o que não difere dos achados de Jorge (2001), no Estado de MS (42,9%). Corner (1994), Wipple et al. (1996) e Sousa et al. (2002) também encontraram maior incidência de

lesões macroscópicas de tuberculose em linfonodos da região torácica, o que reforça os relatos de que a via inalatória é a principal porta de entrada de *M. bovis*.

O exame histopatológico das 63 lesões de abate identificou granuloma em 74,6% das amostras (Tabela 3). Em vista disso, a prevalência aparente (0,013%) de carcaças condenadas sugestivas de tuberculose, neste estudo, é ainda menor, pois 16 das 63 amostras avaliadas (25,4%) foram diagnosticadas como sendo determinadas por outras patologias (Tabela 3). A condenação dessas 16 carcaças, como suspeitas de tuberculose, justifica-se em função das semelhanças macroscópicas entre as lesões provocadas em linfonodos pela tuberculose, linfossarcoma e linfadenites inespecíficas, o que impossibilita o diagnóstico definitivo apenas pelas observações durante a inspeção de abate (Reis et al. 1995). As características histológicas dos granulomas estão de acordo com os achados de Cassidy et al. (1999) e Ameni et al. (2000), que encontraram infiltrado celular mononuclear, células gigantes e centro necrótico caseoso ou calcificado.

Embora se tenha observado granuloma em 74,6% das lesões recomenda-se associar o estudo histopatológico ao bacteriológico que serve para controlar o diagnóstico realizado durante a inspeção de abate (CPZ 1988), situação prevista no PNCEBT (Brasil 2001).

A investigação retrograda de focos de tuberculose realizada em propriedades de corte, após inspeção de abate, permitiu observar que pode haver associação entre o sistema de produção e o resultado do diagnóstico presuntivo da tuberculose bovina, pois em 865 bovinos, das três propriedades rastreadas, não foram diagnosticados animais positivos no TCC. Enquanto que, em outro estudo (Almeida et al. 2004 — dados não publicados) com 265 bovinos de propriedades de exploração leiteira, encontraram quatro animais reagentes. O diagnóstico da doença em propriedades com esse sistema de produção está de acordo com as observações de muitos autores, os quais consideram a tuberculose bovina como mais prevalente em rebanhos leiteiros, e de menor importância epidemiológica nos animais de corte (Kantor & Ritacco 1994, Radostits et al. 1994, Souza et al. 1999, Buzatto et al. 2002), embora o processo de desenvolvimento e intensificação do sistema de produção de gado de corte colabore para o aumento da ocorrência da tuberculose bovina, por causa do confinamento, do intenso trânsito e da compra e venda de animais. Além disso, em um programa de controle deve ser

considerada a possibilidade de que bovinos de corte possam representar fonte de reinfecção de rebanhos de leite controlados, como ocorreu na Nova Zelândia (Tweddle & Livingstone 1994).

A situação especial observada na propriedade 3, em que um animal negativo no TCC apresentou lesões sugestivas na inspeção de abate, pode ser considerada como reação falso-negativa, motivada por tuberculose avançada ou recente (Francis 1947, Lepper et al. 1977, Monaghan et al. 1994), animal dessensibilizado (Keer et al. 1946), baixa potência da tuberculina ou variação na sua dose pelo uso de seringa multidose não calibrada (Monaghan et al. 1994). De outra forma, pode também ser considerado que se tratava de um resultado verdadeiro negativo e a lesão encontrada tratava-se de outra patologia, com característica macroscópica semelhante (Reis et al. 1995).

No Brasil, como em outros países em desenvolvimento, há dificuldades para controlar ou erradicar a tuberculose bovina. Apesar de na América Latina e no Caribe (Kantor & Ritacco 1994), na África (Cosivi et al. 1998) e em vários outros países terem programas de controle da tuberculose bovina, existem fatores que podem limitar o seu sucesso. Entre estes se destacam a escassez de recursos financeiros para implantar um programa sistemático de teste e sacrifício, deficiências nos sistemas de informação e de controle de trânsito de animais, pouco envolvimento da indústria e criadores no financiamento e implantação dos programas, conhecimento insuficiente da distribuição e prevalência da tuberculose bovina e existência de outras doenças com impacto mais visível na produtividade animal (Gonçalves 1998).

Em Mato Grosso do Sul, com rebanho superior a 24,9 milhões de cabeças (Iagro 2003), além dos fatores que podem limitar o sucesso dos programas de controle destacados por Gonçalves (1998), depara-se com a dificuldade operacional de se submeterem todas as fêmeas com idade superior a 24 meses e todos os machos reprodutores aos testes diagnósticos, no caso de confirmação da infecção por *M. bovis* em animais pertencentes a propriedades onde detectaram lesões sugestivas de tuberculose durante a inspeção sanitária *post mortem*. Além disso, neste estudo, a adesão de apenas três dos 12 proprietários reflete que a cooperação voluntária à investigação de foco compromete as ações sanitárias. Os criadores não receptivos mostraram falta de conhecimento sobre a apresentação e prejuízos que a doença acarreta, pois a maioria considera que bovinos no ponto de abate não poderiam ser tuberculosos e colocaram em dúvida os resultados da

vigilância sanitária após o abate. Nesse contexto, considera-se crucial o papel do médico-veterinário, tanto oficial como da iniciativa privada, para conscientizar o produtor da importância de tentar reduzir a prevalência e prevenir a expansão da doença.

A identificação dos rebanhos suspeitos, a partir da inspeção de abate, e o direcionamento da realização de testes sistemáticos nesses animais diminuirá o tempo necessário para a concessão do *status* de área livre de tuberculose bovina, pois, para as autoridades brasileiras, muito mais do que cotas ou tarifas, as barreiras sanitárias serão instrumentos cada vez mais usados na defesa de interesses de quem está perdendo mercado para o Brasil no agronegócio mundial. Portanto, é preciso estar preparado para enfrentar essas barreiras e não perder oportunidades, além de estar consciente de que o sucesso dependerá da integração entre os órgãos de defesa sanitária, instituições de ensino e pesquisa e o setor produtivo.

Cabe descrever que as lesões de abate que deram origem a esse estudo foram encaminhadas, também, para o estudo microbiológico, no qual Araújo et al. (2004) (dados não publicados) isolaram BAAR e identificaram *M. bovis* pela reação em cadeia da polimerase, o que indica a presença da tuberculose bovina no rebanho de corte de MS.

Referências

Acha P.N. & Szyfres B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Parte I: Bacteriosis – Tuberculosis zoonótica. Organization Mundial de la Salud, 2º edicion, 174–185.

Ameni G., Miörner H., Roger F. & Tibbo M. 2000. Comparasion between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. Trop. Anim. Health Prod. 32:267–276.

Brasil 1997. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 247p.

Brasil 2001. Legislação do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 55p.

Brasil 2003. Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 126p.

Buzatto A.B., Souza C.W.O. & Leite C.Q.F. 2002. Prevalência de reagentes ao teste de tuberculinização no rebanho leiteiro da região de São Carlos – SP. Rev. Ciênc. Farm. 23:87–95.

Caffrey J.P. 1994. Status of tuberculosis eradication programmes in Europe. Vet. Microbiol. 40:1-4.

Cassidy J.P., Bryson D.G., Pollock J.M., Evans R.T., Forster F. & Neill S.D. 1999. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis* – inoculated calves. J. Comp. Pathol. 121:321-337.

Corner L.A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40:53-63.

Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., Kantor I. & Meslin F.X. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg. Infect. Dis. 4:59-70.

CPZ 1988. Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal. Séries monografias científicas y tecnicas. Centro Panamericano de zoonosis.11:1-63.

Essey M.A. & Koller M.A. 1994. Status of bovine tuberculosis in North America. Vet. Microbiol. 40:15-22.

Ferreira-Neto J.S. & Bernardi F. 1997. Control of bovine tuberculosis, particularly in Brazil. Hig. Alim. 11:9-13.

Francis J. 1947. Bovine tuberculosis, including a contrast with human tuberculosis. Staples press. 220p.

Gonçalves V.S.P. 1998. Programas de controle e erradicação da tuberculose bovina. Encontro Mineiro sobre Tuberculose Bovina. Associação brasileira de Buiatria. <http://www.mgar.vet.br/buiatria/TbBovNet> – Acesso em 14 de abril de 2004.

Grange J.M. & Yates M.D. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Vet. Microbiol. 40:137-151.

Iagro 2003. Informe consolidado da campanha de vacinação contra febre aftosa das regiões de planalto e pantanal. Agência de defesa sanitária animal e vegetal do Estado de Mato Grosso do Sul.

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

Kantor I.N. & Ritaco V. 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. Vet. Microbiol. 40:5-14.

Kerr W.R., Lamont H.G. & McGirr J.L. 1946. Studies on tuberculin sensitivity in the bovine. Vet. Rec. 58:443-446.

Lepper A.W.D., Pearson C.W. & Corner L.A. Anergy to tuberculin test in beef cattle. Vet. J. 53:214-216.

Monaghan M., Doherty M.L., Collins D., Kazda J.D. & Quinn, P.J. 1994. The tuberculin test. Vet. Microbiol. 40:111-124.

Morris R.S., Pfeiffer D.U. & Jackson R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet. Microbiol. 40:153-177.

Radostits O.M., Blood D.C. & Gray C.C. 1994. Diseases caused by micobacterial species in veterinary medicine. A text book of cattle, sheep, goats and horses. 8º ed. 748-785.

Reis D.O., Almeida L. & Faria A.R. 1995. Estudo comparativo entre linfossarcoma, tuberculose e linfadenites inespecíficas ocorridas em bovinos abatidos e a confirmação histopatológica. Hig. Alim. 35:28-30.

Reis D.O., Coelho H.E. & Lucio N. F. 1996. Características morfológicas das lesões de tuberculose, em bovinos abatidos. Hig. Alim. 10:15-16.

Reis D.O. & Almeida L.P. 2001. Zoonoses reemergentes: um estudo com bovinos abatidos em frigoríficos da região Sudeste do país. Hig. Alim. 15:23-26.

- Roxo E. 1997. *M. bovis* como causa de zoonose Rev. Ciênc. Farm..18:101-108
- Schenk M.A.M. & Schenk J.A.P. 1982. Prevalência de tuberculose, cisticercose e hidatidose em bovinos abatidos nos matadouros-frigoríficos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (1974/1979). Embrapa Gado de Corte - Comunicado técnico. 11:1-4.
- Sousa R.D., Reis D.O., Guimarães K.C.S. & Aquino C.A.M. 2002. Linfonodos com maior frequência de localização para tuberculose bovina, em animais abatidos em um frigorífico sob inspeção federal, no município de Uberlândia – MG. Hig. Alim. 17:35-39.
- Souza A.V., Sousa C.F.A., Souza R.M., Riberio R.M.P. & Oliveira A.L. 1999. A importância da tuberculose como zoonose. Hig. Alim. 13:22-27.
- Tabosa I.M., Medeiros V.T., Dantas G.M.G.A.F.M., Vieira J.M., Medeiros M.B.A., Azevedo E.O., Melo M.A., Andrade M.G., Souza S.B., Medeiros L.S., Rodrigues R.D. & Xavier S.D. 2000. Ocorrência de tuberculose em bovinos abatidos em matadouro municipal de Patos - PB – Brasil. Rev. Bras. Cien. Vet. 7:61-62.
- Tweddle N.E. & Livingstone P. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. Vet. Microbiol. 40:23-39.
- Whipple D.L., Bolin C.A. & Miller J.M. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. J. Vet. Diag. Invest. 8:351-354.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro passo para a erradicação da tuberculose bovina é a educação prévia da comunidade pecuária. Os criadores devem ser notificados sobre o significado econômico da doença, sua importância à saúde pública e da necessidade de várias etapas em um programa de erradicação. A adesão ao programa deve gerar compensações aos pecuaristas, sendo estimulada a cooperação por meio do pagamento por animais sacrificados, mesmo que de forma parcial, ou de bonificações para os rebanhos, leite ou carne livres de tuberculose.

No início de um programa de erradicação, é essencial determinar a prevalência e a distribuição da doença. Isso pode ser conseguido por meio da inspeção de abate, mais voltada para o gado de corte, e por meio da tuberculinização em rebanhos de leite, pois nestes o teste tuberculínico é mais fácil de ser realizado, por causa dos rebanhos serem menores e mais concentrados quando comparados aos rebanhos de corte.

Determinada a prevalência e a distribuição, a erradicação pode ter início em rebanhos e áreas com baixa incidência da doença, o que propicia um núcleo de bovinos livres e monitorados, o qual irá suprir as substituições em outras áreas à medida que forem sendo incluídas no esquema de erradicação.

O rastreamento de propriedades, a partir da inspeção de abate, pode ser a principal fonte de informação sobre a localização de rebanhos acometidos. Esse sistema de identificação é muito importante, pois como a prevalência nos animais de corte é muito baixa, será mais válido direcionar as ações sanitárias para as propriedades com condenações de carcaças em vez de examinar rebanhos que não tenham casos relatados.

Alguns fatores, como tamanho do rebanho, extensão territorial, infra-estrutura, topografia, clima, fronteiras, características das criações, existência de serviços veterinários organizados e disponibilidades de recursos financeiros, facilitam ou dificultam as ações de controle, não só da tuberculose bovina, mas de todas as doenças que acometem os animais de interesse econômico. Para o Brasil obter sucesso na erradicação da tuberculose bovina é essencial a participação de todos os elos da cadeia produtiva da carne e do leite, de maneira integrada com os médicos-veterinários da iniciativa privada, com os órgãos de vigilância e defesa sanitária dos Estados,

instituições de ensino e pesquisa e, principalmente, a viabilização de recursos financeiros para o planejamento e execução das ações sanitárias.

4 REFERÊNCIAS

- Acha P.N. & Szyfres B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Parte I: Bacteriosis – Tuberculosis zoonótica. Organization Mundial de la Salud. 2º edicion. 174–185.
- Ameni G., Miörner H., Roger F. & Tibbo M. 2000. Comparasion between Comparative Tuberculin and Gamma-Interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. Trop. Anim. Health Prod. 32:267–276.
- Aranaz A., Cousins D., Mateos A. & Domínguez L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1785-1789.
- Bean A.G., Roach D.R., Briscoe H., France M.P., Korner H., Sedgwick J.D & Britton W.J. 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targed mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. J. Immunol. 162:3504-3511.
- Brasil 1994. Manual de bacteriologia da tuberculose. Ministério da Saúde. 2º edição. 115p.
- Brasil 2001. Legislação do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 55p.
- Brasil 2003. Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 126p.
- Buzatto A.B., Souza C.W.O. & Leite C.Q.F. 2002. Prevalência de reagentes ao teste de tuberculinização no rebanho leiteiro da região de São Carlos – SP. Rev. Ciênc. Farm. 23:87–95.
- Caffrey J.P. 1994. Status of tuberculosis eradication programmes in Europe. Vet. Microbiol. 40:1-4.

- Cassidy J.P., Bryson D.G., Pollock J.M., Evans R.T., Forster F. & Neill S.D. 1999. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis* – inoculated calves. J. Comp. Path. 121:321-337.
- Chan J., Tanaka K., Carroll D., Flynn J. & Bloom B.R. 1995. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on infection murine with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 63:736-740.
- Collins D.M. 2001. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis. 81:97-102.
- Collins D.M., Radford A.J., Lisle G.W. & Jacobs H.B. 1994. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. Vet. Microbiol. 40:83-94.
- Corrêa W.M. & Corrêa C.N.M. 1992. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos - Tuberculose. Edit. Médica e Científica. 2º ed. 317-337.
- Corner L.A. 1994. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40:53-63.
- Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., Kantor I. & Meslin F.X. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg. Infect. Dis. 4:59-70.
- Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodríguez (D.), Loureiro J., Romano M.I., Alito A., Zumarraga M. & Bernardelli A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1305-1314.
- Essey M.A. & Koller M.A. 1994. Status of bovine tuberculosis in North America. Vet. Microbiol. 40:15-22.
- Ferreira-Neto J.S. & Bernardi F. 1997. Control of bovine tuberculosis, particularly in Brazil. Hig. Alim. 11:9-13.

Flesch I.E.A. & Kaufmann S.H.E. 1990. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gama-interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 58:2675-2677.

Francis J. 1947. Bovine tuberculosis, including a contrast with human tuberculosis. Staples press. 220p.

Goodchild A.V. & Clifton-Hadley R.S. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis.* 81:23-41.

Gormley E. & Collins J.D. 2000. The development of wildlife control strategies for eradication of tuberculosis in cattle in Ireland. *Tuber. Lung. Dis.* 80:229-236.

Grange J.M & Yates M.D. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.* 40:137-151.

Haagsma J. 1995. Bovine tuberculosis. Manual Amendment 2. Office International des Épizooties. 11p.

Janeway-Jr C.A. & Travers P.O. 1997. O sistema Imunológico na saúde e na doença. Edit. Artes Médicas. 2º ed. 1:1-12:34.

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

Jorge K.S.G., Ono T.M., Souto M.A.B., Almeida R.F.C. & Osório A.L.A.R. 2002. Análise comparativa dos métodos de petroff e do ácido oxálico na descontaminação de tecido com lesão de tuberculose bovina In. XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. CD-Room.

Kantor I.N. & Ritaco V. 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.* 40:5-14.

Kehrli M.E., Nonnecke B.J. & Roth J.A. 1989. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50:215-220.

Kelly W.R. & Collins J.D. 1978. The health significance of some infectious agents presents in animal effluents. *Vet. Sci. Com.* 2:95–103.

Kerr W.R., Lamont H.G., & McGirr J.L. 1946. Studies on tuberculin sensitivity in the bovine. *Vet. Rec.* 58:443-446.

Keet D.F, Kriek N.P, Penrith M.L, Michel A. & Huchzermeyer H. 1996. Tuberculosis in buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park: spread of the disease to other species. *J. Vet. Res.* 63:239-244.

Leite C.Q.F., Souza C.W.O. & Leite S.R. 1998. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic of mycolic acids and conventional biochemical methods: four years of experience. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93:801:805.

Leite C.Q.F., Anno I.S., Leite S.R.A., Roxo E., Morlock G.P. & Cooksey R.C. 2003. Isolation and identification of Mycobacterial from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98:319-323.

Lepper A.W.D., Pearson C.W. & Corner L.A. 1977. Anergy to tuberculin test in beef cattle. *Vet. J.* 53:214-216.

Liebana E., Arana A., Mateos A., Vilafranca M., Gomez-Mampaso E., Tercero J.C., Alemany J., Suarez G., Domingo M. & Dominguez L. 1995. Simple and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:33-36.

Lilenbaun W., Schettini J., Ribeiro E.R. Souza G.N., Moreira E.C. & Fonseca L. 1998. Tuberculose bovina: Prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção na Região dos Lagos do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Med. Vet.* 20:20-123.

Magdalena J., Vachee A., Supply P. & Locht C. 1998. Identification of a new DNA region specific for members of mycobacterium tuberculosis complex. *J. Clin. Microbiol.* 36:947-943.

McIlroy S.G., Neill S.D. & McCracken R.M. 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. Vet. Rec. 118:718-721.

Menzies F.D. & Neill S.D. 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. Vet. J. 160:92-106.

Miltgen J., Morrillon M., Koeck J.L., Varnerot A., Briant J.F. & Nguyen G. 2002. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti*. Emerg. Infec. Dis. 8:02

Moda G., Daborn C.J., Granje J.M. & Cosivi O. 1996. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. Tuberc. Lung Dis. 77:103-108.

Monaghan M., Doherty M.L., Collins D., Kazda J.D. & Quinn, P.J. 1994. The tuberculin test. Vet. Microbiol. 40:111-124.

Morris R.S., Pfeiffer D.U. & Jackson R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet. Microbiol. 40:153-177.

Neill S.D., Hanna J., O'Brien J.J. & McCracken R.M. 1989. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. Vet. Rec. 124:269-271.

Neill S.D., Pollock J.M., Bryson D.B. & Hanna J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40:41-52.

O'Reilly L.M. & Daborn C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tuber. Lung Dis. 76:1-46.

Palmer M.V., Waters W.R. & Wipple D.L. 2002. Aerosol delivery of virulent *Mycobacterium bovis* to cattle. Tuberculosis. 82:275-282.

Pritchard D.G. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988. J. Comp. Pathol. 99:357-399.

Radostits O.M., Blood D.C. & Gray C.C. 1994. Diseases caused by micobacterial species in veterinary medicine. A text book of cattle, sheep, goats and horses. 8° ed. 748-785.

Reis, D.O., Coelho H.E. & Lucio, N. F. 1996. Características morfológicas das lesões de tuberculose, em bovinos abatidos. Hig. Alim. 10:15-16.

Reis D.O. & Almeida L.P. 2001. Zoonoses reemergentes: Um estudo com bovinos abatidos em frigoríficos da região sudeste do país. Hig. Alim. 15:23-26.

Roach D.R., Briscoe H., Baumgart K., Rathjen D.A. & Britton W.J. 1999. Tumor necrosis factor (TNF) and TNF mimetic peptide modulate the granulome response to *Micobacterium bovis* BCG infection *in vivo*. Infect. Immun. 67:5473-5476.

Rodriguez J.G., Fissanoti J.C., Del Portillo P., Patarroyo M.E., Romano M.I. & Cataldi A. 1999. Amplification of 500-base-pair fragment from culture isolates of *Mycobacterium bovis*. J. Clin. Microbiol. 37:2330-2332.

Romero R.E, Garzon D.L, Mejia G.A, Monroy W., Patarroyo M.E, Murillo L.A. 1999. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. Can. J. Vet. Res. 63:101-106.

Roxo E. 1996a. Tuberculose bovina. Arq. Inst. Biológico. 63:91-97.

Roxo E. 1996b. Avaliação da resposta imunoalérgica cutânea à tuberculina em bubalinos (*Bubalus bubalis*). Tese de Doutorado. USP. 55p.

Roxo E. 1997. *M. bovis* como causa de zoonose Rev. Ciênc. Farm..18:101-108.

Scacchia M., Lelli R., Petrini A., Prencipe V., Calistri P. & Giovannini A. 2000. Use of innovative methods in the eradication of bovine tuberculosis. J. Med. Vet. Bras. 47:321-327.

Schwarz P., Silva L.E., Marchetti A.N., Bortolozzo F.P., Driemeier D., Dias C.P., Fernandes J.C.T., Wentz I. & Cardoso M.R.I. 2002. Ocorrência de surto tuberculose causada pelo complexo *Mycobacterium*... Acta Sci. Vet. 30:197-200.

- Sechi L.A., Dupre I., Leori G., Fadda G. & Zanetti S. 2000. Distribution of specific 500-base-pair fragments in *Mycobacterium bovis* isolates from Sardinian cattle. J. Clin. Microbiol. 38:3837-3839.
- Shinnick T.M. & Good R.C. 1994. Mycobacterial taxonomy. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13:884-901.
- Souza A.V., Sousa C.F.A., Souza R.M., Riberio R.M.P. & Oliveira A.L. 1999. A importância da tuberculose como zoonose. Hig. Alim. 13:22-27.
- Tabosa I.M., Medeiros V.T., Dantas G.M.G.A.F.M., Vieira J.M., Medeiros M.B.A., Azevedo E.O., Melo M.A., Andrade M.G., Souza S.B., Medeiros L.S., Rodrigues R.D. & Xavier S.D. 2000. Ocorrência de tuberculose em bovinos abatidos em matadouro municipal de Patos - PB – Brasil. Rev. Bras. Cien. Vet. 7:61-62.
- TbBovNet 2001. Dados oficiais sobre a tuberculose bovina no Brasil. Associação Brasileira de Buiatria. Disponível em: <http://www.technovet.com.br/buiatria/tbbovnet>.
- Tizard I. R. 1998. Imunologia Veterinária – Uma introdução. Edit. Roca; 5º ed.. 545.
- Tweddle N.E. & Livingstone P. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. Vet. Microbiol. 40:23-39.
- Vitale F., Capra G., Maxia L., Reale S., Vesco G. & Caracappa S. 1998. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. J. Clin. Microbiol. 36:1050-1055.
- Walravens K., Marché S., Rosseels V., Wellemans V., Boelaert F., Huygen K. & Godfroid J. 2002. IFN- γ diagnostic test in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. Vet. Immunol. Immunopathol. 87:401-406.
- Wards B.J., Collins D.M. & Lisle G.W. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 43:227-240.
- Waters W.R., Palmer M.V., Whipple D.L., Carlson M.P. & Nonnecke B.J. 2003. Diagnosis implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis* – infected cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10:960-966.

Wedlock D.N., Skinner M.A., Lisle G.W. & Buddle B.M. 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microb. Infect.* 4:471-480.

Wood P.R., Corner L.A. & Plackett P. 1990. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of the γ -interferon. *Res. Vet. Sci.* 49:46-49.

Wood P.R., Corner L.A., Rothel J.S., Ripper J.L., Fifis T., McCornick B.S., Francis B., Melville L., Small K., De Witte K., Tolson J., Ryan T.J., Lisle G.W., Cox J.C. & Jones S.L. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 31:71-79.

Wood P.R. & Rothel J.S. 1994. *In vitro* immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 40:125-135.

Wood P.R. & Jones S.L. 2001. Bovigam: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 81:147-155.

Woodhead G.S., Martin S.H.C., McFadyean J. & Boyce R.W. 1911. Final report of the Royal Commission appointed to inquire into the relations of human and animal tuberculosis: Part 1: report. Royal Commission on Tuberculosis (Human and Bovine). <http://www.bopcris.ac.uk/bop1900/ref614.html>

Wray C. 1975. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Vet. Bull.* 45:543-550.

Zanini M.S., Moreira E.C., Lopes M.T.P., Mota P. & Salas C.E. 1998. Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Bras.* 45:473-479.

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. 2001. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction Fragment length polymorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96:809-813.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Conceituação e histórico	1
1.2 Agente etiológico	1
1.3 Epidemiologia	2
1.3.1 Hospedeiros e transmissão	3
1.3.2 Distribuição geográfica	5
1.3.3 Importância	5
1.4 Tuberculose como zoonose	6
1.5 Imunopatogenia	7
1.6 Sinais clínicos	9
1.7 Diagnóstico	9
1.8 Controle	13
2 ARTIGOS	
2.1 Resposta imune específica à infecção por <i>Mycobacterium bovis</i> e <i>Mycobacterium avium</i> inativados em bovinos	17
Resumo	17
Abstract	17
Introdução	18
Materiais e métodos	20
Resultados	22
Discussão	25
Referências	26
2.2 Investigação de focos de tuberculose bovina em rebanhos de corte a partir de lesões sugestivas ao abate no Estado de Mato Grosso do Sul	31
Resumo	31
Abstract	31
Introdução	32
Materiais e métodos	33
Resultados	35
Discussão	36
Referências	39
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
4 REFERÊNCIAS	45