

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em cortes
histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos**

Susiene da Costa Martins

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
OUTUBRO DE 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

PROGRAMA MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em cortes
histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos

Susiene da Costa Martins

Orientador: Prof. Dr. **Eurípedes Batista Guimarães**

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

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
2004**

Ficha catalográfica elaborada pela
Coordenadoria de Biblioteca Central/UFMS

Martins, Susiene da Costa

M386p Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em cortes histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos / Susiene da Costa Martins. -- Campo Grande, MS, 2004.

46 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eurípedes Batista Guimarães.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

1. Tuberculose nos animais. 2. Mycobacterium bovis. I. Guimarães, Eurípedes Batista. II. Título.

CDD (21) – 636.20894542

*"As nuvens mudam sempre
de posição, mas são sempre
nuvens no céu. Assim
devemos ser todo dia,
mutantes, porém, leais com
o que pensamos e sonhamos;
lembre-se, tudo se
desmancha no ar, menos os
pensamentos." (Paulo
Baleki)*

*Aos amigos Jefferson
Teruya de Souza,
Joselaine Genaro
Nakamura Smaka e Vera
Regina Arakaki Aratani,
pois sem seu auxílio não
teria sido possível a
conclusão deste mestrado.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Eurípedes Batista Guimarães, pela paciência, confiança e auxílio para execução deste estudo;

Ao colega Fernando Henrique pela ajuda na confecção das lâminas;

Aos funcionários do laboratório de anatomia patológica do hospital veterinário, especialmente à Dona Carmem pelas dicas para agilizar o trabalho;

À Marilete, secretária do mestrado por estar sempre gentil e solícita;

À minha família, pai, mãe e irmãs, que me amam e apoiam mesmo quando acham que estou errada;

À Deus pelo dom da vida e pela força de viver;

À meu noivo por todos os bons momentos;

À minha madrinha que confeccionou meu vestido de noiva e me deixou muito mais tranqüila para realizar esta dissertação;

Aos amigos que alegam nossa existência;

À Pê, simplesmente pela sua companhia, carinho e aconchego;

À bondade e beleza que ainda há no mundo.

SUMÁRIO

ASSUNTO	Pg
1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1.Aspectos históricos.....	01
1.2.Etiologia.....	03
1.2.1.Caracterização do agente.....	03
1.2.2.Composição química do agente.....	06
1.3.Imunopatogenia.....	07
1.4.Transmissão.....	10
1.4.1.Transmissão a bovinos.....	10
1.4.2.Transmissão a humanos.....	11
1.5.Patologia.....	12
1.5.1.Bovinos.....	12
1.5.2.Humanos.....	15
1.6.Diagnóstico.....	16
1.7.Desenvolvimento de vacinas.....	20
1.8.Epidemiologia.....	21
1.8.1.A tuberculose no mundo.....	21
1.8.2.A tuberculose e seu controle no Brasil.....	23
1.8.2.1.Plano Nacional de Controle e Erradicação.....	25
2.REFERÊNCIAS.....	26
3.ARTIGO: Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em cortes histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos.....	32
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	43
4.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

85B	Antígeno micobacteriano 85B
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CD25	Receptores envolvidos na ativação de células T
CD4	Receptores envolvidos na restrição de MHC e ativação de células T
CD44	Receptores envolvidos ativação de células T
CD62	Receptores envolvidos na ativação de células T
CD8	Receptores envolvidos na restrição de MHC e ativação de células T
CFP10	Antígeno micobacteriano CFP10
CR3	Receptor do complemento 3
DIF	Departamento de Inspeção Final
DNA	Ácido desoxiribonucléico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)
ESAT6	Antígeno micobacteriano ESAT6
Fc	Fragment, crystalline in antibody feedback
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Human immunodeficienty virus (vírus da imunodeficiência humana)
IL	Interleucina
INF	Interferon
INF-	Interferon-gama
IS6110	Antígeno micobacteriano IS6110
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MDRTE	Multirresistência a drogas antituberculosas
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
MPB70	Antígeno micobacteriano MPB70
MPB83	Antígeno micobacteriano MPB83
OPAS	Organização Panamericana de saúde
PCR	Polymerase Chain reaction (Reação da Polimerase em Cadeia)
PNCEBT	Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	Derivado Protéico Purificado
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana
SIF	Serviço de Inspeção Federal
Tb	Tuberculose
TLR2	Tool like receptor
TNF-	Fator de necrose tumoral
TPX	Thiol peroxidase protein (antígeno micobacteriano)
ZN	Ziehl-Neelsen

LISTA DE TABELAS

Título	Página
Tabela 1. Diagnóstico histopatológico em cortes histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos, observadas durante a inspeção <i>post mortem</i> de animais abatidos em Mato Grosso do Sul, durante o período de maio a novembro de 2003	38

LISTA DE FIGURAS

Título	Página
Fig.1. Linfonodo parotídeo; nodulações amareladas encapsuladas (Nd)	39
Fig.2. Microfotografia; linfonodo parotídeo; granuloma cápsula fibrosa (cf); necrose caseosa (nc); Precipitação de Ca ⁺⁺ (pc) H&E 40X; detalhe = Ca ⁺⁺ H&E 400X	39
Fig.3. Microfotografia; linfonodo parotídeo; Células Gigantes tipo Langhans (cl); Detalhe células epitelióides H&E 1000X	39
Fig.4. Microfotografia; linfonodo parotídeo; bacilo álcool-ácido-resistentes distribuídos difusamente e no interior de macrófagos (detalhe) Ziehl-Neelsen-Faraco 1000X -	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos históricos

A tuberculose é uma enfermidade conhecida desde a antigüidade. Existem referências da presença dessa doença em múmias egípcias, e nos escritos dos filósofos Hipócrates, Celsus e Avicena. Aristóteles, que viveu entre 384-322 a.C, fez as primeiras descrições da tuberculose em animais mas, naquela época, as lesões encontradas em bovinos eram atribuídas a outras infecções (Fapemig, 2004).

Mesmo anteriormente à descoberta das bactérias, há várias referências sobre o perigo que representava, para o homem, o consumo de carne de animais afetados de caquexia. Muito provavelmente porque entre as doenças com esta forma de apresentação estava incluída a tuberculose bovina. No Talmud, livro sagrado para os hebreus, codificado no final século II, os rabinos proibiam ao povo o consumo de carne de bovinos em cujos pulmões fossem encontradas lesões designadas como ulcerativas (Souza et al, 1999).

Por volta de 1307, na cidade de Munique, foi promulgada uma lei semelhante à do Talmud e, em 1788 em Leipzig, ocorreu a morte de 12 estudantes, cuja causa foi atribuída ao consumo de carne de animal tuberculoso (Souza et al, 1999).

Porém, somente a partir de 1810 a doença começou a ser compreendida, quando pesquisadores observaram que existia ligação entre o consumo de leite de vaca e a infecção tuberculosa em gânglios linfáticos do pescoço de crianças, que se apresentava na forma de abscessos de desenvolvimento lento evoluindo para fístulas, caracterizando um processo denominado escrófula. A ocorrência deste tipo de alteração inexistia quando as crianças eram amamentadas apenas com leite materno (Souza et al, 1999).

De acordo com Ferreira Neto & Bernardi, (1997) e Roxo, (1996) em 24 de março de 1882, Robert Koch divulgou publicamente o cultivo do bacilo responsável pela tuberculose, no homem e em bovinos. Como meio de cultivo Koch utilizou humor vítreo colhido em abatedouros. Antes de ser cultivado, o bacilo era observado em exames diretos de materiais corados pela fucsina-anilina. Este microrganismo recebeu a denominação de *Tuberkelbacillen* - bacilo da tuberculose. Ainda, segundo Ferreira Neto & Bernardi, (1997) Zopf propôs, em 1883, que este agente fosse

denominado "*Bacterium tuberculosis*" o qual foi classificado em 1896 como espécie do gênero *Mycobacterium* por Lehmann & Neumann.

Segundo Ferreira Neto & Bernardi (1997), havia uma crença generalizada, inclusive compartilhada por Koch e outros pesquisadores, de que existia somente um tipo de bacilo responsável pela tuberculose afetando tanto o homem, quanto aos animais.

No final do século XIX, em 1898, o *Mycobacterium bovis* foi isolado por Theobald Smith, confirmando a responsabilidade deste microrganismo como causador da doença em bovinos. Smith observou que o bacilo bovino era menor que o humano, crescia com menor vigor "in vitro" e era menos afetado por modificações dos meios de cultura e também que este agente era mais virulento para animais de laboratório, especialmente para coelhos, que o responsável pela tuberculose humana. Pouco tempo depois, as observações de Smith foram confirmadas por vários pesquisadores, inclusive por Koch (Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

No início século XX, entre 1901 e 1911, devido às inúmeras dúvidas acerca da doença, tanto em humanos, quanto em animais, principalmente relativas ao possível aspecto zoonótico da tuberculose bovina, o governo inglês constituiu uma comissão para estudar o assunto. Esta era integrada por três eminentes bacteriologistas, que dispunham de um laboratório e uma fazenda experimental e foi denominada "*Royal Commission on Tuberculosis*", desenvolvendo um extenso programa de pesquisa em técnicas experimentais sobre testes tuberculínicos para o diagnóstico da doença nos bovinos, com o objetivo de sanar definitivamente as dúvidas acerca da natureza da tuberculose bovina e sua relação com a forma humana da doença. Esta comissão concluiu que existiam três tipos distintos de bacilos tuberculosos; o humano, o bovino e o aviário, bem como outras micobactérias saprófitas. Concluiu também que o bacilo tuberculoso presente no leite bovino causava tuberculose extrapulmonar no homem, especialmente em crianças e que o homem era notavelmente suscetível ao bacilo tuberculoso bovino, podendo facilmente adquirir tuberculose pulmonar através da inalação do microrganismo proveniente dos animais portadores (Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

Segundo Souza et al, (1999) a primeira transmissão da tuberculose entre as espécies bovina e humana foi realizada por Ravenel em 1902. Esse pesquisador isolou bacilos tuberculosos a partir de gânglios mesentéricos de uma criança com

meningite tuberculosa e inoculou o agente em três bovinos, os quais desenvolveram a doença e morreram em menos de 30 dias, apresentando, à necropsia, lesões típicas de tuberculose.

Na seqüência, depois de concluídos os estudos conduzidos pela "*Royal Commission on Tuberculosis*", em 1911, chegou-se à conclusão definitiva de que bovinos tuberculosos representavam um risco para a saúde pública, exigindo rigorosas medidas de controle, já que a ocorrência da doença em animais apresentava, na época, índices alarmantes, afetando entre 20 e 40% dos bovinos de muitos países da Europa (Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

De acordo com as citações de Souza et al, (1999), Mantoux instituiu o teste alérgico para diagnóstico de tuberculose em 1908 e, em 1931, verificou que a carne de bovinos doentes poderia transmitir a doença somente quando o animal apresentava tuberculose generalizada. Neste caso, a carcaça afetada seria automaticamente condenada durante a inspeção realizada nos abatedouros. Todavia, industriais gananciosos ainda utilizavam as partes afetadas da carcaça para o preparo de salsichas que, quando consumidas sem tratamento térmico prévio, ofereciam grande risco às pessoas. Ainda segundo informações de Souza et al, (1999) Torres & Pacheco informaram, em 1938, o isolamento do bacilo bovino de lesões tuberculosas humanas, constituindo assim, a primeira publicação sobre o assunto, disponível na literatura médica brasileira. Souza et al, (1999) ressaltam a importância da Saúde Pública no controle desta zoonose, enfatizando o perigo que representa a carne e o leite de animais tuberculosos.

1.2. Etiologia

1.2.1. Caracterização do agente

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales*, gênero *Mycobacterium* (Kantor, 1979). Quanto a patogenicidade, as micobactérias são classificadas em tuberculosas e não tuberculosas. As micobactérias tuberculosas, causadoras da tuberculose em mamíferos, pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, constituído por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti* (Lage et al, 1998 e Roxo, 1996). As espécies *M. canneti* e *M. bovis* sbsp. *caprae* são consideradas

bactérias do “complexo *Mycobacterium tuberculosis*” mas, não são reconhecidas oficialmente (Araújo, 2004).

Existem mais de 50 espécies de micobactérias. As micobactérias não tuberculosas classificadas no grupo MOTT (“mycobacteria other than tubercle”), possui espécies patogênicas obrigatórias ou oportunistas e espécies saprófitas e causam as chamadas micobacterioses. (Lage et al, 1998)

O grupo MAI compreende cerca de 28 sorotipos semelhantes ao *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*, estas micobactérias apesar de serem distintas geneticamente, não são distinguidas nos testes bioquímicos de rotina. Já o denominado grupo MAIS compreende as micobactérias do grupo MAI (*M. avium* e *M. intracellulare*), juntamente com o *Mycobacterium scrofulaceum*. (Lage et al, 1998 e Brasil, 2003)

As micobactérias do grupo MOTT produzem pigmentos carotenóides, dependendo da presença ou não de luz e são classificadas, conforme Runyon, em quatro grupos.

As micobactérias incluídas no grupo I apresentam crescimento lento e produzem colônias amarelas após 7 dias de incubação com luz, sendo representadas por *M. kansasii*, *M. marinum* e *M. asiaticum*. O grupo II compreende as micobactérias de crescimento lento cuja produção de pigmento independe da presença de luz como o *M. scrofulaceum* e *M. gordonae*. O grupo III compreende as micobactérias do complexo MAI (*M. avium* e *M. intracellulare*) e também *M. terrae*. Estas micobactérias possuem crescimento lento e não produzem pigmentos. O grupo IV apresenta crescimento rápido e pigmentação variável e como representantes *M. fortuitum* e *M. chelonae*.

Ferreira Neto & Bernardi, (1997) citam que até 1970 o bacilo tuberculoso bovino foi considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. Entretanto, a partir desta data foi proposta sua classificação como uma espécie individual denominada *Mycobacterium bovis*.

O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose humana, enquanto que os bovinos desenvolvem a doença quando infectados por *Mycobacterium bovis*. No entanto, o homem também desenvolve a tuberculose quando infectado pelo

M. bovis, produzindo sinais clínicos idênticos aos provocados por *M. tuberculosis* mas, os bovinos não adoecem quando infectados pelo *M. tuberculosis*, bem como por outras micobactérias patogênicas para mamíferos. A infecção de bovinos por estes agentes causa apenas sensibilização alérgica, que desaparece em um período variável de 6 a 8 meses, quando afastados da fonte de contágio (Lage et al, 1998) sendo, por isso considerada autolimitante, não havendo registros da transmissão do agente entre bovinos ou destes para os humanos. A sensibilização alérgica inespecífica de bovinos pode ocorrer também por outras espécies de micobactérias, a exemplo do *M. avium* e *M. intracellulare*, pertencentes ao complexo MAIS. As bactérias deste grupo podem entretanto causar doenças em outras espécies. O *M. intracellulare*, em suínos, é o agente etiológico da linfadenite granulomatosa, também denominada linfadenite caseosa tuberculóide dos suínos (Lage et al, 1998).

Outras espécies animais, ao contrário dos bovinos, são sensíveis ao *M. tuberculosis*, destacando-se os primatas mantidos em cativeiro, o cão, o gato, o papagaio e o suíno, principalmente quando alimentado com restos de alimentos (Roxo, 1996).

As micobactérias são bacilos gram-positivos, que se coram fracamente pelo método de Gram e medem de 0,5 a 7 de comprimento por 0,3 de largura. São aeróbicos, imóveis, não capsulados, não flagelados e não-formadores de esporos e que, rotineiramente, são corados a quente pela tintura de carbol, conhecida como carbolfucsina, resistindo ao descoramento pelos ácidos inorgânicos, o que lhes conferem a denominação de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Esta propriedade depende da quantidade e da disposição espacial dos ácidos micólicos e seus ésteres na parede bacteriana. No entanto, os gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* possuem as mesmas características tintoriais. Às vezes, em culturas ou lesões antigas, os microrganismos apresentam aspecto granulado ou aparência de um colar de contas. Esta forma é causada pela presença intrabacteriana de gotículas lipídicas e é um indicativo de que os organismos foram expostos a um ambiente desfavorável durante a fase de crescimento pós-exponencial (Dungworth et al, 1992; Lage et al 1998).

Devido ao alto teor de lipídeos capsulares, as micobactérias são difíceis de serem coradas pelos métodos convencionais de coloração empregados em bacteriologia. Entretanto, a sua coloração, em esfregaço, pode ser facilitada pela incorporação, aos corantes, de um agente umedecedor de superfície, a exemplo do Tween 80

(Dungworth et al, 1992). Em cortes histológicos, a coloração pelo método anterior era prejudicada ainda mais, porque os solventes de parafina, empregados na rotina de coloração histológica, dissolviam também os lípides capsulares. Isto foi satisfatoriamente contornado quando Faraco, conforme afirma Michalany, (1980) modificou a técnica de coloração desenvolvida por Franz Ziehl & Friederich Neelsen, para esfregaços contendo micobactérias. Tal modificação se baseou no reengorduramento dos bacilos com substâncias oleosas de origem mineral, animal e vegetal (Michalany,1980). As micobactérias podem ser demonstradas também por meio de microscopia de fluorescência, quando impregnadas por um corante fluorescente, como no caso da auramina (Dungworth et al, 1992).

Quanto à resistência, o bacilo da tuberculose bovina é relativamente resistente ao calor, à dessecação e a diversos desinfetantes. Permanece viável por até 2 anos em estábulos, pastagem e dejetos. Sobrevive por até 1 ano na água e por até 10 meses nos produtos de origem animal contaminados. Agentes desinfetantes, tais como os fenóis, o formol o álcool e, em especial, o hipoclorito de sódio, são eficientes na destruição do bacilo mas, a ação desses produtos pode ser afetada pela sua concentração, tempo de exposição, temperatura e presença de matéria orgânica (Roxo, 1996). O hipoclorito de sódio deve estar na concentração de 5% e o formaldeído a 3% para que, quando em contato com superfícies isentas de matéria orgânica, exerçam sua atividade de desinfetante eficaz sobre micobactérias (Lage et al, 1998). Os compostos de amônio quaternários e clohexidine não destroem o bacilo, já o calor úmido a 60°C mata o bacilo rapidamente. A micobactéria é rapidamente destruída pela luz solar direta em ambiente seco, por outro lado, em condições ideais de umidade, temperatura e ao abrigo da luz solar, se mantém viável por longos períodos (Roxo, 1996).

A pasteurização, que é o tratamento térmico do leite, à temperatura de 71,7°C por 15 segundos (HTST-“high temperature, shot time”) ou 62,8 a 65,6°C por 30 min (LTLT-“low temperature, long time) seguido de rápido resfriamento, mata as micobactérias, assim como a maioria dos microrganismos não-esporulados (Senai/DN, 1999, Roxo, 1996).

De acordo com Silva et al, (2002) estes fatores de resistência são semelhantes também para o *Micobacterium tuberculosis*, que, apresenta grande capacidade de

sobrevivência no ambiente, permanecendo por até 180 dias em massa de resíduos sólidos. Por este motivo estes autores consideraram *M. tuberculosis* como o principal indicador na contaminação do ambiente físico do ar, já que uma dose infectante, mesmo reduzida, como por exemplo, uma partícula menor que 5 µm de diâmetro, suspensa no ar e contendo apenas um a três bacilos, pode causar a infecção no indivíduo que entra em contato com a mesma.

1.2.2. Composição química do agente

No intuito de esclarecer a patogênese das lesões tuberculosas, aperfeiçoar as técnicas de diagnóstico e desenvolver vacinas, muitos estudos tem sido desenvolvidos sobre a composição química da micobactéria, principalmente sobre a sua parede celular. A parede micobacteriana é formada por lipídeos complexos, que incluem glicolipídeos, peptidoglicolipídeos, lipopolissacarídeos e ceras. Os ácidos micólicos do qual a álcool-ácido resistência depende, são comuns entre eles, sendo responsáveis pela síntese de 60% dos lipídeos da parede celular bacteriana (Dungworth et al, 1992).

Existem diferentes grupos funcionais de ácidos micólicos, designados de grupo I a grupo VI, o que possibilita a identificação da espécie, uma vez que a composição desses grupos moleculares é específica para cada micobactéria. O Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, no qual inclui o *M. bovis*, possui os grupos I, III e IV de ácidos micólicos em sua parede celular (Jorge, 2001).

Quanto maior a quantidade de glicolipídeos da parede celular, maior a virulência das micobactérias. Estas substâncias são importantes na síntese do fator corda (dimicolato de trealose), isto é, do fator que determina o crescimento filamentososo, em forma de corda, das micobacterias em meio glicerinado. Por isso a maioria dos agentes álcool-ácidos resistentes são mais virulentos quando na forma filamentososa. Outros glicolipídeos, como no caso do micosídeo protegem a bactéria contra a digestão lisossomal permitindo a sua sobrevivência depois de serem fagocitadas pelos macrófagos. Esta sobrevivência intracelular do agente possivelmente é também facilitada pela secreção do monofosfato de adenosina cíclica (AMP) que atua inibindo a fusão dos fagossomos com os lisossomos produzindo uma evasão da bactéria à resposta inicial do hospedeiro (Dungworth et al, 1992).

As ceras são compostas de lipídeos, glicolipídeos e peptidoglicolipídeos, cujas proporções variam de acordo com as diferentes espécies de micobactérias. A presença destas ceras é importante na resposta inicial do tipo corpo estranho, elaborada pelos macrófagos do hospedeiro. Além destas, o peptidoglicano, muramildipeptídeo e vários outros glicolipídeos, são responsáveis pela capacidade imunogênica da micobactéria, promovendo a atração de macrófagos e apresentação do antígeno. Também as tuberculoproteínas influenciam na capacidade imunogênica das micobactérias, constituindo-se na maioria dos determinantes antigênicos. Contudo, para que um animal produza uma resposta imunológica às tuberculoproteínas é necessário a atividade adjuvante dos lipídeos e polissacarídeos da parede micobacteriana (Dungworth et al, 1992).

1.3. Imunopatogenia

Quando os bacilos tuberculosos são implantados no tecido, inicialmente agem como partículas estranhas devido ao alto conteúdo de lipídeos capsulares e proteínas imunogênicas.

São então fagocitados por macrófagos ativados que induzem uma resposta imune do tipo “corpo estranho” na tentativa de destruir o bacilo. Quando a ação dos macrófagos é eficiente, os bacilos são destruídos. Se, entretanto, eles forem incapazes de impedir a proliferação dos bacilos, tais macrófagos, previamente infectados, liberam os bacilos do interior das células macrofágicas mortas e sensibilizam os linfócitos T, que passam a secretar citocinas as quais atuam ativando um maior número de macrófagos e também atraindo linfócitos para o local infectado. Isto ocorre por volta do décimo dia após a exposição, iniciando assim o desenvolvimento da hipersensibilidade que é um tipo de imunidade mediada por células. Desta forma, a hipersensibilidade do tipo retardada, base do teste da tuberculina, pode ser considerada expressão da resposta imune mediada por linfócitos, predominantemente por células do tipo T (Dungworth et al, 1992).

A importância da hipersensibilidade na patogênese das lesões de tuberculose foi inicialmente relatada por Koch, que a demonstrou através da inoculação subcutânea de cultura de bacilos tuberculosos em porquinho-da-Índia normal. Ocorre generalização da doença e morte do animal depois de um período de 2 a 3 meses. Este pesquisador observou que entre 10 a 14 dias depois da inoculação houve desenvolvimento local de uma nodulação firme que evoluiu para ulceração

persistente até a morte do animal. Quando, entretanto, a inoculação é feita em animal tuberculoso a resposta é caracterizada por uma reação aguda com exudação e necrose no local da inoculação. O tecido necrosado se desprende e a lesão cicatriza-se rapidamente. Não há disseminação do agente para os linfonodos regionais ou qualquer parte do organismo (Dungworth et al, 1992).

Hope et al, (2004) citam que os macrófagos e as células dendríticas são importantes na indução de resposta imune à infecção por micobactérias. Estas células desempenham diferentes funções no desenvolvimento da imunidade, como por exemplo, a destruição de microrganismos ou estimulação antigênica de células T.

Alito et al, (2003) estudaram a resposta de células T bovina após infecção com *Mycobacterium bovis* com o objetivo de identificar as proteínas antigênicas presentes, e isolaram proteínas de baixo peso molecular como ESAT6 (antígeno micobacteriano ESAT6), CFP10 (antígeno micobacteriano CFP 10), 85B (antígeno micobacteriano 85B), MPB70 (antígeno micobacteriano MPB70) e dois novos antígenos TPX (thiol peroxidase protein) e TRB-B estes associados a um alto índice de estimulação do sobrenadante da cultura, determinando a importância de proteínas de baixo peso molecular na função de estimulação antigênica dos linfócitos T na resposta imune ao *M. bovis*.

De acordo com Hope et al, (2004) os macrófagos pulmonares residentes são considerados os principais hospedeiros celulares para micobactérias, pois devido a produção de metabólitos tóxicos, tanto do oxigênio, como do nitrogênio, e através de enzimas lisossomais promovem uma rápida destruição de microrganismos invasores. Após a destruição da micobactéria seus antígenos são apresentados às células T através de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), que induz a produção de interferon gama (INF γ) e a capacidade citolítica de células CD8 (células com receptores CD8, envolvidos na restrição de MHC e ativação de células Th2, responsáveis pela resposta celular) que aumenta o sistema de defesa antimicrobiano.

Na interação da micobactéria com o macrófago, o tipo de receptor ativado pela bactéria também pode influenciar na resposta celular induzida por este. Dentre os envolvidos estão os receptores do complemento, os receptores de manose, que identifica moléculas de manosilato na superfície da micobactéria; e os receptores Fc de células opsonizadas. A utilização do receptor do complemento CR3 pelas

micobactérias oferece vantagens às mesmas, pois ele não ativa o potencial de intermediários reativos do oxigênio. A ativação do receptor de manose também é uma rota segura para a micobactéria, pois facilita sua sobrevivência intracelular, já que faz com que o lisossomo não se funda com o fagossomo, e a micobactéria deixe de ser apresentada à células T. Isto ocorre através de um retardamento da maturação do fago-lisossomo, por um aumento de proteínas no fagossomo, incluindo a proteína triptofano-aspartato, que normalmente é removida deste no início da fusão com o lisossomo (Hope et al, 2004).

Ainda segundo Hope et al, (2004) células dendríticas estão presentes em muitos tecidos principalmente pele, traquéia e intestino e tem a função de apresentação de antígenos. Como os macrófagos, depois da interação com células apresentadoras de antígenos das micobactérias, ocorre síntese de citocina, e produção de IL-12 (interleucina 12), INF- γ (interferon gama), IL-1 (interleucina 1) e IL-6 (interleucina 6). A habilidade do INF- γ (interferon gama) em ativar mecanismos bactericidas dos macrófagos alveolares já foi bem reportado mas, não afeta a capacidade de macrófagos derivados de monócitos do sangue para matar BCG ou *M. bovis*. A secreção de IL-12 pelas células dendríticas estimula a resposta mediada por células T estimulando células CD4+ (células com receptores CD4, envolvidos na restrição de MHC e ativação de células Th1, responsáveis pela resposta humoral) e CD8+ (células com receptores CD8, envolvidos na restrição de MHC e ativação de células Th2, responsáveis pela resposta celular), que polariza a respostas em células Th1 ou Th2, e pode potencializar a secreção de INF- γ (interferon gama) e TNF- α (fator de necrose tumoral α) pelos linfócitos T e células natural killer. As células T secretam INF- γ e proliferam-se mais rapidamente quando estimuladas pelas células dendríticas do que quando são estimuladas por macrófagos, pois o número de bacilos nestas células é maior do que nos macrófagos. As células T também secretam IL-10 que inibe a resposta celular e diminui a produção de IL-12, perpetuando a resposta Th1. In vitro existe a evidência de que as células dendríticas podem fagocitar a micobactéria (Hope et al, 2004).

Os anticorpos humorais podem ser demonstrados por técnicas sorológicas mas, não participam da patogênese das lesões características de tuberculose ou na produção da imunidade. Tanto a produção de anticorpos quanto a reação de hipersensibilidade geralmente ocorrem simultaneamente mas, não apresentam relação quantitativa entre si, mesmo nos casos em que ambos os tipos de imunidade

estão presentes. Isto, provavelmente se deve ao envolvimento das diferentes subpopulações de células T e dos tipos de citocinas por elas produzidas (Dungworth et al, 1992).

1.4. Transmissão

1.4.1. Transmissão a bovinos

Quando o bovino é infectado, ele já é capaz de transmitir a doença a outros animais e aos humanos, mesmo antes de desenvolverem lesões tuberculosas, por isso os animais afetados são a principal fonte de infecção. A principal via de eliminação do agente é através da respiração mas, pode se dar também pelas secreções nasal e uterina, leite, fezes, urina e pelo sêmen. A principal via de contaminação de animais adultos é através da via respiratória ou aerógena, enquanto que em jovens, é importante a ingestão de leite cru contaminado. A transmissão transplacentária é rara e a intrauterina, através de sêmen é pouco comum. Também são vias de menor importância a ingestão de pastagem e alimentos contaminados (Roxo, 1996).

M. bovis foi isolado de larvas de insetos (*Musca domestica*, *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*) que tiveram contato com tecidos de bovinos com lesões em abatedouros. Foi detectada a presença *M. tuberculosis* em baratas (*Blatta orientalis*), até oito semanas depois de haverem ingerido escarro humano contaminado. Também foram encontradas minhocas contaminadas com micobactérias mas, as minhocas são consideradas de pouca importância epidemiológica para a tuberculose (Fischer et al, 2003).

De acordo com Roxo, (1996) e Lage et al, (1998), várias espécies animais podem ser hospedeiras do *M. bovis*, tais como bovinos, bubalinos e outros bovídeos selvagens, como no caso dos bisões, bem como os seres humanos e diversos animais domésticos e silvestres, muito dos quais desenvolvem a forma auto-limitante da doença. Contudo, nos países onde a tuberculose bovina foi erradicada ou está em adiantado processo de erradicação, os animais silvestres apresentam grande importância epidemiológica, uma vez que podem servir de reservatório do *M. bovis*. Como exemplos desses animais, pode-se citar o texugo (*Melis melis*) na Europa, os cervídeos nos Estados Unidos da América e um marsupial (*Trichosuros vulpecula*) na Austrália e Nova Zelândia. Em outros países os reservatórios silvestres também são relatados, como é o caso da Grã-Bretanha, Irlanda e Zâmbia.

1.4.2. Transmissão a humanos

Segundo Souza et al, (1999) a ingestão de leite cru, contaminado com micobactéria constitui uma das principais formas de infecção humana pelo bacilo da tuberculose bovina, em crianças. Por outro lado, o risco de se adquirir o agente pela ingestão de produtos cárneos contaminados é considerado menor devido à baixa incidência do mesmo em tecidos musculares e ao hábito de não se consumir carne crua no Brasil. Porém, este risco não deve ser ignorado, devido ao grande número de abate clandestino de animais, ou ao descarte de animais provenientes de rebanhos positivos em matadouros onde a inspeção sanitária não é rigorosa. Relatam também que trabalhos realizados na Nigéria incriminam a ingestão de carne contaminada como responsável por cerca de 45% dos casos de tuberculose em humanos causada pelo *Mycobacterium bovis* naquele País.

Resultados obtidos de estudos experimentais demonstram que um número mínimo, inclusive um único bacilo é capaz de produzir lesões pulmonares por inalação de aerossóis, quando atingem as vias aéreas inferiores, principalmente os alvéolos respiratórios. Isto explica a maior ocorrência da forma pulmonar da tuberculose zoonótica, em trabalhadores da área rural, em médicos-veterinários, em funcionários de abatedouros frigoríficos e pessoas que mantêm um contato direto com o animal, sendo a doença causada pelo *M. bovis*, na forma pulmonar considerada como doença ocupacional (Souza et al, 1999).

Quando a contaminação se dá pelo contato direto com carcaças contaminadas por *M. bovis* pode haver acometimento cutâneo pela tuberculose zoonótica. As categorias profissionais mais afetadas dessa forma são representadas, principalmente, pelos magarefes, auxiliares de inspeção e médicos-veterinários. Tanto a resistência genética do hospedeiro a uma infecção por *M. bovis*, quanto fatores fisiológicos e imunológicos, em animais ou em pessoas, interferem no curso da tuberculose todavia, não há uma comprovação experimental conclusiva de que tais fatores possam interferir na contaminação (Souza et al, 1999).

1.5. Patologia

1.5.1. Bovinos

Muitos animais com uma infecção recente por *Mycobacterium bovis* podem não apresentar sintomas característicos da doença sendo observadas lesões somente por ocasião do abate. Alguns animais tuberculina positivos podem não apresentar

alterações visíveis na inspeção *post mortem* devido a estas serem inicialmente pequenas, de difícil visualização na inspeção de rotina (Corner, 1994).

Roxo, (1996) define a tuberculose como uma doença debilitante, geralmente crônica mas, que pode assumir, em alguns casos, caráter agudo e progressivo. As lesões são encontradas mais freqüentemente nos linfonodos da cabeça, pescoço, nos mediastínicos e nos mesentéricos, como também, nos pulmões, intestinos, baço, pleura e peritônio e em qualquer tecido. Os sinais clínicos característicos da doença são emaciação progressiva, aumento de volume dos linfonodos e, em alguns casos, tosse, dispnéia e diarreia intercalada com constipação.

Jorge, (2001) relata que 90% das lesões pulmonares estão localizadas no terço distal do lobo caudal do pulmão. As lesões manifestam-se na forma de nódulos caseosos, de tamanhos variados que muitas vezes tornam-se confluentes, afetando todo o parênquima pulmonar apresentando-se como lesões cavitárias, com expectoração de bacilos (Roxo, 1996).

Em bovinos a calcificação é freqüente, principalmente nos linfonodos, bem como nos casos de disseminação generalizada de tubérculos sobre as superfícies pleural e peritoneal. Esses tubérculos geralmente apresentam-se com 0,5 a 1,0 cm de diâmetro. Nos casos de comprometimento das meninges não há a formação de tubérculos desenvolvendo somente um processo de meningite rapidamente fatal. Quando afeta a pele, com exceção da localização, que geralmente acomete somente os membros e da freqüente associação com linfangite, as lesões são histopatologicamente indistinguíveis das diversas dermatites (Jones et al, 2000).

Macroscopicamente, as lesões típicas são caracterizadas pela presença de nódulos tuberculosos cinza-esbranquiçado ou cinza-amarelados, de dimensões variadas. Estes nódulos podem variar de uma estrutura discretamente diferenciada do tecido adjacente, a uma grande massa, freqüentemente de contorno irregular, evidenciando superfície com presença de, desde uma simples granulação, a caroços salientes. Os nódulos presentes próximos à superfície dos órgãos afetados podem ser facilmente enucleados. Estas lesões são firmes e não oferecem resistência ao corte, uma vez que não são calcificadas. O número de nódulos é variável com a freqüência de episódios de reinfecção em um mesmo órgão (Thoen et al, 1981).

O complexo primário da tuberculose geralmente é um nódulo pulmonar calcificado, associado a lesão no linfonodo regional, de aspecto caseoso, cor vítrea ou amarelada (Morris et al, 1994; Lage, 1996). À combinação das lesões do foco

inicial com as alterações granulomatosas dos gânglios linfáticos regionais denomina-se Complexo Tuberculoso Primário de Ranke (Jones et al, 2000).

Microscopicamente, em casos de infecção experimental, o tubérculo já pode ser observado entre o 10º e 14º dia pós-infecção, apresentando-se como uma coleção densa de células com núcleos vesiculosos e citoplasma palidamente corado. Estas células são derivadas dos macrófagos teciduais, também chamados de histiócitos e, devido a uma vaga semelhança histológica com as camadas de grandes células epiteliais, são denominadas células epitelióides (Thoen et al, 1981; Dungworth et al, 1992).

As células epitelióides apresentam limite citoplasmático pouco definido, com núcleo grande e vesiculoso. Ultra estruturalmente são caracterizadas por apresentarem organelas abundantes e extensas interdigitações das membranas plasmática sendo que essas mudanças estruturais indicam a elevada atividade bactericida destas células, que fagocitam o bacilo tuberculoso em pouco tempo depois da infecção, os quais podem ser vistos dentro de seu citoplasma. (Dungworth et al, 1992).

A massa celular primária expande devido à proliferação histiocitária e, 3 a 4 semanas depois inicia-se o processo de degeneração das células epitelióides presentes no centro do tubérculo, processo este, causado, em parte devido à falta de vascularização do tubérculo e parte devido à ação de substâncias tóxicas secretada pelo bacilo. À medida que a massa celular ou tubérculo primário aumenta de tamanho, as células epitelióides tendem a se fundirem formando sincícios. As células do centro da lesão entram em processo de necrose, se fundem e formam uma massa que se cora intensamente pela eosina. Na periferia do tubérculo apresenta grande quantidade de histiócitos e células epitelióides que se arranjam predominantemente em paliçada, muitas as quais formam sincícios que dão origem às células gigantes do tipo Langhans. que são células grandes e possuem vários núcleos localizados excêntrica(Thoen et al, 1981).

O granuloma tuberculoso, também chamado de tubérculo, é principalmente celular e o seu desenvolvimento é freqüentemente designado produtivo ou proliferativo sendo o protótipo da inflamação granulomatosa, em contraste com o tipo mais exsudativo de lesão que é causado ocasionalmente (Dungworth et al, 1992).

Com o desenvolvimento da lesão desenvolve-se considerável fibroplasia periférica evidência de neoformação vascular e, com o avançar do processo, há a formação de uma cápsula fibrosa formada de fibroblastos, histiócitos, células plasmáticas, uma estreita zona de linfócitos, ocasionais polimorfonucleares eosinófilos e monócitos inalterados. Toda a zona central, ou parte do tubérculo apresenta necrose de caseificação. A fibroplasia ou encapsulação é mais visível em indivíduos que apresentam maior resistência e pode conseguir dominar as lesões. A necrose central ocorre devido à hipersensibilidade mediada por células que promove a liberação de fatores citotóxicos e enzimas hidrolíticas dos macrófagos e possui caráter caseoso, de material geralmente espesso mas, que pode se liquefazer ou calcificar. A calcificação do centro do tubérculo. é freqüente em algumas espécies animais, como nos bovinos mas, raramente observada em outras, como nas aves (Dungworth et al, 1992; Thoen et al, 1981).

A coloração especial pelo Ziehl-Nilsen revela a presença de bacilos álcool-ácido-resistentes que podem ser vistos isoladamente ou em grumos, em qualquer parte do tubérculo, apesar de ocorrer em maior quantidade no centro da lesão, em meio ao tecido necrótico (Thoen et al, 1981).

Diferentes populações funcionais de linfócitos e macrófagos estão presentes nas lesões tuberculosas e, a quantidade dessas várias subpopulações celulares, é que determina a capacidade de ativação dos macrófagos e a inibição do crescimento bacteriano. Ambas imunidades, inata ou adquirida, estão envolvidas na capacidade dos macrófagos em inibir o crescimento intracelular do bacilo e determinam a imunidade à tuberculose. Quando o equilíbrio entre a virulência da micobactéria e a habilidade dos macrófagos para destruí-los for precário, ocorre exacerbação da doença, o que é freqüentemente observado na associação clínica da tuberculose com a imunossupressão causada por doenças, drogas, hormônios ou desnutrição (Dungworth et al, 1992).

1.5.2. Humanos

Em humanos, a contaminação pela micobactéria pode ocorrer na infância e o agente permanecer latente até que, em algum momento da fase adulta, ocorrem manifestações dos sintomas. Isto explica porque, na Alemanha, ocorreram, em 1961, casos tuberculose humana por *M. bovis* exatamente no ano em que o rebanho bovino daquele país foi considerado livre da doença (Souza et al, 1999).

Souza et al, (1999) relatam que quando a contaminação por *M. bovis* se dá por ingestão, principalmente em crianças, pode ocorrer uma infecção inicial das amígdalas, causando uma amigdalite, de onde se difunde para as cadeias de linfonodos cervicais (pré-auriculares, tonsilares e supraclaviculares), nos quais pode causar lesões supurativas com posterior envolvimento da pele sobrejacente. Tais lesões são comumente conhecidas como "scrofulodermia" ou "escrófula" ou "lupus vulgaris". Em crianças, também é comum ocorrer acometimento intestinal.

Nos casos extrapulmonares, a localização óssea e articular também é comum, provocando lesões ósseas localizadas e inflamações articulares. As formas gênero-urinárias são menos frequentes. As lesões na pele em humanos apresentam-se, na maioria das vezes, como pequenas pápulas, semelhantes a verrugas, e que regredem com facilidade, conhecidas popularmente como verruga do magarefe ("butcher's wart"). A benignidade da tuberculose cutânea se deve essencialmente à resistência que indivíduos adultos apresentam ao bacilo, e não à menor virulência do mesmo (Souza et al, 1999).

Não há dados que comprovem que o *M. bovis* seja menos virulento que o *M. tuberculosis* para humanos. A doença humana causada pelo *M. bovis* pode ser tão severa e extensa quanto a causada por *M. tuberculosis*. Por outro lado a infecção leve pelo *M. bovis* pode induzir à imunização de indivíduos contra *M. tuberculosis*, conforme constatações do início do século XIX, de que, crianças que desenvolveram linfadenite por *M. bovis* foram protegidas contra a infecção por *M. tuberculosis*. Tal constatação pode ser corroborada pelos dados da incidência da doença em Burkina Faso, onde o número de casos de tuberculose pulmonar humana é cinco vezes maior nos locais isentos de tuberculose bovina do que em regiões do país em que é comum a infecção pelo *M. bovis* através do leite. Também na Escandinávia, ocorreu um aumento temporário de morbidade e mortalidade causada por tuberculose quando a doença foi controlada no gado bovino (Grange, 2001). Contudo, estas informações não constituem um entrave a programas de controle da tuberculose bovina a serem executados no Brasil, visto que devem ser analisadas levando em consideração o fato de que a vacinação de crianças com BCG apresenta adequada cobertura no Brasil, garantindo a imunidade contra *M. bovis* e *M. tuberculosis* em caso de erradicação da tuberculose bovina.

1.6. Diagnóstico

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser efetuado por diagnóstico clínico, tuberculização intradérmica, exames *post mortem* anatomopatológicos (histopatológicos), inspeção sanitária, exames bacteriológicos, métodos sorológicos, avaliação da imunidade celular "in vitro", métodos moleculares, sondas de DNA e PCR e spoligotyping (Radostits et al, 1994, Roxo, 1996 e Lage et al, 1998,).

A tuberculina é um teste indireto efetuado *in vivo* através da utilização de PPD (derivado protéico purificado) de *M. bovis* e *M. avium*, utilizada no teste alérgico intradérmico. Após 72 horas, mais ou menos 6 horas da inoculação, será observada a reação à tuberculina. Esta reação consiste de uma área cutânea elevada, avermelhada e endurecida. A resposta dos bovinos ao *M. bovis* aparece geralmente 30 a 50 dias após a infecção e animais em estado avançado de infecção podem apresentar anergia, assim como falsos negativos ocorrem em infecções recentes. Após a tuberculinização, ocorre dessensibilização e os animais apresentam sua capacidade de resposta a nova tuberculinização diminuída, sendo a mesma recobrada após um período de 42 a 60 dias (Roxo, 1996, Souza et al. 1999 e Brasil, 2004).

Devido à imunossupressão fêmeas submetidas a teste de diagnóstico para tuberculose no intervalo de 15 dias antes do parto até 15 dias após o parto devem ser retestadas entre 60 a 90 dias após o parto. O Teste Cervical Simples (TCS) com inoculação intradérmica de tuberculina PPD bovina, é o teste de rotina recomendado mas, o teste da prega caudal (TPC) pode ser utilizado como teste de rotina, exclusivamente em estabelecimentos de criação especializados na pecuária de corte. O Teste Cervical Comparativo (TCC) é o teste confirmatório utilizado em animais inconclusivos ao Teste Cervical Simples e reagentes ao Teste da Prega Caudal, visto que possibilita a diferenciação entre a micobactéria patogênica (*M. bovis*) e a aviária (*M. avium*) mas, nem todas as reações inespecíficas são eliminadas (Waters et al, 2003 e Brasil, 2004).

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 (Almeida, 2004).

Delgado, (2000) no Peru, testaram a prova de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando Derivado Protéico Purificado (PPD) como antígeno no diagnóstico da tuberculose bovina e concluíram que a prova apresenta uma baixa sensibilidade e especificidade, e que para a utilização do teste de ELISA antígenos altamente purificados são necessários e com os resultados encontrados a prova não é recomendada.

Ritelli et al, (2003) relatam que um grande problema relacionado ao diagnóstico de *M. bovis* é o seu cultivo demorado, impedindo que o resultado do exame seja aguardado para a tomada de decisão quanto ao destino de uma carcaça de bovino suspeito. Relata também, que o PCR é um procedimento secundário e não alternativo ao cultivo. Estes autores realizaram cultivo celular utilizando macrófagos da linhagem THP-1 e obtiveram uma rápida detecção de *M. bovis* em amostras suspeitas, concluindo ser possível chegar a um resultado confiável em aproximadamente 48 horas.

Corner, (1994) relata que o diagnóstico presuntivo usando a histopatologia pode ser efetuada em regiões de alta prevalência, porém o diagnóstico definitivo depende do isolamento, principalmente quando a prevalência da doença é baixa. A detecção macroscópica pela necrópsia deve ser empregada quando a tuberculose bovina é endêmica e a prevalência da doença é alta. O não encontro de lesões em animais tuberculina positivos pode ser devido a doença estar em seu estágio inicial, ou tratar-se de outra micobactéria diferente de *M. bovis*. Conforme a localização mais freqüente de tecidos afetados pode concluir que a inspeção detalhada dos linfonodos retrofaringeal médio (direito e esquerdo), mediastinal (anterior e posterior) e bronquiais (direito e esquerdo) e pulmões é capaz de detectar 86% das lesões; e, quando é efetuado o exame adicional dos linfonodos parotídeo, cervical caudal, inguinal superficial e dos linfonodos mesentéricos 95% das lesões são detectadas. O autor afirma que o grau de sensibilidade do procedimento de necrópsia para detecção de lesões depende do tempo e cuidado de quem está efetuando o exame. Na Austrália o monitoramento de abate detecta 95 % das lesões na carcaça, e já quando é efetuada a análise rotineira no abate a detecção das lesões é de apenas 47%. O isolamento de *M. bovis* pode demorar mais de 12 semanas e a identificação da cepa através de métodos bioquímicos também é demorada. Técnicas recentes as quais utilizam anticorpos monoclonais e sondas de DNA podem diminuir o tempo necessário para a identificação da amostra.

Zanini et al, (2001) relatam discrepância entre a presença de lesões pulmonares em animais tuberculina positivos, onde apenas em 70% dos reagentes, foram evidenciadas lesões e em somente 19% dos casos confirmados foi isolado *M. bovis* de amostras de muco nasal ou traqueal. Conclui ser necessário o emprego de métodos de diagnóstico laboratorial com maior sensibilidade. Em seu estudo concluiu que a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), apresenta maior eficiência que o cultivo do microrganismo, podendo-se obter o resultado em 24 horas, sendo com isso possível a sua utilização como ferramenta de auxílio à inspeção sanitária e condenação de carcaças, ou para sacrifício de animais com suspeita de serem portadores de tuberculose

Segundo Lage et al, (1998) o diagnóstico macroscópico da tuberculose pode ser confundido com outros processos inflamatórios granulomatosos, tais como lesões por *Corynebacterium pyogenes*, actinomicose, coccidiomicoses, actinobacilose, lesões carcinomatosas e lesões causadas por larvas de parasitas. Já no diagnóstico histopatológico a diferenciação entre os gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia* pode ser dificultada, pois estes gêneros apresentam muitas características em comum, como por exemplo, a propriedade tintorial.

As lesões presentes nos linfonodos são ricas em microorganismos, de onde os bacilos podem ser recuperados com relativa facilidade Dungworth et al, (1992). Sendo assim pode-se proceder ao cultivo e isolamento do agente a partir de lesões encontradas nos animais mortos por doença ou durante a inspeção sanitária em abatedouros-frigoríficos. Entretanto, este procedimento não é viável para fins de diagnóstico de rotina por ser oneroso e demandar tempo muito longo para a sua efetivação. Por isso é recomendado somente para trabalhos de pesquisa ou para confirmação da presença do agente em um rebanho, quando os demais procedimentos de diagnóstico apresentarem resultados duvidosos.

Robledo & Mejía, (2004) constataram que o diagnóstico da tuberculose através da coloração de cortes histológicos com auramina-rodamina para permite a observação das lâminas diretamente sob os aumentos 200X e 400X, possibilitando a análise de um maior número de amostras em um tempo consideravelmente menor. Isto porque, enquanto o exame de lâminas submetidas a diversas outras colorações necessitam, em média, de 15 minutos por corte para sua análise, nas lâminas coradas com a auramina-rodamina, este tempo pode ser reduzido para uma média de 3

minutos. Estes autores também testaram o cultivo de *M. tuberculosis* em camada delgada obtendo um rápido crescimento e identificação do agente, com 80% das amostras revelando positividade em 2 semanas enquanto que, no meio de cultivo de Lowestein-Jensen, somente 10% das amostras testadas foram positivas

Mondragón-Barreto et al, (2000) compararam três métodos distintos de identificação de micobactérias, representados pelas provas bioquímicas, cromatografia líquida de alta resolução e PCR. Analisaram também o custo-benefício e propuseram que, inicialmente seja efetuada prova bioquímica e, quando esta indicar que o agente em investigação se trata de micobactéria não tuberculosa recomendam então a execução de cromatografia líquida de alta resolução e somente se ainda não for possível a identificação do agente, o material deverá ser submetido à prova de PCR. Em caso do agente isolado não pertencer a nenhum padrão de microrganismo conhecido, ainda pode-se empregar a sequenciação de DNA. A cromatografia líquida baseia-se na separação dos ácidos micólicos extraídos da parede celular bacteriana, cujo padrão é diferente para cada micobactéria. Já a reação da polimerase em cadeia (PCR) é baseada em métodos empregados para a amplificação de um fragmento de um gene conhecido da micobactéria, seguido pela restrição de fragmentos e análise de polimorfismo através da utilização de enzimas. Segundo Jorge, (2001) a PCR baseia na síntese enzimática do ácido desoxirribonucléico (DNA) celular bacteriano orientado por oligonucleotídeos iniciadores da amplificação (*primers*).

O diagnóstico assume grande importância no PNCETB, visto que os estabelecimentos de criação que desejam obter o certificado de estabelecimento de criação livre ou de monitorado, devem efetuar diagnósticos de rotina e confirmatórios. Também em caso de encontro de lesões sugestivas por ocasião do abate de animais destas propriedades estas devem ser encaminhadas para laboratório oficial ou credenciado para a realização do diagnóstico (Brasil, 2004).

Brasil, (1997) em seu artigo 196º dispõe sobre os procedimentos que o inspetor sanitário deve efetuar quando do encontro de lesões sugestivas de tuberculose. Conforme o tipo e a distribuição das lesões é efetuado o julgamento, e o inspetor deve basicamente decidir por um dos três destinos da carcaça – condenação total, rejeição parcial ou esterilização pelo calor.

1.7. Desenvolvimento de vacinas

Nos últimos anos vários trabalhos têm sido desenvolvidos em todo o mundo objetivando o desenvolvimento de vacinas efetivas contra tuberculose, não só para bovinos mas, também para outras espécies de importância como reservatórios do agente, a exemplo dos animais silvestres. Muitos desses trabalhos são realizados utilizando-se espécies animais diferentes daquelas para as quais se busca a referida vacina, como acontece com os testes de produtos para uso humano, que sempre são realizados em porquinhos-da-Índia. Tais procedimentos devem ser conduzidos somente com objetivos de pesquisas, e seus resultados não podem ser extrapolados para outras espécies pois existem, dependendo da espécie que está sendo utilizada, diferenças, tanto genéticas, como nos tipos de receptores, que podem influenciar gerando resultados completamente discrepantes.

Waters et al, (2003) estudaram a ativação de células bovinas CD4⁺ e células TCR⁺ quando estimuladas pela vacinação com bacilo Calmette-Guerin (BCG) e o efeito modulador de 1,25 dihidroxivitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃]. Após 4 a 8 dias de cultivo as células CD4⁺ em proliferação expressaram os receptores CD25 e CD44, envolvidos na ativação de células T. Concomitantemente houve diminuição da expressão de receptores CD62L quando comparadas com as que não apresentavam proliferação. A presença de 10nM 1,25(OH)₂D₃ no meio de cultivo inibiu a proliferação de células CD4⁺ e TCR⁺ e a expressão de CD44 mas, não alterou a expressão de CD25 ou CD62L nas células em proliferação. Por fim, o autor ressalta a importância negativa da expressão do gene CD44, o qual promove a apoptose dos leucócitos inibindo significativamente a reação inflamatória, amplamente necessária para o desenvolvimento da resposta à vacinação.

Granje, (2001) relata que o BCG, empregado na elaboração de vacina contra tuberculose foi derivado de bacilos da tuberculose bovina, presumivelmente do *M. bovis*. A vacina produzida com esse agente, ocasionalmente causa doença localizada ou generalizada, principalmente quando é aplicada em indivíduos imunocomprometidos.

Wedlock et al, (2003) pesquisaram vacinas contendo os antígenos micobacterianos MPB83 e MPB70 e uma proteína de DNA como estratégia de revacinação para obter o efeito booster. Concluiu que da mesma forma que ocorre na resposta imune celular ocasionada pela vacinação com BCG, as vacinas de DNA

induziram uma produção de interferon gama (INF-) e interleucina-2. (IL₂). Os bovinos primariamente vacinados e revacinados com a proteína MPB70 manifestaram uma forte síntese de anticorpos e uma baixa produção de TNF- (fator de necrose tumoral gama), permitindo concluir que tais produtos não protegeram os animais do desafio com *Mycobacterium bovis*. De outra forma, sabe-se que o BCG produz uma significativa redução em vários parâmetros da doença todavia, não é recomendada a sua aplicação, pois produz reação impossível de ser diferenciada a doença do teste tuberculínico.

1.8. Epidemiologia

1.8.1. A tuberculose no mundo

De acordo com o relatório sobre a situação epidemiológica da tuberculose humana das américas, elaborado pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) em 2004, os casos da doença vêm aumentando mundialmente, dificultando cumprimento das metas de controle estabelecidas para o ano de 2005. A incidência da enfermidade aumentou principalmente na África e nos países da antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS). Informa também que, nas Américas, 58% das pessoas afetadas são do sexo masculino e 50% dos casos notificados situam-se no Brasil e no Peru. No Brasil, taxa de incidência situa-se entre 50-84 indivíduos afetados em cada 100.000 habitantes (Opas, 2004)

Ainda segundo Opas,(2004) os casos de multiresistência a drogas antituberculosas (MDRTB) têm também aumentado. Este índice, no Brasil, situa-se em torno de 0.9%, enquanto que no Canadá e EUA está próximo de 1.2%. Da mesma forma, três estados do México apresentam um índice de resistência de 2.4%. Já na Guatemala este índice é de 3.7% e no Equador situa-se em torno de 5.0%. Nos anos de 94 a 99 foi encontrada multiresistência em 63 de 72 países pesquisados.

A associação de tuberculose com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) devido à infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) tem aumentado de forma significativa. A OPAS estima a ocorrência de, em torno de 235 mil novos infectados por HIV por ano e recomenda, junto com as ações para reduzir a transmissão de HIV, meios para diminuir a transmissão de tuberculose ou a reativação de tuberculose em indivíduos HIV+ efetuando tratamento preventivo para tuberculose (Opas, 2004).

Segundo Roxo, (1996) na América Latina e Caribe 73,7% dos bovinos estão em áreas onde a prevalência de tuberculose é maior que 1%, e que os animais infectados pelo bacilo tuberculoso no Brasil e Argentina juntos correspondem a quase 2 % da população bovina existente.

Lage et al, (1998) relata que nos Estados Unidos da Américas (EUA) 25 % dos casos fatais de tuberculose em humanos era devido ao *M. bovis* o que levou este país a iniciar, em 1917, um programa de controle da tuberculose bovina.

No Continente Africano, Ameni et al, (2000) realizaram um estudo na Etiópia e encontraram uma prevalência de 46,8% de tuberculose em animais e o *M. bovis* foi isolado do leite de 13% das vacas reagentes. Por outro lado, Coulibaly & Yameogo, (2000) em um levantamento efetuado em Burkina Faso relatam que, dentre as zoonoses de origem bacteriana, a tuberculose ocupou o primeiro lugar de ocorrência e, em 1997, a doença foi responsável por 33,5% das condenações de carcaças de bovinos. Finalmente, em Dangme-West, distrito de Ghana, Bonsu et al, (2000) encontraram uma prevalência de 13,8% de tuberculose nos bovinos, afetando principalmente vacas, as quais eram duas vezes mais afetadas que novilhas e quatro vezes mais que touros. As vacas afetadas, em sua maioria, apresentavam clinicamente uma boa condição corporal sem manifestação de sinais característicos da doença. Também constataram que naquela região o conhecimento sobre tuberculose pelos proprietários rurais e pessoas que trabalhavam com animais era incipiente. De 30 peões, 28 afirmaram não saber o que era a tuberculose e todos ignoravam que a doença poderia ser transmissível ao ser humano. Entre os proprietários o conhecimento sobre a doença e seu aspecto zoonótico era algo maior, porém mesmo assim nenhum deles empregava o procedimento da fervura do leite antes do consumo.

Conhecendo a dimensão do problema e sua importância para a saúde pública, vários países iniciaram programas de controle da doença, beneficiando os consumidores de produtos de origem animal. Esses programas foram alicerçados na introdução de rotinas de inspeção de carnes, pasteurização do leite e medidas de controle da doença nas populações animais (Ferreira Neto & Bernardi, 1997).

Latini et al,(1997) efetuaram um levantamento da prevalência de infecção por *M. bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos da província de Santa Fé na Argentina através de cultivo e isolamento da bactéria, e de exames histopatológicos.

Concluíram que a grande maioria das lesões foi diagnosticada adequadamente na inspeção e que o exame histopatológico foi uma técnica sensível para confirmar as lesões suspeitas (80%) sendo que 59,1% das lesões apresentavam localização pulmonar.

1.8.2. A tuberculose e seu controle no Brasil

Conforme Souza et al, (1999) foi observado um aumento significativo dos casos de tuberculose humana notificados no Brasil, atingindo 85.955 casos em 1992 mas, a espécie de *Mycobacterium* envolvida não foi identificada pela metodologia de investigação empregada.

Portanto no Brasil, não se tem uma idéia da real situação da doença causada por *Mycobacterium bovis* em humanos devido, principalmente, à escassez de diagnósticos de precisão, visto que em sua maioria é feita apenas a baciloscopia do escarro, à deficiência de trabalhos de pesquisa e de estudos epidemiológicos que identifiquem corretamente o agente causador da tuberculose, associada à possibilidade de uma infecção primária silenciosa com posterior reativação em um momento oportuno, como ocorre, por exemplo, em pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (Souza et al, 1999 e Roxo, 1996).

Além da infecção com o vírus HIV, a desnutrição, o diabetes, o uso de drogas ilícitas e outros fatores predispõem à infecção por micobactérias e ao desenvolvimento da tuberculose, devido ao imunocomprometimento dos indivíduos (Suazo, 2003 e Ferreira Filho, 2003).

Apesar dos programas de controle o HIV vem afetando novos indivíduos a cada dia. De acordo com os dados obtidos no Rio de Janeiro, 35.6% dos pacientes com tuberculose tratados entre 1995-1998 eram também portadores de HIV (Opas, 2004).

Nos bovinos, segundo uma comunicação da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a tuberculose ocorre em diversos estados brasileiros e causa grandes prejuízos econômicos mas, não se sabe precisamente a sua prevalência. A distribuição regional também não está completamente caracterizada e faltam dados das perdas que a doença provoca. Ainda segundo este comunicado, a tuberculose bovina é uma doença incurável e quando detectada, o animal deve ser sacrificado. O controle da doença é difícil, visto que ainda não existe vacina. Finalmente o documento afirma que esta doença é um problema maior para os produtores de leite e alerta sobre a importância de se adquirir somente

animais comprovadamente sadios e de se adotar medidas higiênicas na propriedade realizando-se periodicamente testes diagnósticos não só nos bovinos mas, também nas pessoas envolvidas com trabalho diário na propriedade (Fapemig, 2004).

De acordo com Roxo, (1996) e Zanini et al, (2001), no Brasil, em 1986, a prevalência da tuberculose comprometia entre 0,9 a 2,9%, da população de bovinos afetando ainda, segundo Roxo (1996), entre 6,2 e 26,3% dos rebanhos apresentavam animais infectados.

Os dados de notificações oficiais de tuberculose bovina no Brasil, apontaram para uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998 e, de acordo com levantamento realizado entre 1999 e 2000, em Minas Gerais, nas regiões do Triângulo Mineiro, centro e sul, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 bovinos, a prevalência de animais infectados foi de 0,8%. No mesmo estudo foram detectadas 5% propriedades com animais reagentes. Este valor elevou-se para 15% nas propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção (Belchior, 2001). Pardo, (2001) afirma que somente 40% dos testes realizados são notificados.

Sakamoto et al, (1999) elaborou no estado de São Paulo um projeto que utiliza os abatedouros para rastrear casos de tuberculose bovina, com o intuito de tipificar geneticamente as cepas dos bacilos e estudar a dispersão da doença, fornecendo dados de epidemiologia com o objetivo de controle da enfermidade naquele estado.

O tratamento da tuberculose bovina não é recomendado mas, em um estudo conduzido por Soerensen et al, 1992 no estado de São Paulo, realizou-se o tratamento da doença com o objetivo de sua erradicação. Neste estudo, os animais tuberculino positivos com lesões abertas foram sacrificados, realizando-se tratamento curativo dos animais positivos mas, com lesões fechadas e tratamento preventivo dos negativos. A droga utilizada foi a isoniazida via oral, administrada durante um ano. Após este período os animais ainda reagentes foram sacrificados, tendo-se constatado a presença de lesões mínimas de tuberculose, já em processo de calcificação. Os animais foram então controlados através da tuberculinização semestral por mais um ano, não tendo sido constatado nenhum animal doente. Por outro lado, Roxo, (1996) afirma não ser possível, através de tratamento, a eliminação de todos os animais portadores do agente tuberculoso, e que, desta maneira, a fonte de infecção é mantida perpetuando a doença no rebanho.

Pardo et al, (2001) isolou o *Micobacterium* spp. de leite de vacas suspeitas de tuberculose no estado de São Paulo e encontrou resultados semelhantes a um estudo realizado em Cuba, no qual a uma freqüência de isolamento do agente, a partir, das amostras analisadas foi de 10%. Depois de realizar cromatografia em camada delgada e observar o aspecto das colônias, o tempo e temperatura de crescimento, concluíram que os agentes isolados eram constituídos de *M. bovis* (5,26%), *M. avium* (5,26%), *M. fortuitum* (10,52%) e *Micobacterium* spp. (78,95%), reforçando a importância da transmissão por leite visto que 47% do leite consumido nas áreas urbanas e rural do Brasil é ainda *in natura*.

Freitas et al, (2001) pesquisaram a tuberculose em búfalos do Estado do Pará e encontraram uma prevalência de 7,7% de lesões suspeitas em carcaças. Concluíram que a via respiratória foi a principal rota de infecção. Quanto à espécie de agente, 67,3 % das amostras isoladas era de *M. bovis*, tendo sido isolado também o *M. gordonae* de fígado e linfonodo retrofaringeano, sendo este o primeiro registro em literatura do isolamento desta espécie de micobactéria em bubalinos.

Jorge, (2001) estudou a aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul e concluiu que diferentes métodos foram capazes de detectar casos de infecção por *M. bovis*. Foram realizadas análises laboratoriais, testes *in vivo* e exames *post-mortem*. O diagnóstico *post-mortem* evidenciou correlação parcial entre a inspeção sanitária de carcaças durante o abate e a presença de micobactérias em cortes histológicos, bem como com seu isolamento depois de cultivado. Por outro lado, a correlação entre a presença de granuloma e o isolamento foi completa. A autora considerou que apesar da pequena amostra utilizada no trabalho a freqüência da tuberculose no Estado pode ser considerada significativa pois observou que 11,1% das amostras de linfonodos analisadas foram positivas para micobactéria.

Araújo, (2004) cultivou 72 amostras condenadas pelo exame macroscópico na inspeção sanitária e observou a presença de BAAR em 17 (23,6%) destas. A espécie *M. bovis* foi confirmada através de PCR em 13 amostras e a autora concluiu que o gado de corte de Mato Grosso do Sul constitui um reservatório de *M. bovis* e devido a ausência de crescimento micobacteriano em lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose há a necessidade da avaliação simultânea com outros recursos diagnósticos.

1.8.2.1. Plano Nacional de Controle e Erradicação

Em 1999, a Associação Brasileira de Buiatria organizou grupos para discussão acerca do controle da tuberculose bovina no Brasil, gerando uma proposta de ação encaminhada ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual constituiu um grupo de trabalho com participação de especialistas e pesquisadores em epidemiologia, em medicina veterinária preventiva, e em serviços de inspeção e defesa sanitária animal gerando o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) instituído em 10 de janeiro de 2001, (Brasil, 2001).

Este programa tem como objetivo diminuir a prevalência e a incidência de novos casos, tanto de tuberculose como de brucelose no Brasil, e melhorar a competitividade da pecuária nacional, através da criação de um número significativo de propriedades certificadas como livres ou monitoradas, que ofereçam ao consumidor produtos de origem animal com baixo risco sanitário.

As principais metas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura para a tuberculose, no PNCEBT são a certificação de propriedades monitoradas; controle de trânsito de reprodutores e normas sanitárias para participação em exposições, feiras e leilões; credenciamento e a capacitação de médicos veterinários; diagnóstico, apoio laboratorial e educação sanitária. O apoio laboratorial é extremamente necessário para o sucesso do PNCEBT, pois no encontro de lesões sugestivas no abate de animais provenientes de propriedades que aderiram ao PNCEBT, estas lesões devem ser confirmadas por laboratório, o que é fundamental no processo de certificação destas (Brasil,2004).

REFERÊNCIAS

- ALITO, A.; MCNAIR, J.; GIRVIN, R.M. et al. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 36, n. 11, p. 1523-1531, 2003.
- ALMEIDA, R.F.C. **Testes diagnósticos *in vivo*, *in vitro* e investigação epidemiológica da tuberculose bovina**. 2004. Dissertação de mestrado em Ciência Animal. UFMS, Campo Grande, 2004.
- AMENI, G.; BONNET, P.; TIBBO, M. A cross-sectional study of bovine tuberculosis in selected dairy farms in Ethiopia. **The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**. v. 1, n. 4, 2000.
- ARAÚJO, C.P. **Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação de polimerase em cadeia, Brasil**. 2004. 53p.. Dissertação de mestrado em Ciência Animal. UFMS, Campo Grande, 2004.
- BELCHIOR, A.P.C.; **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais**. 2001. 55p. Dissertação de mestrado. Escola de Veterinária/UFMG, Belo Horizonte, 2001.
- BONSU, O.A.; LAING, E.; AKANMORI, B.D. Prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme-West district of Ghana, public health implications. **Acta Tropica**., v. 76, p. 9-14, 2000.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, Leis e Decretos, **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. 1997.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 2, de 10/01/2001**.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. 2003. 121p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº6, de 08/01/2004.**

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

COULIBALY, N.D., YAMEOGO, K.R. Prevalence and control of zoonotic diseases: collaboration between public health workers and veterinarians in Burkina Faso. **Acta Tropica.** n. 76, p. 09-14, 2000.

DELGADO, A.; GONZÁLEZ, A.; Evaluación de la prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) em el diagnóstico de la tuberculosis bovina. **Ver. Inv. Vet. Perú.** v. 11, n.2, p. 132-139, 2000. Disponível em: <www.visionveterinaria.com/rivep/art/12set56.htm> Acesso em: 13 jun 2004.

DUNGWORTH, D.L. The respiratory system. In: KENNEDY, P. C., PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**, London, Academic Press, Inc, 1992, 4^aed., cap.6, p. 641-652.

FAPEMIG. Tuberculose bovina. **Revista Minas faz Ciência.** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Belo Horizonte, n. 12, Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/12/index.html>>. Acesso em: 21 jun. 2004.

FERREIRA NETO, J.S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**, São Paulo, 1997. Disponível em: <www.bichoonline.com.br/artigos/ha0008.htm> Acesso em: 21 jun. 2003.

FERREIRA FILHO, O.F., TURCHI, M.D., LARANJEIRAS, R. CASTELO, A. Epidemiological profile of tuberculosis infection and disease among cocaine users admitted to hospitals of the Greater São Paulo city. **Jornal de Pneumologia.** v. 29, n. 3, 2003.

FISCHER, O.A.;MATLOVA, L.; BARTL, J. et al. Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria. **Veterinary Microbiology.** v. 91, n. 4, p. 325-328, 2003.

FREITAS, J. de A.; GUERRA, J.L.; PANETTA, J.C. Características da tuberculose observada em búfalos abatidos para consumo: aspectos patológicos e identificação

de micobactérias. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. v. 38, n. 4, p. 170-176, 2001.

FREITAS, J. de A.; PANETTA, J.C.; MELISSA, C. *et al.* Isolamento de cepas de *Mycobacterium avium* em búfalos abatidos para consumo. **Revista de Saúde Pública**. v. 35, n. 3, p. 315-317, 2001.

GRANJE, J.M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**. v. 81, n. 1/2, p. 71-77, 2001.

HOPE, J.C.; THOM, M.L.; McCORMICK, P.A.; HOWARD, C.J. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 100, n. 3-4, p. 187-195, 2004.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6^a ed. São Paulo: Manole, 2000,. p. 499-508.

JORGE, K.S.G. **Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2001. 69p. Dissertação de mestrado. FIOCRUZ/UFMS, Campo Grande, 2001.

KANTOR, I.N. **Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal**. OPAS/OMS. Nota Técnica nº11, 1979, 63 p.

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

LATINI, O.,CANAL, A.M., FERRARA, M.E. *et al.* Confiabilidade em la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* em ganado bovino por decomisos em frigoríficos. **Arquivos de Medicina Veterinária**. v. 29, n. 2, 1997.

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

MONDRAGÓN-BARRETO, M.; VÁZQUEZ-CHACÓN, C.A.; BARRÓN-RIVERO, C. *et al.* Comparison among three methods for mycobacteria identification. **Salud Pública de México**. v. 42, n. 6, 2000.

MORRIS, R.S., PFEIFFER, D.U., JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**. n. 40, p. 153-157, 1994.

OPAS-Organização Panamericana de Saúde, **Base de Dados Regional de Mortalidade e Vigilância nas Américas**. set. 2004. Disponível em: <<http://www.paho.org/search/DbSRReturn.asp>> Acesso em: 30 ago. 2004.

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

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. p 748-785.

RITELLI, M.; AMADORI, M.; TAGLIABUE, S.; PACCIARINI, M.L. Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples. **Veterinary Microbiology**. n. 94, p. 105-120, 2003.

ROBLEDO, J; MEJÍA G.I. Actualidad em el diagnóstico de tuberculosis por el laboratorio. **Asociación Colombiana de Infectología**. Disponível em: <www.infectio.org/v5n4/v5n4.htm>. Acesso em: 20 mai. 2004.

ROXO, E. Tuberculose Bovina. In: **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 63, n. 2, p. 91-97. São Paulo, 1996. Disponível em: <<http://www.mgar.vet.br/buiatria/TbBovNet/revisao.htm>>. Acesso em 12 ago. 2003.

SAKAMOTO, S. M., JARDIM, F. S. F., MOSSERO, O. D. *et al.* Vigilância epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de São Paulo: uma proposta. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2001, Campo Grande-MS.

SENAI/DN, Métodos de conservação de alimentos e seus efeitos sobre os microrganismos. In: **Elementos de apoio ao Sistema APPCC**. Série Qualidade e Segurança Alimentar. Projeto APPCC, Convênio CNI/SENAI/SEBRAE, Brasília., 1999, 371 p.

SILVA, A.C.N.; BERNARDES, R.S.; MORAES, L.R.S. et al. Critérios adotados para seleção de indicadores de contaminação ambiental relacionados aos resíduos sólidos de serviços de saúde: uma proposta de avaliação. **Caderno de Saúde Pública**. v. 18, n. 5, p. 1401-1409, 2002.

SOERENSEN, B.; ALMEIDA FILHO, O.M.; SCHILLER, W.R.; VIEIRA, V. Controle e erradicação da tuberculose bovina. Estudo experimental no Estado de São Paulo, Brasil. **Unimar Ciências**. v. 1, p. 14-18, 1992. Disponível em: <www.unimar.br/ciencias/1-3.html> Acesso em: 21 jun. 2004.

SOUZA, A.V.; SOUZA, C.F.A.; SOUZA, R.M.; RIBEIRO, R.M.P., OLIVEIRA, A.L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene alimentar**. São Paulo, v. 13, n. 59, p. 22-27, 1999. Disponível em: <www.bichoonline.com.br/artigos/ha0001.htm>. Acesso em 21 jun. 2004.

SUAZO, F.M., ESCALERA, A.M.A., TORRES, R.M.G. A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species. **Preventive Veterinary Medicine**. n. 58, p. 1-13, 2003.

THOEN, C.O.; KARLSON, A.G.; HIMS, E.M. Mycobacterial infections in animals. **Rev Infect. Dis**. v. 3, p. 960-972, 1981.

WATERS, W.R.; NONNECKE, B.J. FOOTE, M.R., et el. Mycobacterium bovis bacille Calmette–Guerin vaccination of cattle: activation of bovine CD4⁺ and $\gamma\delta$ TCR⁺ cells and modulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Tuberculosis**. v. 83, p. 287-297, 2003.

WEDLOCK, D.N.; SKINNER, M.A.; PARLANE, N.A.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; de LISLE G.W.; BUDDLE, B.M. Vaccination with DNA vaccines encoding MPB70 or MPB83 or a MPB70 DNA prime-protein boost does not protect cattle against bovine tuberculosis. **Tuberculosis**. v. 83, n. 6, p. 339-349, 2003.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P. et al. Mycobacterium bovis: Polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and ganotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restricion

fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 96, 2001.

ARTIGO

Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em cortes histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos

(Research of acid-fast bacilli in histological especimes of lesions suggested bovine tuberculosis)
S.C.Martins , A.L.R. Osório, P.P.Pires, E.B.Guimarães

Pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes em cortes histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos

(Research of acid-fast bacilli in histological especimes of lesions suggested bovine tuberculosis)

S.C.Martins¹, A.L.R. Osório¹, P.P.Pires², E.B.Guimarães³

¹Programa de Mestrado em Ciência Animal

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

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

³ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/Departamento de Medicina Veterinária.

Caixa postal 549 – 79070-900 – Campo Grande MS

Fone/Fax (67) 345-3600; e-mail ebg@nin.ufms.br

Resumo

O presente estudo verificou a ocorrência de bacilos álcool-ácido resistentes, em linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose observadas durante inspeção sanitária em abatedouros-frigoríficos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF), em Mato Grosso do Sul no período de maio a novembro de 2003. Foram colhidas 63 amostras que, depois de fixadas, foram destinadas à histopatologia e processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Cortes de 4 µm foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e pela técnica de Ziehl Neelsen-Faraco. À histopatologia, 74,6% dos casos evidenciaram lesões granulomatosas características de tuberculose ganglionar, 17,5% apresentaram lesões nodulares inespecíficas e 7,9% inconclusivos, apresentando-se como processos inflamatórios difusos. Bacilos álcool-ácido resistentes foram observados em 70% das lâminas coradas pela técnica de Ziehl Neelsen-Faraco.

Palavras-Chave: Tuberculose bovina, Inspeção de Carne, Frigorífico.

Abstract

This study aims at verifying the occurrence of acid-fast bacilli in bovine lymph nodes. The lesions that suggested bovine tuberculosis have been observed by the sanitary inspection in slaughterhouses and meat packing plants by the Service of Federal Inspection in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, in the period from May to November, 2003. Were collected 63 samples that after fixation were sent to the histopathology and processed by the technique of paraffin inclusion. Histological especimes of 4 µm were stained by hematoxylin eosin (HE) and another one by Ziehl-Neelsen-Faraco. At the histopathology, 74,6% of the cases to become evident granulomatous lesions characteristic of node tuberculosis, 17,5% indicated no inespecific nodular lesions e 7,9% is not conclusive, that show like inflammatory diffuse process. Acid-fast bacilli were observed in 70% of slides staining by the Ziehl Neelsen- Faraco's technique.

Keywords: Bovine tuberculosis, Meat inspection, Meat-packing-plant.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma zoonose de evolução crônica, causada pelo *Mycobacterium bovis*, que provoca lesões granulomatosas, afetando principalmente as espécies bovina e bubalina (Brasil,2004).

Conforme Souza et al, (1999) foi observado um aumento significativo dos casos de tuberculose humana notificados no Brasil, atingindo 85.955 casos em 1992 mas, a espécie de *Mycobacterium* envolvida não foi identificada pelo método de diagnóstico empregado. Portanto não há dados quanto ao número de pacientes afetados pelo *M. bovis*, pois é feita apenas a baciloscopia do escarro. Nos EUA 45% dos casos fatais são atribuídos ao *M. bovis*.

Com o advento da AIDS, a incidência de tuberculose vem aumentando, associada à imunossupressão do indivíduo. De acordo com os dados obtidos no Rio de Janeiro, 35.6% dos pacientes com tuberculose tratados entre 1995-1998 eram também portadores do vírus HIV (Opas, 2004).

Além da infecção pelo HIV, a desnutrição, o diabetes, o uso de drogas ilícitas e outros fatores predis põem à infecção por micobactérias e ao desenvolvimento da tuberculose (Suazo,2003 e Ferreira Filho,2003).

Em relação ao rebanho bovino, de acordo com Roxo, (1996) e Zanini et al, (2001) no Brasil, em 1986, a prevalência da tuberculose comprometia entre 0,9 a 2,9%, da população de bovinos. Roxo, (1996) afirma ainda que entre 6,2 e 26,3% dos rebanhos apresentavam animais infectados.

A tuberculose bovina é uma doença incurável e quando detectada, o animal deve ser sacrificado. O controle da doença é difícil, visto que ainda não existe vacina (Belchior, 2001).

Ainda segundo Belchior, (2001) a doença ocorre em diversos estados brasileiros causando sérios prejuízos econômicos contudo, a distribuição regional não está completamente caracterizada e faltam dados das perdas que a doença provoca. A autora afirma que esta doença é um problema maior para os produtores de leite e alerta sobre a importância de se adquirir somente animais comprovadamente sadios e de se adotar medidas higiênicas na propriedade realizando-se periodicamente testes diagnósticos não só nos bovinos mas, também nas pessoas envolvidas com trabalho diário na propriedade.

Os dados de notificações oficiais de tuberculose bovina no Brasil, apontaram para uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998 Belchior, (2001) e Pardo, (2001) afirma que somente 40% dos testes realizados são notificados.

Os bovinos tuberculosos representam um sério perigo para a saúde pública devido à possibilidade de transmissão do agente através do leite e carne consumidos *in natura*, além de sua importância como doença ocupacional (Ferreira Neto & Bernardi,1997 e Souza et al, 1999).

Brasil, (1997) no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, em seu artigo 196º, dispõe sobre os procedimentos que o inspetor sanitário deve efetuar quando do encontro de lesões sugestivas de tuberculose. Dependendo do tipo e da distribuição das lesões é efetuado o julgamento, e o inspetor deve basicamente decidir por um dos três destinos da carcaça – condenação total, rejeição parcial ou esterilização pelo calor.

Apesar da importância que representa a inspeção sanitária de carne na implementação de medidas preventivas da tuberculose A avaliação baseada exclusivamente na macroscopia, como é realizado em matadouros-frigoríficos pelo Médico Veterinário responsável, é muitas vezes questionada por parte dos produtores ao condenar uma carcaça por tuberculose, visto que a maior parte dos animais apresenta-se aparentemente saudável. Também por parte dos veterinários existe o questionamento de que macroscopicamente outras lesões podem ser confundidas com tuberculose e por ser passível de falhas podem ser emitidos diagnósticos falsos positivos, com o intuito de se evitar riscos para o consumidor, e que motivam a condenação imprópria da carcaça, acarretando prejuízos econômicos que os produtores afirmam ser consideráveis.

Contudo, o achado macroscópico de lesões de abate não é o único critério para que seja efetuada a condenação da carcaça. Também deve ser avaliado o resultado do teste tuberculínico e só deve adentrar as dependências do frigorífico os animais que possuírem Guia de Trânsito Animal (GTA) que é condicionado à apresentação de testes negativos para tuberculose e também para brucelose. Os atestados de exames negativos para tuberculose são válidos por 60 (sessenta) dias, a contar da data da colheita de sangue para diagnóstico de brucelose e da realização do teste para diagnóstico de tuberculose. Os testes de diagnóstico não são obrigatórios para

animais com origem em estabelecimento de criação monitorado ou livre para tuberculose (Brasil,2004)

Os estabelecimentos de criação que aderiram ao programa e desejam obter o certificado de estabelecimento de criação livre ou de monitorado, devem efetuar diagnósticos de rotina e confirmatórios no rebanho, e no encontro de lesões sugestivas de tuberculose por ocasião do abate de animais destas propriedades estas lesões devem ser encaminhadas para laboratório oficial ou credenciado para a realização do diagnóstico confirmatório, o que é essencial no processo de certificação das propriedades (Brasil, 2004).

O apoio laboratorial e a confirmação diagnóstico são extremamente necessários e é portanto uma ferramenta essencial para o sucesso do no programa nacional de controle e erradicação da tuberculose (PNCEBT) visto que dúvidas podem ser esclarecidas, prevenindo falhas através de exames *post-mortem* adequados, como os exames histopatológicos, microbiológicos e de biologia molecular.

Em se confirmando infecção por *Mycobacterium bovis*, todos os animais de idade igual ou superior a seis semanas devem ser submetidos a testes de diagnóstico para tuberculose, destinando os reagentes positivos ao sacrifício ou destruição (Brasil, 2004).

Abatedouros podem ser utilizados como sentinelas da doença e a partir de amostras condenadas ser efetuado o cultivo para identificação da espécie e em estudos mais aprofundados, a identificação da cepa predominante na região (Sakamoto, 1999).

Para diagnóstico em cortes histológicos, os solventes de parafina utilizados na coloração de rotina, dissolvem também os lípideos capsulares das micobactérias, impedindo sua coloração. Este problema foi satisfatoriamente contornado quando Faraco modificou a técnica de coloração desenvolvida por Franz Ziehl & Friederich Neelsen, utilizada para esfregaços de micobactérias, realizando o reengorduramento dos bacilos com substâncias oleosas de origem mineral, animal e vegetal (Michalany, 1980).

O presente estudo teve como objetivo descrever o aspecto morfológico de lesões sugestivas de tuberculose ao abate e pesquisar a presença de BAAR nas lesões granulomatosas diagnosticadas como tuberculose e estudo confirmou a importância da inspeção sanitária frente aos atuais métodos diagnósticos visto que 70% das lesões continham BAAR.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material biológico objeto deste estudo constou de 63 amostras de linfonodos de bovinos apresentando lesões granulomatosas com características de tuberculose. As referidas amostras foram colhidas durante o período de maio a novembro de 2003 em bovinos abatidos em 05 abatedouros-frigoríficos de Mato Grosso do Sul sob Serviço de Inspeção Federal (SIF). Os animais cujos gânglios linfáticos apresentaram lesões compatíveis com aquelas causadas pela tuberculose eram provenientes de diferentes regiões do Estado, bem como de Minas Gerais e Goiás.

As amostras foram retiradas de lesões nodulares, hemorrágicas ou não, de tamanhos e formas variados, contendo exudato purulento, caseoso ou calcificado, observadas durante a inspeção sanitária em linfonodos de bovinos cujas carcaças foram desviadas para o Departamento de Inspeção Final (DIF) por apresentarem, ao exame macroscópico, alterações sugestivas de tuberculose. A caracterização das lesões foi de acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, artigo 196 (Brasil, 1997).

As amostras dos linfonodos, com no máximo 1,0 cm de espessura, foram acondicionadas em recipientes plásticos de boca larga, contendo formol a 10%, na proporção de 5 a 10 partes de fixador para cada parte de material colhido e encaminhadas ao laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Uma vez no laboratório, os espécimes foram fotografados e recortados com, no máximo 8,0 mm de espessura, de forma que cada fragmento de lesão se constituísse de todas as camadas do granuloma, isto é, a transição entre a lesão e o tecido ganglionar aparentemente normal, a cápsula e o material necrótico.

Depois de fixados, os materiais foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e microtomizados a 4 μ m, obtendo-se duas lâminas histológicas de cada bloco (Luna, 1968).

Uma das lâminas, de cada amostra foi corada pela Hematoxilina-Eosina (HE) (Luna, 1968) e outra submetida à coloração de Ziehl-Neelsen-Faraco (Michalany, 1980 e Mendes Luz & Zancheta Neto, 2002). Para a coloração de Ziehl-Neelsen-Faraco empregou-se o protocolo modificado por Mendes Luz & Zancheta Neto (2002).

Cada bateria de coloração era constituída de lâminas de casos a serem avaliados e mais duas para controles positivo e negativo.

Os cortes histológicos corados com HE foram avaliados em microscópio de luz com o objetivo de se observar alterações histopatológicas e, nos corados pelo Ziehl-Neelsen-Faraco, procurou-se pela presença de BAAR. As lesões significativas e os bacilos evidenciados pela coloração especial foram fotomicrografadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Macroscopicamente, as alterações histopatológicas observadas nos linfonodos examinados constaram de nodulações que variavam desde uma estrutura discretamente diferente do tecido adjacente, à presença de massa amorfa de material caseoso circundada por uma cápsula de tecido conjuntivo. Estas lesões eram de coloração cinza-esbranquiçada, de número e dimensões variadas e geralmente bem delimitadas do restante do tecido normal. Algumas apresentavam contorno irregular (Fig.1). Este padrão de lesão está de acordo com o descrito macroscopicamente por (Thoen et al, 1981 e Dungworth et al, 1992) para casos de tuberculose em linfonodos de bovinos.

Microscopicamente, do total de amostras de linfonodos coradas pela HE, 47 (74,6%) evidenciaram lesão histológica característica de um processo inflamatório do tipo granulomatoso (Fig.2) As lesões mais recentes apresentavam-se como uma coleção densa de células com núcleos vesiculosos e citoplasma palidamente corado conferindo-lhes uma aparência com células epiteliais que, na maioria das vezes, se dispunham em paliçada (Fig.3). De acordo com Dungworth et al, (1992), estas são denominadas epitelióides devido à sua semelhança com células epiteliais e se arranjam na tentativa de criar uma barreira à difusão do agente. Nos casos mais avançados, especialmente naqueles em que, macroscopicamente havia desenvolvimento nódulos encapsulados, observou-se uma intensa proliferação histiocitária e fusão das células epitelióides, dando origem a células gigantes tipo Langhans (Fig.3). As células do centro da lesão evidenciaram um franco processo necrótico, apresentando-se como uma massa intensamente corada pela eosina em cujo centro, na maioria dos casos, observava-se material amorfo acidofílico (Fig.2). Estes achados, de acordo com Dungworth et al, (1992) e (Jones et al, 2000), correspondem à necrose do tipo caseificação e à calcificação distrófica, que normalmente acompanham os processos tuberculosos. Na parte externa deste tipo

de lesão foi observada considerável proliferação fibroblástica, bem como abundante infiltrado mononuclear, constituído predominantemente de macrófagos e linfócitos. Havia também ocasionais polimorfonucleares, com predominância de neutrófilos e poucos eosinófilos. Este tipo de lesão é classificado como granuloma completo, amplamente observado em casos de infecções crônicas pelo bacilo da tuberculose. O resultado do exame histopatológico está representado na Tabela.

Tabela: Diagnóstico histopatológico em cortes histológicos de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos, observadas durante a inspeção *post mortem* de animais abatidos em Mato Grosso do Sul, durante o período de maio a novembro de 2003

Diagnóstico	Nº de amostras	% de amostras
Granuloma completo	47	74,6
Lesões nodulares inespecíficas	11	17,5
Inconclusivos ¹	5	7,9
Total	63	100

¹ Consideraram-se inconclusivos os casos em que as lesões observadas eram difusas e não se enquadravam morfológicamente como granulomas ou abscessos

Dentre as 63 amostras coradas pela HE, 47 (74,6%) apresentavam granuloma e 11 (17,5%) evidenciaram lesões nodulares inespecíficas, constituídas de uma cápsula fibrosa vascularizada envolvendo uma banda de células inflamatórias, com predominância de neutrófilos, os quais, à medida que se aprofundavam na lesão tornavam-se degenerados, evoluindo para necrose do tipo liquefativa, na maioria das vezes sem presença de precipitado de cálcio. Este tipo de alteração caracteriza-se, de acordo com Thomson, (1983), compatíveis com abscesso constituído de cápsula, membrana piogênica e tecido necrótico de liquefação.

Finalmente, em 5 casos, ou em 7,9% o processo inflamatório era difuso e, por isto, considerado inconclusivo. Este tipo de lesão não permite que o processo patológico que afeta o linfonodo seja morfológicamente caracterizado como granulomas ou abscessos.

Das 63 amostras submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen-Faraco, 44 (70%) evidenciaram a presença de BAAR. O microorganismo aparece como bacilo corado em vermelho, distribuído difusamente ou no interior de macrófagos (Fig.4). Apesar desta coloração ser preconizada para o diagnóstico de infecções por BAAR, entre os quais situa-se o agente da tuberculose, conforme afirma Michalany (1980), não há referências a respeito de sua precisão como meio de diagnóstico.

Na técnica utilizada neste trabalho segundo Mendes Luz & Zancheta Neto, (2002) a qual é utilizada na rotina do Hospital Universitário da UFMS, consideramos uma vantagem o fato da utilização do calor para forçar a coloração pela fucsina, fato este que foi o princípio descoberto por Ziehl e Neelsen em 1882-83, e também utiliza o processo de reengorduramento estabelecido por Faraco, em 1938, portanto utiliza o melhor de cada uma das técnicas, podendo oferecer um melhor e mais confiável resultado.

Neste estudo as lesões foram predominantes em linfonodos, isto se deve talvez ao fato de que a lesão inicial nos pulmões muitas vezes é de difícil visualização durante a inspeção sanitária.

Latini et al,(1997) efetuaram um levantamento da prevalência de infecção por *M. bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos da província de Santa Fé na Argentina através de cultivo e isolamento da bactéria, e de exames histopatológicos. Concluíram que a grande maioria das lesões foi diagnosticada adequadamente na inspeção e que o exame histopatológico foi uma técnica sensível para confirmar as lesões suspeitas (80%) sendo que 59,1% das lesões apresentavam localização pulmonar.

Jorge, (2001) estudou a aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul e concluiu que diferentes métodos foram capazes de detectar casos de infecção por *M. bovis*. Foram realizadas análises laboratoriais, testes *in vivo* e exames *post-mortem*. O diagnóstico *post-mortem* evidenciou correlação parcial entre a inspeção sanitária de carcaças durante o abate e a presença de micobactérias em cortes histológicos, bem como com seu isolamento depois de cultivado. Por outro lado, a correlação entre a presença de granuloma e o isolamento foi completa. A autora considerou que apesar da pequena amostra utilizada no trabalho a frequência da tuberculose no Estado pode ser considerada significativa pois observou que 11,1% das amostras de linfonodos analisadas foram positivas para micobactéria.

Araújo, (2004) cultivou 72 amostras condenadas pelo exame macroscópico na inspeção sanitária e observou a presença de BAAR em 17 (23,6%) destas. A espécie *M. bovis* foi confirmada através de PCR em 13 amostras e a autora concluiu que o gado de corte de Mato Grosso do Sul constitui um reservatório de *M. bovis* e devido a ausência de crescimento micobacteriano em lesões granulomatosas sugestivas de

tuberculose há a necessidade da avaliação simultânea com outros recursos diagnósticos.

Neste estudo constatamos que uma grande parte dos animais abatidos eram provenientes de diversas propriedades e adquiridos pelos proprietários que os encaminhavam ao abate. Os produtores na verdade não conhecem bem a origem dos animais, visto que adquirem animais de outros municípios e às vezes até de outros estados.

Embora os métodos não sejam comparáveis houve uma grande concordância entre inspeção e BAAR. Não há excesso de condenação pois o SIF segue o RIISPOA e condena aquilo que julga impróprio para o consumo, e o produtor perderia da mesma forma, sendo ou não tuberculose. Contudo, a inspeção deveria ser mais detalhada para identificar lesões pouco visíveis.

Mesmo não sendo possível afirmar que os BAAR encontrados sejam micobactérias tuberculosas, este estudo confirma a importância da inspeção sanitária frente aos atuais métodos diagnósticos visto que a maioria das lesões continham BAAR.

Empregando os atuais recursos disponíveis, e considerando que métodos de cultivo e outros existentes não dão um rápido diagnóstico e muitas vezes não conseguem um grande número de isolamento de micobactérias nas amostras, podemos confirmar através dos resultados deste trabalho que a inspeção sanitária é, no momento, o mais viável método de acordo com os objetivos econômicos e de proteção à saúde humana para tomada de decisão quanto ao destino de carcaças.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C.P. **Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação de polimerase em cadeia, Brasil.** 2004. 53p.. Dissertação de mestrado em Ciência Animal. UFMS, Campo Grande, 2004.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, Leis e Decretos, **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA.** 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº6, de 08/01/2004.**

BELCHIOR, A. P. C.; **Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais. 2001.** 55p. Dissertação de mestrado. Escola de Veterinária/UFMG. Belo Horizonte, 2001.

DUNGWORTH, D.L. The respiratory system. In: KENNEDY, P. C., PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**, London, Academic Press, Inc, 1992, 4^a ed., cap.6, p. 641-652.

FERREIRA FILHO, O.F., TURCHI, M.D., LARANJEIRAS, R. CASTELO, A. Epidemiological profile of tuberculosis infection and disease among cocaine users admitted to hospitals of the Greater São Paulo city. **Jornal de Pneumologia**. v. 29, n. 3, 2003.

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**. São Paulo. 1997. Disponível em: <www.bichoonline.com.br/artigos/há0008.htm>. Acesso em: 21 jun. 2003.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6^a ed. São Paulo: Manole, 2000,. p. 499-508.

JORGE, K.S.G. **Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.** 2001. 69p. Dissertação de mestrado. FIOCRUZ/UFMS, Campo Grande, 2001.

LATINI, O.,CANAL, A.M., FERRARA, M.E. et al. Confiabilidade em la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* em ganado bovino por decomisos em frigoríficos. **Arquivos de Medicina Veterinária**. v. 29, n. 2, 1997.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw Hill,1978, 3 ed.

MENDES LUZ, M. A.; ZANCHETA NETO, D. **Histoquímica e imunohistoquímica**. Sociedade Brasileira de Histotécnicos, São José do Rio Preto - SP, 2002.

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

OPAS-Organização Panamericana de Saúde, **Base de Dados Regional de Mortalidade e Vigilância nas Américas**. set. 2004. Disponível em: <<http://www.paho.org/search/DbSReturn.asp>> Acesso em: 30 ago. 2004.

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

ROXO, E. Tuberculose Bovina. In: **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 63, n. 2, p. 91-97. São Paulo, 1996. Disponível em: < <http://www.mgar.vet.br/buiatria/TbBovNet/revisao.htm>>. Acesso em 12 ago. 2003.

SAKAMOTO, S. M., JARDIM, F. S. F., MOSSERO, O. D. *et al.* **Vigilância epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de São Paulo: uma proposta**. In: IV Congresso Brasileiro de Buiatria, 2001, Campo Grande-MS.

SOUZA, A. V.; SOUZA, C. F. A.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P., OLIVEIRA, A. L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene alimentar**. São Paulo, v. 13, n. 59, p. 22-27, 1999. Disponível em: < www.bichoonline.com.br/artigos/ha0001.htm > . Acesso em 21 jun. 2004.

SUAZO, F.M., ESCALERA, A.M.A., TORRES, R.M.G. A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species. **Preventive Veterinary Medicine**. n. 58, p. 1-13, 2003.

THOEN, C. O.; KARLSON, A. G.; HIMS, E. M. Mycobacterial infections in animals. **Rev Infect. Dis**. v. 3, p. 960-972, 1981

THOMSOM, R. G. **Patologia Geral Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1983, 412 p.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P. *et al.* Mycobacterium bovis: Polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and ganotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restricion fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 96, 2001.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método empregado no estudo foi capaz de identificar BAAR em 70% das lesões condenadas nos abatedouros-frigoríficos. Não é possível afirmar porém, apenas por este exame, que se trata de tuberculose, visto que outras bactérias como *Nocardia* sp. e *Rhodococcus equi* apresentam as mesmas características tintoriais. Contudo é justificado o seu uso para que a partir das amostras condenadas como positivas para tuberculose sejam identificados bacilos álcool-ácido-resistentes. Este estudo confirma a importância da inspeção sanitária frente aos atuais métodos diagnósticos visto que a maioria das lesões continham BAAR.

Empregando os atuais recursos disponíveis, visto que métodos de cultivo e outros existentes não dão um rápido diagnóstico e muitas vezes não conseguem um grande número de isolamento de micobactérias nas amostras, podemos confirmar através dos resultados deste trabalho que a inspeção sanitária tem grande importância, uma vez que, no momento, é o mais viável método de acordo com os objetivos econômicos e de proteção à saúde humana.

Tais objetivos visam à aplicação de medidas de controle da tuberculose, considerando a nova filosofia de controle de qualidade dos produtos de origem animal, que integra as funções de inspeção, controle de qualidade e vigilância sanitária em toda a cadeia produtiva ao considerar o princípio da rastreabilidade. Tais procedimentos permitem melhores definições de risco, com reflexos diretos na economia e na prevenção da saúde pública e animal. Há necessidade de se adotarem estratégias que combinem os recursos anatomopatológico, histopatológico e microbiológico entre si e com outros, como a tuberculinização e outros mais modernos e de maior desempenho, com vistas ao aprimoramento das ações de decisão sanitária do médico veterinário.