UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária

Dissertação

Avaliação de diferentes técnicas de diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização

Tássia Gomes Guimarães

Pelotas, 2017

Tássia Gomes Guimarães

Avaliação de diferentes técnicas de diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Luiz Filipe Damé Schuch

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G963a Guimarães, Tássia Gomes

Avaliação de diferentes técnicas de diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização / Tássia Gomes Guimarães ; Luiz Filipe Damé Schuch, orientador. — Pelotas, 2017.

48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Exame macroscópico. 2. Histopatologia. 3. Bacteriologia. 4. PCR. 5. ELISA. I. Schuch, Luiz Filipe Damé, orient. II. Título.

CDD : 636.2089

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Tássia Gomes Guimarães

Avaliação de diferentes técnicas de diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/06/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Filipe Damé Schuch (orientador)
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª. Drª. Fernanda de Rezende Pinto
Doutora em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Profª. Drª. Margarida Buss Raffi
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Fábio Raphael Pascoti Bruhn
Doutor em Sanidade Animal e Saúde Coletiva pela Universidade Federal de Lavras

Resumo

GUIMARÃES, Tássia Gomes. **Avaliação de diferentes técnicas de diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização**. 2017. 48f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A tuberculose bovina é uma importante doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium bovis*. Ela é considerada tanto um problema na saúde pública quanto nas perdas econômicas que ela gera. Na ausência de uma vacina eficaz para essa doença, programas de controle e erradicação são baseados no diagnóstico através dos testes intradérmicos no animal vivo e abate dos animais positivos. Este trabalho teve como objetivo a comparação de métodos de diagnóstico para a tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização. Foramrealizadosexame macroscópico, caracterização histopatológica, cultivo microbiológico, identificação de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR), identificação molecular e sorológica. Um total de 28 bovinos foram abatidos em matadouros- frigorífico sob serviço de inspeção estadual no estado do Rio Grande do Sul. As amostras de sangue foram colhidas no momento antes da aplicação da tuberculina, durante a realização do teste intradérmico. Já as amostras de tecidos com ou sem lesão macroscópica sugestiva de tuberculose foram coletadas no momento do abate. Na avaliação macroscópica, 14 animais (50%) apresentaram lesão sugestiva de tuberculose. Na avaliação histológica 12 amostras (42,86%) apresentaram lesão granulomatosa característica. No cultivo microbiológico, 15 amostras (53,57%) foram isoladas no meio de cultura de Stornebrink, e nove amostras (32,14%) no meio 7H9. A identificação de BAAR só foi possível em sete amostras (25%). Já a identificação molecular foi determinada em seis amostras (21,42%) e a sorológica em 26 amostras (92,85%). O exame macroscópico detalhado, associado a utilização do ensaio sorológico e juntamente com o exame histopatológico contribui tanto para o diagnóstico da tuberculose quanto para o sucesso de um plano de controle e erradicação.

Palavras-chave: exame macroscópico; histopatologia; bacteriologia; PCR; ELISA

Abstract

GUIMARÃES, Tássia Gomes. **Evaluation of different diagnostic techniques for bovine tuberculosis in tuberculin reagent animals**. 2017. 48f. Dissertation (Master degree in Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Bovine tuberculosis is an important infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*. It is considered both a public health problem and the economic losses it generates. In the absence of an effective vaccine for this disease, control and eradication programs are based on the diagnosis through the intradermal tests in the live animal and slaughter of the positive animals. This work aimed to compare diagnostic methods for bovine tuberculosis in animals reactive to tuberculinization. Macroscopic examination, histopathological characterization, microbiological culture, identification of acid-fast bacilli (AFB), molecular and serological identification were performed. A total of 28 cattle were slaughtered in cold slaughter houses under state inspection in the state of Rio Grande do Sul. Blood samples were collectedat the time before the application of the tuberculin during the intradermal test. On the ot her hand, tissue samples with or without macroscopic lesions suggestive of tuberculosis were collectedat the time of slaughter. In the macroscopic evaluation, 14 animals (50%) presented lesions suggestive of tuberculosis. In the histological evaluation 12 samples (42.86%) had a characteristic granulomatous lesion. In the microbiological culture, 15 samples (53.57%) were isolated in the Stornebrink culture medium, and nine samples (32.14%) in the 7H9 medium. The identification of AFB wason lypossible in seven samples (25%). Already the molecular identification was determined in six samples (21.42%) and the serological in 26 samples (92.85%). Detailed macroscopic examination associated with the use of the serological test and together with the histopathological examination contributes both to the diagnosis of tuberculosis and to the success of a control and eradication plan.

Keywords: macroscopic analysis; histopathological analysis; bacteriological analysis; PCR; ELISA

Lista de Figuras

Artigo

Figura 1 Lesões nodulares típicas de tuberculose em órgãos de bovinos reagentes no teste cervical comparativo. (A) Fígado apresentando lesões nodulares de 1 a 2 cm de diâmetro. (B) Linfonodo traqueobrônquico com processo inflamatório. (C) Pulmão com processo inflamatório granulomatoso contendo exsudato de aspecto caseoso a purulento em seu interior..... 34

Figura 2 Detecção de DNA de *Mycobacterium bovis* por PCR dos isolados bacterianos. DNA extraído de 13 isolados bacterianos..... 37

Lista de Tabelas

Tabela 1 Interpretação do Teste Cervical Simples em bovinos..... 20
Tabela 2 Interpretação do Teste Cervical Comparativo em bovinos..... 21

Artigo

Tabela 1 Resultado dos testes diagnósticos realizado em 28 bovinos reagentes no teste cervical comparativo..... 33

Lista de Abreviaturas e Siglas

BARR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
CMT	Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
DNA	Adenosina Dinucleotídeo
ELISA	*Enzyme Lynked Immuno sorbent Assay*
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FURG	Universidade Federal de Rio Grande
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN	Interferom gama
MAC	Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
OIE	Organização Internacional de Epizootias
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNCEBT	Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PPD	*Purified Protein Derivative*
DAS	Serviço de Defesa Animal
TB	Tuberculose
TCC	Teste Cervical Comparativo
TCS	Teste Cervical Simples
TPC	Teste da Prega Caudal
UFPel	Universidade Federal de Pelotas

Sumário

1 Introdução..... 9
2 Revisão da Literatura..... 12
2.1 Agente etiológico..... 12
2.2 Transmissão..... 13
2.3 Patogenia..... 15
2.4 Sinais clínicos..... 16
2.5 Diagnóstico..... 17
2.6 Importância econômica..... 25
2.7 Importância em Saúde Pública..... 26
3 Artigo..... 27
4 Considerações Finais..... 42
Referências..... 43
Anexo..... 47

1 Introdução

A tuberculose bovina (TB) é uma doença infecto-contagiosa, re-emergente de ocorrência mundial, causada pelo *Mycobacterium bovis*. Ela é uma zoonose de evolução crônica com efeito debilitante, determina prejuízos à pecuária com risco à saúde da população que consome produtos de origem animal (LILENBAUM, 2000; FRÁGUAS et al., 2008) e que tem contato próximo com animais infectados (MICHEL et al., 2010). A doença causa danos substanciais para o setor pecuário, causando prejuízos para as cadeias de carne e leite (ROCHA et al., 2013).

Sua prevalência é maior em países em desenvolvimento cujo conhecimento da epidemiologia da doença e as ações concretas para o seu controle são limitadas (REVIRIEGO GORDEJO; VERMEERSCH, 2006). Na América Latina e no Caribe, existem áreas onde a prevalência ultrapassa 1% (LEITE, 2012). Nesses lugares, a dificuldade de controle da TB bovina se deve à falta de recursos para a efetiva aplicação de programas de elevados custos baseados em tuberculinização e sacrifício dos animais reagentes (MICHEL, 2010). Os planos de controle para combate da TB na América Latina são baseados em esquemas de regionalização, considerando o sistema de produção, as condições culturais, geográficas, econômicas e de infra-estrutura (USABIAGA, 2001; RUGGIERO et al., 2007).

No Brasil, a situação da TB bovina não se encontra bem delineadas, pois os estudos disponíveis são escassos e não sistematizados. Os últimos dados de notificações oficiais disponibilizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) indicam a prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2006). Levantamento realizado em 2009 por Furlanetto et al. (2012) no estado do Mato Grosso, envolvendo 41.103 bovinos, sadios ao exame *ante mortem*, procedentes de 492 rebanhos originário de 85 (60%) municípios mato-grossense, estimou a prevalência de 0,61% do rebanho e prevalência de 0,0007% entre animais. Já estudo realizado por Vendrame (2013) no estado de Rondônia, onde foi feito um inquérito epidemiológico com 904 propriedades, totalizando 19.640 animais, obteve uma prevalência de foco de 2,3% e de animal de 0,1%.

A TB é uma doença crônica, de desenvolvimento lento, geralmente não apresenta sinais clínicos específicos. Muitas vezes não percebida pelos produtores, tornando-se complicado calcular os prejuízos causados por ela; e quando é percebida pelos produtores, a doença já está difundida no rebanho e os prejuízos são ainda maiores (LEITE, 2012).

O hospedeiro primário da TB é o bovino (*Bos taurus* e *Bos indicus*), porém diversas espécies de mamíferos, incluindo o humano são susceptíveis a infecção por *M. bovis (*FURLANETTO et al., 2010; ROCHA et al., 2013). Cepas deste microrganismo foram identificadas em animais de vida selvagem e isto pode ter consequências graves para o ecossistema (MICHEL et al., 2010) e para o controle e erradicação desta doença, pois espécies silvestres podem ser consideradas como hospedeiros disseminadores ou hospedeiros reservatórios (BIET et al., 2005; BUDDLE et al., 2011, SOUZA, 2012).

A mais expressiva forma de introdução da TB em um rebanho é a aquisição de bovino ou bubalino infectado. Além disso, outras espécies de animais podem assumir papel importante como reservatório, capaz de introduzir ou reintroduzir a doença em rebanhos bovinos. No animal infectado o *M. bovis* é eliminado pelo ar expirado, pelas fezes, urina, leite e outros fluidos corporais, dependendo do órgão afetado.

O diagnóstico da TB bovina pode ser realizado através de métodos diretos e indiretos. Os diretos abrangem a detecção e identificação do agente etiológico no material biológico; já nos indiretos, há pesquisa de resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, podendo ser humoral (produção de anticorpos circulantes) ou celular (mediada por linfócitos e macrófagos). Os métodos mais utilizados para o diagnóstico da TB bovina são: a reação tuberculínica, a bacteriologia e a histopatologia.

O principal problema no diagnóstico da TB bovina é o longo tempo necessário para obter um diagnóstico definitivo, que é o isolamento e a identificação bioquímica do agente etiológico. Além disso, existem problemas relativos à especificidade e sensibilidade às quais resultam em reações falso-positivas por causa da infecção cruzada com o *M. avium* e micobactérias ambientais, principalmente em situações de baixa prevalência (MELO, 2014). E ainda há a existência de animais anérgicos, gerando reações falso-negativas (RIVERA et al., 2009; ÁLVAREZ et al., 2012; MELO, 2014).

O controle da TB bovina no Brasil segue o determinado pela Instrução Normativa SDA n° 06, de 08 de janeiro de 2004. Dente as principais medidas estão sacrifício dos animais reagentes, e o controle de trânsito de animais. O Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) tem como objetivo diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2006). Nele, o teste oficial para auxiliar no controle da TB bovina é o teste alérgico-cutâneo.

A TB bovina é importante não somente por constituir-se como uma fonte de infecção para o homem, mas também pelas perdas econômicas que ela ocasiona (ACHA & ZYFRES, 1986). As perdas econômicas causadas pela TB nos animais estão relacionadas principalmente à baixa produtividade e constitui uma significativa causa de condenação de animais em matadouros. Um animal tuberculoso pode apresentar de 10 a 25% de queda na capacidade produtiva (RUGGIERO et al., 2007), além de ser uma fonte de infecção para outros animais.

Os métodos empregados no diagnóstico da TB exercem um papel fundamental no controle. Para que um programa de controle funcione, ele tem que garantir uma rápida decisão e para isso é imprescindível uma rede laboratorial que disponibilize o suporte técnico e um diagnóstico rápido, específico e sensível (RUGGIERO et al., 2007). Porém, vários métodos bacteriológicos foram desenvolvidos, mas não podem ser utilizados isoladamente, para um resultado eficaz e completo (COSIVI et al., 1998; RUGGIERO et al., 2007), sendo necessário a utilização de técnicas complementares.

Na inexistência de um método diagnóstico *antem* ou *post mortem* com eficácia absoluta, que tenha a capacidade de detectar todos os animais infectados com *M. bovis*, é recomendável que mais de um método seja utilizado no diagnóstico da TB bovina e que os resultados laboratoriais sejam interpretados juntamente com os achados clínicos e de acordo com cada situação epidemiológica (BRASIL, 2006; DE LA RUA DOMENECH et al., 2006; RUGGIERO et al., 2007). Outra possibilidade é aplicar métodos que permitam identificar a resposta imune celular e humoral, e que o resultado seja confirmado por isolamento e identificação através de provas bioquímicas ou pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), já que os animais podem estar em diferentes estágios da infecção num mesmo rebanho (MELO, 2014). O objetivo do trabalho foi comparar os diferentes métodos de diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização.

2. Revisão de literatura

2.1 Agente etiológico

As bactérias causadoras de TB em animais e no homem pertencem à classe *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynobacterinea* e família *Mycobacteriaceae* e o gênero *Mycobacterium*, que é composto por dois complexos, o *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), compreendido pelas espécies *M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. canetti, M. microti, M. pinnipeddi, M. caprae, M. mungi* e a subespécie *M. orygis* (VAN INGEN et al., 2012; SOUZA, 2012; MELO, 2014). O outro complexo é formado por cepas não tuberculosas, o complexo *M. avium-intracellulare* (MAC), sendo composta de duas espécies: a *M. avium* e *M. intracellulare.*

Embora as micobactérias do complexo do MAC não sejam virulentas para os bovinos, a espécie *M. avium paratuberculosis* causa gastroenterite crônica em ruminantes, conhecida como doença de Johne's (FACCIUOLO et al., 2013; MELO, 2014). Além disso, as espécies desse complexo causam reações inespecíficas no teste intradérmico, dificultando o diagnóstico da TB bovina (MONAGHAN et al., 1994; POLLOCK et al., 2005; MELO, 2014).

M. bovis é a principal cepa infectante para os bovinos, e é também a cepa mais virulenta entre as espécies do complexo MAC. Ela é capaz de infectar muitas espécies de mamíferos, inclusive o homem, desenvolvendo uma doença crônica (MELO, 2014).

As micobactérias são bacilos imóveis, não esporulados, não encapsulados, não produtores de toxina e são intracelulares facultativos (CORNER, 1994; LAGE et al., 1998; SOUZA, 2012). Elas se apresentam como cocobacilos, medindo de 1 a 100 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura (MELO, 2014). São bacilos álcool-ácido resistentes (BARR), devido à capacidade de formar complexos com os derivados de trifenilmetano, resistindo à ação do álcool-ácido (CORNER, 1994; MELO, 2014).

A parede celular das micobactérias é constituída por lipídeos, como ácidos micólicos e micosídeos e por polipeptídeos (CORNER, 1994; SOUZA, 2012). Elas possuem baixa permeabilidade da parede celular, com alta proporção de lipídeos complexos que são organizados em três compartimentos superpostos: a membrana citoplasmática, uma camada intermediária e a cápsula (MELO, 2014). A presença de ceras e ácidos graxos (ácidos micólicos) presente na parede celular dificulta a sua visualização através das colorações tradicionais.

Além disso, o elevado conteúdo lipídico da parede celular, podendo atingir até 40% do peso seco das células, é responsável por importantes efeitos no hospedeiro, como a indução da formação do granuloma, atividade adjuvante, capacidade de sobrevivência dentro da célula do hospedeiro, patogenicidade (POLLOCK& NEILL, 2002; MELO, 2014), resistência antibióticos comuns e aos desinfetantes, hidrofobicidade das micobactérias em meio líquido e crescimento lento (MELO, 2014).

O *M. bovis* é resistente à ação de agentes químicos, mas sensível à ação de agentes físicos, como a radiação ultravioleta e o calor (POLLOCK& NEILL, 2002; MELO, 2014), sendo assim, a adoção de medidas de desinfecção de currais e de estábulos é de grande importância para o combate dessa enfermidade. A boa insolação juntamente com a utilização de desinfetantes em utensílios e instalações e o uso de hidróxido de cálcio em pastagens e no solo podem fazer parte do programa de combate a esse patógeno (BRASIL, 2006).

2.2 Transmissão

A infecção por *M. bovis* pode ser determinada por diversos fatores, tais como, idade, condições imunológicas, resistência genética, meio ambiente, práticas de manejo e transporte (MELO, 2014). A via de transmissão mais comum e mais importante é a via aerógena, com cerca de 90% das infecções (NEILL et al., 1994, MELO, 2014).

A infecção nos bovinos ocorre quase exclusivamente pela inalação de gotículas infectadas de tosse ou secreção nasal de um animal com TB pulmonar ativa (NEILL et al.,1994; MURAKAMI et al., 2009). A introdução de um animal infectado é a principal fonte de infecção para os outros animais, antes mesmo do desenvolvimento de lesões teciduais (ROXO, 1997; MELO, 2014), e com o avançar

da doença, o potencial de transmissão, aumenta. Segundo Pollock (1994); Melo (2014) a capacidade que um animal infectado tem de transmitir a micobactéria para outro depende da geração de aerossol, do número de bacilos excretados e da densidade do rebanho. Um único bacilo transportado no interior de uma gotícula é suficiente para estabelecer a infecção no pulmão do bovino (MENZIES & NEILL, 2000; SOUZA, 2012).

Geralmente a transmissão oral ocorre em bezerros ao amamentar-se em vacas tuberculosas (PALMER & WATERS, 2006; MURAKAMI et al., 2009). O bacilo também pode ser eliminado pela secreção nasal, fezes, urina, secreção vaginal, secreção uterina, sêmen e leite (RUGGIERO et al., 2007). Grande quantidade de bacilo é eliminada para o meio ambiente pela urina e pelas fezes contaminando pastos e cochos. Porém, tem pouca importância na transmissão da doença (MORRIS, PFEIFER & JACKSON, 1994; SOUZA, 2012).

A ocorrência de TB humana é causada por *M. bovis* através da inalação de aerossóis ou através doconsumo de leite cru contaminado. A ingestão de produtos cárneos contaminados é menor devido à baixa incidência do agente em tecidos musculares associado ao hábito de não se comer carne crua no Brasil. Entretanto, o risco não deve ser ignorado, pois 45% dos casos de TB humana causada pelo *M. bovis* está associada à ingestão de carne contaminada na Nigéria (SOUZA et al., 1999).

A TB de origem zoonótica ocorre principalmente em tratadores de rebanhos infectados e trabalhadores da indústria de carnes (BRASIL, 2006), e ainda trabalhadores de zoológicos, os quais estão em contato com animais selvagens, podendo se infectar mais facilmente com o bacilo (ABRAHÃO, 1999; SOUZA, 2012). Em locais cuja prevalência do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é alta e existem outros tipos de imunossupressão, os indivíduos são ainda mais susceptíveis à infecção por micobactérias (O'REILLY & DABORN, 1995; MURAKAMI et al., 2009).

2.3 Patogenia

Conforme a via de infecção, inicia-se o desenvolvimento das alterações patológicas (BIET et al., 2005; SOUZA, 2012) e também o início da resposta imune celular (POLLOCK & NEILL, 2002; SOUZA, 2012). Os bovinos são infectados por *M. bovis* geralmente pela via respiratória, pois a principal via de transmissão é a inalação de aerossóis infecciosos (SOUZA, 2012), e ocasionalmente pela ingestão dos bacilos (CARTER, 1988; RADOSTITS et al., 2002; CASTRO et al., 2009).

Depois de atingir o alvéolo pulmonar, a micobactéria é fagocitada pelos macrófagos e o seu desenvolvimento vai depender da resistência do hospedeiro, da infectividade do agente e da carga infectante (CASTRO et al., 2009). Caso ela se desenvolva, as micobactérias se multiplicam no interior dos macrófagos até a sua destruição.

Após o rompimento dos macrófagos, os bacilos são fagocitados por novos macrófagos alveolares ou por monócitos vindos da corrente circulatória. Por volta de duas a três semanas após a inalação do agente infeccioso, cessa a multiplicação através da resposta imune celular e acontece uma reação de hipersensibilidade tardia, ocorrendo necrose de caseificação para conter o crescimento intracelular das micobactérias (CASTRO et al., 2009). Esse processo abrange a mediação por linfócitos T, com migração de novas células de defesa ao local da infecção, as quais levarão à formação dos granulomas da TB (KAUFMANN, 1990; POLLOCK& NEILL, 2002; SOUZA, 2012).

As lesões estão mais frequentemente encontradas nos linfonodos da cabeça, pescoço, mediastínicos, mesentéricos, além de pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio (CASSIDY et al., 1999; PALMER, WATERS& WHIPPLE, 2002; SOUZA, 2012). Essas lesões são constituídas por uma parte central, que por vezes contém área de necrose de caseificação, envolta por células epitelioides, células gigantes, linfócitos, macrófagos e uma camada de fibroblastos na superfície (NEILL et al., 1994; CASTRO et al., 2009).

Os bacilos da lesão da TB no parênquima pulmonar se propagam para os linfonodos regionais, nos quais desencadeiam a formação de um novo granuloma, formando assim o denominado “complexo primário” (NEILL et al., 1994; RADOSTITS et al., 2002; BRASIL, 2006; CASTRO et al., 2009).

Macroscopicamente, as lesões possuem geralmente uma coloração amarelada, com forma de um nódulo, medindo de um a três centímetros de diâmetro, podendo ser confluentes. Elas apresentam aspecto purulento ou caseoso, com presença de uma cápsula fibrosa, podendo apresentar nos casos mais avançados da enfermidade no centro da lesão, calcificação (CASSIDY et al., 1999; PALMER, WATERS& WHIPPLE, 2002; POLLOCK& NEILL, 2002; THOEN, LOBUE& DONALD, 2009; SOUZA, 2012).

Nos pulmões as lesões iniciam na junção dos bronquíolos com os alvéolos, e se difundem para os linfonodos e brônquios, podendo regredir, progredir ou continuarem estabilizadas. Devido a uma queda na imunidade do animal, pode ocorrer a disseminação para outros órgãos.

A TB bovina pode se apresentar sob a forma miliar ou protaída. A forma miliar ocorre de forma abrupta e maciça, com disseminação de bacilos pela circulação sanguínea (MARQUES, MAIA JÚNIOR& ZAPPA, 2008; SOUZA, 2012). A forma mais comum é a forma protaída, cuja disseminação se dá por via linfática ou sanguínea, acometendo o pulmão, linfonodos, fígado, baço, úbere, ossos, rins, sistema nervoso central e se dissemina por quase todos os tecidos (RADOSTITS et al., 2002; BRASIL, 2006; CASTRO et al., 2009).

2.4 Sinais clínicos

A TB pode causar uma grande diversidade de sinais clínicos em bovinos. Os sinais dependem dos órgãos acometidos (ABRAHÃO, 1999; SOUZA, 2012). Na maioria dos rebanhos infectados por *M. bovis* a doença é inaparente, sendo a sua presença detectada somente pelo teste tuberculínico (MURAKAMI et al., 2009).

Geralmente os bovinos infectados apresentam perda de peso crônica, apetite variável e febre flutuante, podendo ser acentuada após o parto em fêmeas. Os sinais respiratórios, embora sejam os mais comuns, costumam a serem mais brandos e compreendem em tosse crônica suave e úmida, dispneia, taquipneia e hiperpneia.

O aumento de volume de linfonodos mediastínicos podem levar a obstruções intestinais, ulcerações, nódulos na mucosa do trato digestório superior, abomaso, intestino delgado ou grosso e diarreias. Já o aumento de linfonodos retrofaríngeos podem causar dificuldades na deglutição e salivação (SOUZA, 2012). Podem ocorrem lesões em linfonodos periféricos, glândula mamária e no trato reprodutivo,

ocorrendo de forma rara, causando infertilidade, aborto no estágio inicial da gestação (MATTHIAS, 1998; MURAKAMI et al., 2009), metrite e vaginite (LANGENEGGER, LANGENEGGER & OLIVEIRA, 1981; SMITH, 1993; IZAEL et al., 2009; SOUZA, 2012).

Ainda, estima-se que os animais infectados percam de 10% a 25% de sua eficiência produtiva (MURAKAMI et al., 2009). Além da queda acentuada na produção de leite que é normalmente relatado em caso de vacas enfermas (IZAEL et al., 2009; PACHECO et al., 2009; SOUZA, 2012).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da TB bovina pode ser realizado de forma direta ou indireta. O direto está envolvido na detecção e identificação do agente etiológico no material biológico (BRASIL, 2006). Já o indireto, há pesquisa de resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, podendo ser humoral (produção de anticorpos circulantes) ou celular (mediada por linfócitos e macrófagos) (MEDEIROS et al., 2010; SOUZA, 2012).

Vários procedimentos estão disponíveis e consistem em avanços para o diagnóstico e o controle da TB bovina. Nesse contexto, estão os ensaios *ante mortem* como o exame clínico, o exame baciloscópico, o teste intradérmico, os testes sorológicos e o ensaio celular baseado na quantificação de IFN-γ. Já os ensaios *post mortem* são a inspeção rigorosa de lesões macroscópicas, a histopatologia das lesões macroscópicas, o isolamento em cultivo, caracterização bioquímica e os métodos moleculares (OIE, 2013; MELO, 2014).

2.5.1 Métodos diretos

O exame clínico em bovinos com TB é difícil, pois os sinais clínicos são limitados. Quando presente, os sinais são fraqueza, anorexia, dispneia, emagrecimento, aumento de linfonodos e tosse, porém não são patognomônicos (OIE, 2013; MELO, 2014). Embora o animal possa apresentar lesões em vários órgãos da cavidade torácica e abdominal, ele pode apresentar evidência somente no estágio terminal (RUGGIERO et al., 2007), o que pode caracterizar uma infecção subclínica.

O diagnóstico anatomopatológico ou exame macroscópico ocorre durante a inspeção sanitária *post mortem*. Em países nos quais as normas de inspeção *post mortem* são rígidas o procedimento seguido apresenta uma alta sensibilidade (FRÁGUAS et al., 2008), tem como critério a detecção da totalidade das lesões suspeitas através de uma inspeção detalhada dos tecidos apropriados. Porém, a presença de muitos processos inflamatórios granulomatosos possui características morfológicas semelhantes às descritas na TB (ROXO, 1997; FURLANETTO et al., 2012). As lesões causadas pelo *M. bovis* geralmente estão localizadas nos linfonodos da cabeça ou cavidade torácica (CORNER et al., 1990), intestinos, fígado, baço, o que nos leva a usar esta avaliação como auxílio no diagnóstico.

Para complementar a inspeção *post mortem* pode ser utilizado o teste histopatológico, com coloração dos tecidos por hematoxilina-eosina (HE). Nódulos caseosos em linfonodos, pulmão e fígado e fragmentos de tecidos com lesões sugestivas de TB podem ser enviados para exame histopatológico. Os métodos histológicos empregados no diagnóstico da tuberculose são rápidos e baratos (RUGGIERO et al., 2007; FURLANETTO et al., 2012), porém apresentam baixa especificidade e sensibilidade (FURLANETTO et al., 2012).

O diagnóstico definitivo da TB é realizado mediante o isolamento e a identificação do agente por métodos bacteriológicos (BRASIL, 2006) a partir de lesões oriundas de animais doentes, leite e sangue. O isolamento requer meios de cultura artificiais, o meio Löwenstein-Jensen e o Stonebrink-Lesslie. O meio de Löwenstein-Jensen é utilizado para o isolamento de *M. tuberculosis* por conter glicerol, mas algumas cepas de *M. bovis*não se desenvolvem em meios com glicerol, sendo utilizado o meio de Stonebrink-Lesslie que utiliza como suprimento o piruvato (GRANGE et al., 1996; MELO, 2014).

O isolamento requer o uso de métodos de descontaminação da amostra e um longo período de incubação, que pode ser de três a cinco semanas de incubação (HAAGSMA, 1995; CASTRO et al., 2009), podendo demorar até mais de 12 semanas (CORNER, 1994). A cultura bacteriológica, apesar de ser “padrão-ouro” precisa de grande quantidade de bacilos viáveis (RUGGIERO et al., 2007; FURLANETTO et al., 2012), demoram muito tempo para o crescimento. Outra dificuldade é a obtenção de amostras *in vivo*, o que torna pouco viável sua utilização rotineira (FRÁGUAS et al., 2008).

Outro método para a visualização do agente etiológico é a baciloscopia que é um método rápido e barato. Amostras frescas de tecidos ou de lavados bronco-alveolares podem ser fixadas em lâmina e coradas pelo método Ziehl-Neelsen para a pesquisa de bacilo álcool ácido resistente (BAAR). Entretanto, a sensibilidade desse método é baixa, pois os bacilos muitas vezes não são visualizados na amostra, mesmo na presença de lesões, é muito difícil em se obter amostras (MEDEIROS et al., 2010; SOUZA, 2012) e, além disso, um resultado positivo sugere tratar-se de micobactéria, não informando a espéciee exigem grandes concentrações de bactérias (cerca de 10^4 ou mais de bacilos por mL) (RUGGIERO et al., 2007).

Procedimentos mais avançados para o diagnóstico de TB estão sendo utilizados para a identificação do agente. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), assim como outros métodos moleculares, podem ser considerados um avanço promissor no diagnóstico rápido da tuberculose, além de apresentar elevadas especificidade e sensibilidade (RUGGIERO et al., 2007).

Além disso, a maior sensibilidade do método pode auxiliar a vigilância de TB em abatedouros, com apenas dois dias de trabalho é possível confirmar o diagnóstico da doença, tempo muito menor quando comparado com o método bacteriológico, podendo ser de até 90 dias (FURLANETTO et al., 2012).Este método é desenvolvido para detectar diretamente o agente em amostras clínicas, identificar o agente isolado e avaliar as variações genéticas dentre a espécie de micobactéria (BRASIL, 2006), contudo, sua complexidade, devido à qualidade do DNA, a escolha correta dos *primers* para amplificar o material e o método de extração adequado (RUGGIERO et al., 2007), o alto custo, acabam sendo as restrições na sua utilização.

A técnica de PCR, assim como outras metodologias moleculares, não substituem os métodos clássicos de isolamento e identificação do agente, porém, tem como objetivo auxiliar as metodologias existentes (FIGUEIREDO, CARVALHO et al., 2010; RUGGIERO et al., 2007).

2.5.2 Métodos indiretos

O diagnóstico intradérmico com tuberculina, que consiste numa reação mediada por células e classificada como reação de hipersensibilidade tardia do tipo IV, e é considerada pela OIE como técnica de referência em programas de controle. Para este teste o antígeno utilizado é o PPD (*Purified Protein Derivative*) obtido de cultura de micobactérias inativadas pelo calor. Existem dois antígenos utilizados para desencadear as reações de hipersensibilidade, o PPD bovino, oriundo de *M. bovis* cepa AN5, e o PPD aviário, proveniente de *M. avium* cepa D4 (BRASIL, 2006).

Os testes alérgicos-cutâneos para a identificação dos animais infectados, reconhecidos como oficiais são: o teste cervical simples (TCS), o teste da prega caudal (TPC), e o teste cervical comparativo (TCC). O TCS é a prova de rotina em animais de pecuária de leite devido à sua boa sensibilidade e se utiliza apenas o PPD bovino por via intradérmica no terço médio da região cervical ou na região escapular, em local anteriormente demarcado por tricotomia (BRASIL, 2006). É medidoa espessura da dobra da pele com o auxílio de um cutímetro no dia da inoculação e após 72 horas. O aumento da espessura da dobra da pele (ΔB) será calculado subtraíndo-se da medida de dobra da pele 72 horas, após a inoculação, a medida da dobra da pele no dia da inoculação (BRASIL, 2006) para verificar a presença de reação ao PPD, caracterizada pela enduração ou inchaço da pele, determinado pelo infiltrado de células mononucleares e formação de edema (NEILL et al., 1994). Os resultados obtidos no TCS são interpretados (TABELA 1) de acordo com o estabelecido pelo Regulamento Técnico do PNCBET (BRASIL, 2006).

Tabela 1: Interpretação do Teste Cervical Simples em bovinos.

	Características da reação			
ΔB (mm)	Sensibilidade	Consistência	Outras	Interpretação
0,0 a 1,9	-	-	-	Negativo
2,0 a 3,9	Pouca dor	Endurecida	Delimitada	Inconclusivo
2,0 a 3,9	Muita dor	Macia	Exsudato, necrose	Positivo
≥ 4,0	-	-	-	Positivo

Fonte: BRASIL, 2006.

O TPC pode ser utilizado como prova de triagem, porém, apenas em animais de pecuária de corte aplicando o PPD bovino na base da cauda do animal, na junção da pele pilosa e da pele glaba (BRASIL, 2006).

OTCC é a prova confirmatória para animais reagentes ao TPC ou ao TCS, todavia também pode ser empregado como única prova diagnóstica em rebanhos com histórico de reações inespecíficas (BRASIL, 2006). O TCC consiste na mensuração comparada das respostas à inoculação intradérmica de PPD bovino e PPD aviário, cuja tuberculina injetada em um animal infectado é fagocitada pelas células de Langerhans, as quais apresentam para as células T de memória. Já as células Th-1 secretam citocinas, entre elas o interferon gama (IFN- γ) ao reconhecerem o antígeno, ativando assim os macrófagos, gerando uma reação de hipersensibilidade tardia, caracterizada pelo aumento do volume e da espessura da pele e pela vermelhidão do local da inoculação.

O aumento da espessura da pele é calculado subtraindo-se a medida da dobra da pele 72 horas após a inoculação, pela medida da primeira mensuração da pele tanto inoculação da tuberculina PPD aviária (ΔA) e a tuberculina PPD bovina (ΔB). A interpretação do TCC (TABELA 2) segue o estabelecido pelo Regulamento Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Tabela 2: Interpretação do Teste Cervical Comparativo em bovinos.

	ΔB-ΔA (mm)	Interpretação
ΔB< 2,0	-	Negativo
ΔB<ΔA	<0	Negativo
ΔB ≥ΔA	0,0 a 1,9	Negativo
ΔB>ΔA	2,0 a 3,9	Inconclusivo
ΔB>ΔA	≥4,0	Positivo

Fonte: BRASIL, 2006.

Os animais reagentes inconclusivos podem a critério do médico veterinário habilitado, serem testados novamente a um teste confirmatório em um intervalo de 60 a 90 dias. Ou eles podem ser considerados positivos e destinado ao abate sanitário em 30 dias em estabelecimento com inspeção oficial junto aos animais positivos (BRASIL, 2006).

Embora seja o teste oficial para auxiliar no controle da TB bovina, o teste intradérmico com PPD apresenta problemas com especificidade e sensibilidade

(MENIN et al., 2013, MELO, 2014).O PPD apresenta problemas de especificidade, que é reduzida já que seu epítopos são compartilhados por várias micobactérias (VELOSO, 2014). O extrato bacteriano (PPD) é uma mistura complexa de proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos nucleicos, sendo muitos desses componentes inclusive, compartilhados por inúmeras espécies de micobactérias, tuberculosa ou não, sendo assim, responsável pela ocorrência de reações inespecíficas nos testes intradérmicos (MONAGHAN et al., 1994, MELO, 2014).

Além da complexidade do PPD, o teste pode ocasionar resultados falso-negativos quando forem realizados em animais em fase final de gestação, ou pós-parto, animais desnutridos, imunossuprimidos devido ao uso inadequado de drogas e também em animais anérgicos (RIVERA et al., 2009; ÁLVAREZ et al., 2012; MELO, 2014). A anergia é a ausência de reatividade cutânea ao PPD bovino em animais previamente sensibilizados, principalmente em animais com infecções avançadas por *M. bovis* (ROXO, 1997; MELO, 2014), repetições dos testes alérgico-cutâneo (DE LA RUA DOMENECH et al., 2006; MELO, 2014) e também associado ao transporte dos animais.

O animal fica dessensibilizado por um período de 60 dias, ou seja, ele fica com a capacidade diminuída de responder a um novo teste. Por isso o prazo do re-teste estabelecido pela Instrução Normativa SDA nº. 06, de 08 de janeiro de 2004, do MAPA (BRASIL, 2006) é de 60 a 90 dias. Contudo, estudo realizado após quatro testes consecutivos com intervalo de 60 dias entre os testes, demonstrou uma diminuição progressiva da magnitude da resposta entre os testes sucessivos, mas somente em relação ao PPD bovino (COAD et al., 2010; MELO, 2014). Concluíram ainda, que a dessensibilização está diretamente relacionada à repetição do teste e à progressão da doença, não pela consequência da severidade patológica da doença, e sim uma diminuição da resposta imune mediada por célula (COAD et al., 2010).

O avanço na erradicação da TB bovina e zoonótica nos países desenvolvidos foram alcançados por meio de testes de tuberculinização, remoção dos reagentes positivos e pasteurização obrigatória do leite. No programa de controle do Brasil, o diagnóstico recomendado é o teste tuberculinização intradérmica, com a intenção de eliminar os animais positivos. No entanto, os testes intradérmicos não são 100% específicos (WOOD et al., 1991, MONHAGAN, 1994; FRÁGUAS et al., 2008) e a ocorrência de reações falso-positivas, com o abate desnecessário do animal, muitas

vezes coloca em risco a credibilidade de todo o programa de controle (FRÁGUAS et al., 2008).

As respostas imunes contra as micobactérias são inicialmente, predominantemente do tipo celular. Desta maneira, as técnicas de diagnóstico indireto devem ser baseadas na medição das respostas de linfócitos T (MEDEIROS et al., 2012). Vários métodos têm sido utilizados para o diagnóstico de TB bovina *in vivo*, tanto nas respostas humoral, quanto celular. Na resposta celular, é notório que os linfócitos B são estimulados a produzir anticorpos apenas em estágios avançados da doença (MEDEIROS et al., 2012).

Neste contexto, os ensaios sorológicos, como o ELISA (*enzyme-lynked immuno sorbent assay*) são considerados ferramentas úteis no diagnóstico da TB bovina (MARASSI et al., 2013). Ele permite um processamento de um elevado número de amostras, em um curto espaço de tempo, possui boa leitura dos resultados, de forma automatizada, tornando assim os resultados mais objetivos (SOARES, 2001; MELO, 2014).

Os ensaios sorológicos buscam mensurar respostas imunológicas diferentes, que se desenvolvem em distintos estágios da infecção (CHAPINAL et al., 2012; MELO, 2014). Já que os anticorpos se desenvolvem em estágios mais avançados da infecção, os testes sorológicos são úteis como métodos complementares aos métodos baseados na resposta celular (RUGGIERO et a., 2007). Assim, a sorologia ajuda a identificar os animais em estágios avançados da doença, animais falsos-negativos e ainda ajuda a quantificar IFN-γ (STRAIN et al., 2011. WHELAN et al., 2011; MELO, 2014).

Embora, dependa do estágio da doença, o ELISA é menos eficiente em casos de fase iniciais da TB, depende da ocorrência de reações cruzadas com outras espécies de micobatérias (MORRISON et al., 2000; SOUZA et al., 2016) edos antígenos utilizados no ensaio (STRAIN et al., 2011; SOUZA et al., 2016). Mas, o teste pode ser utilizado como um exame complementar em animais anérgicos (RUGGIERO et al., 2007), sendo um teste simples, rápido e de fácil execução. Além disso, a utilização em ensaios sorológicos de proteínas combinantes mostra uma estratégia de melhoramento do teste para a obtenção de resultados mais satisfatórios (LIU et al., 2007; SOUZA, 2012) pois são capazes de induzir respostas em diferentes fases de infecção (MEIKLE et al., 2009).

As proteínas utilizadas são as MPB70, MPB83, CFP-10 e ESAT-6. Uma das principais proteínas secretadas pelo *M. bovis* é a proteína MPB70 (WIKER, 2009; SOUZA, 2012). É ela que desencadeia a reposta imune celular e humoral (LIU et al., 2007, SOUZA, 2012). Já a MPB83 é uma lipoproteína que foi isolada de um fluido de cultura de *M. bovis*. A utilização destas proteínas num teste sorológico já foi utilizada para diferenciar tuberculose bovina de paratuberculose em um grupo de bovinos, sendo capaz de diferenciar estas enfermidades (MARASSI et al., 2010; SOUZA, 2012).

Outras proteínas que estão sendo pesquisadas são a ESAT-6 e CFP-10. Elas estão ausente no *M. bovis* BCG, nas micobactérias ambientais e presente na *M. bovis* virulento e na *M. tuberculosis* (WATER et al., 2006; SOUZA, 2012). E ainda, a ESAT-6 tem grande capacidade de gerar uma resposta imune celular e humoral, e sua utilização em um teste sorológico, garantiu sensibilidade de 98,6% e especificidade de 98,5% (KOO et al., 2005; SOUZA, 2012).

O teste de quantificação de interferon gama (IFN-γ) avalia a produção de IFN-γ em resposta linfoproliferativa específicas contra PPD de *M. bovis.* Isso se dá através da incubação de sangue de bovinos com os PPD bovino e aviário durante 12 horas, entre 37 e 39º C, seguido da utilização de plasma para a execução de ELISA de captura, com anticorpo monoclonal anti-IFN-γ para a mensuração dos níveis de citocina. O teste é baseado no fato de que os animais infectados produzem linfócitos T de memória, os quais respondem rápido à estimulação *in vitro* com o PPD, produzindo assim, grande quantidade de IFN-γ (WOOD& JONES, 2001; MELO, 2014).

O ensaio de quantificação de INF-γ tem sido utilizado para o diagnóstico do estágio inicial da TB bovina, que é dominada por resposta imune celular (POLLOCK& NEILL, 2002; MELO, 2014), ou em regiões com alta prevalência da TB bovina. Também pode ser utilizado como teste de triagem do rebanho em situações epidemiológicas específicas, para definir o *status* da doença, e para complementar o diagnóstico de animais negativos ou inconclusivos no TCC (STRAIN et al., 2011; MELO, 2014).

Em comparação ao teste tuberculínico, o teste de IFN-γ apresenta uma vantagem, como a possibilidade de repetição do teste quando necessário, sem aguardar 60 a 90 dias como no teste tuberculínico, não altera o estado imunológico do animal (RIVERA et al., 2009; MELO, 2014), e ainda, apresenta grande acurácia

na leitura dos resultados. Porém o emprego do teste oferece algumas restrições, como o custo elevado dos kits comerciais, o tempo restrito para o processamento das amostras de sangue, a execução do teste e a possibilidade da ocorrência de falsos-positivos devido à reação cruzada com micobactérias ambientais (KANTOR& RITACCO, 1994; MELO, 2014).

2.6 Importância econômica

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O país possui o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. Além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países.

Recentemente com o controle mundial da febre aftosa espera-se que a TB e a brucelose bovina sejam as próximas doenças a serem consideradas barreiras sanitárias internacionais (LÔBO, 2008). Este fato é corroborado pela restrição imposta pela União Aduaneira onde propriedades com animais positivos não podem ser comercializados para este mercado (BRASIL, 2012).

A TB por ser uma doença crônica e causa reduzida mortalidade, logo não percebida pelos produtores, torna-se complicado calcular os prejuízos causados por ela. Além disso, quando é percebida pelos produtores, a doença já está difundida no rebanho e os prejuízos ainda são maiores (LEITE, 2012). A enfermidade apresenta custos para a produção pecuária. As perdas mais prováveis são as seguintes segundo Veloso (2014): índice de crescimento mais lento e perda de peso em animais adultos; redução no apetite e na eficiência de conversão alimentar; redução na produção de leite; rejeição parcial ou total da carcaça; e redução do tempo de vida produtiva das vacas leiteiras devido ao abate involuntário.

Por fim, ocasiona perda de prestígio dos rebanhos acometidos, por tornar seus produtos sujeitos a restrições comerciais de ordem sanitária com diminuição da competitividade, inclusive no comércio internacional (LÔBO, 2008). Os prejuízos anuais estimados, no mundo, são da ordem de três milhões de dólares (GARNIER et al., 2003; SOUZA, 2012).

2.7 Importância em Saúde Pública

A TB bovina é importante não apenas devido aos prejuízos econômicos que ela ocasiona, mas também pelo fato de ser uma fonte de infecção para os seres humanos (ACHA & SZYFRES, 2003; MURAKAMI et al., 2009). Por ser tratar de uma zoonose, suspeita-se que a infecção pelo *M. bovis* seja responsável por mais de quatro mil de aproximadamente 100 mil casos de TB humana descritos atualmente no Brasil (LEITE et al., 2003; MURAKAMI et al., 2009).

A TB humana é atualmente uma das doenças infecciosas mais disseminadas em nível mundial e a mais importante causa de morte em adultos no mundo (DIAS, 2012), e os seres humanos parecem ser tão susceptíveis a *M. bovis* quanto a *M. tuberculosis* (HUCHZERMEYER et al., 1994; MURAKAMI et al., 2009). O *M. Tuberculosis* é o agente mais comum em casos humanos, mas apesar disso, uma proporção de casos é devida ao *M. bovis* (SÁ, FERREIRA, 2007; DIAS, 2012), que tem seu caráter zoonótico, tendo como principais grupos de risco os tratadores de rebanhos infectados e os trabalhadores da indústria de carnes (BRASIL, 2006).

Outra forma de manifestação da TB bovina em humanos é o acometimento cutâneo, em que a contaminação se dá pelo contato direto com carcaças contaminadas. Essa manifestação benigna são lesões pouco extensas e regressivas, manifesta-se no formato de pequenas pápulas, parecido com verrugas, chamadas de "*butcher'swart*" ou verruga do magarefe (GRANGE & YATES, 1994, DIAS, 2012), também encontrada em mãos de patologistas que praticam autópsias sem a utilização de luvas, sendo neste caso, causadas pelo bacilo humano (DIAS, 2012).

3 Artigo

Uso de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina

Tássia Gomes Guimarães, Alessandra Jacomelli Teles, Ângela Faccin, Luiz Filipe Damé Schuch

Submetido à revista Science And Animal Health

USO DE MÉTODOS COMPLEMENTARES PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE BOVINA

GUIMARÃES, Tássia Gomes[1];
TELES, Alessandra Jacomelli[2];
FACCIN, Ângela[2];
SCHUCH, Luiz Filipe Damé[3]

[1]MV.,Especialista em Saúde Coletiva, Mestranda do Programa de Pós Graduação em Veterinária – UFPEL
[2]MV, MSc., Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Veterinária – UFPEL
[3]Dr. Prof. do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária – UFPEL

RESUMO

A tuberculose bovina é uma importante doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium bovis*, considerada tanto um problema na saúde pública quanto nas perdas econômicas que ela gera. O programa de controle e erradicação é baseado no diagnóstico através dos testes intradérmicos no animal vivo e abate dos positivos. Este trabalho teve como objetivo a comparação de métodos de diagnóstico para a tuberculose bovina em bovinos reagentes à tuberculinização. Foi realizado exame macroscópico, caracterização histopatológica, cultivo microbiológico, identificação de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR), identificação molecular e sorológica. Um total de 28 bovinos foi abatida em matadouros- frigorífico sob serviço de inspeção estadual no estado do Rio Grande do Sul. As amostras de sangue foram colhidas momento antes da aplicação da tuberculina, durante a realização do teste intradérmico. Já as amostras de tecidos com ou sem lesão macroscópica sugestiva de tuberculose, foram coletadas no momento do abate. Na avaliação macroscópica, 14 animais (50%) apresentaram lesão sugestiva de tuberculose. Na avaliação histológica 12 amostras (42,86%) apresentaram lesão granulomatosa característica. No cultivo microbiológico, 15 amostras (53,57%) cresceram no meio de cultura de Stornebrink, e nove amostras (32,14%) no meio 7H9. A identificação de BAAR só foi possível em sete amostras (25%). Já a identificação molecular foi vista em seis amostras (21,42%) e a sorológica em 26 amostras (92,85%). O exame macroscópico detalhado, associado a utilização do ensaio sorológico e

juntamente com o exame histopatológico contribui tanto para o diagnóstico da tuberculose quanto para o sucesso de um plano de controle e erradicação.

Palavras-chave: Exame macroscópico. Histopatologia. Bacteriologia. PCR. ELISA.

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (TB) é uma zoonose de ocorrência mundial, porém ocorre principalmente em países em desenvolvimento (RUGGIERO et al., 2007). De evolução crônica com efeito debilitante e causada pelo *Mycobacterium bovis*, e determina prejuízos à pecuária e risco à saúde da população que consome produtos de origem animal (LILENBAUM, 2000; FRÁGUAS et al., 2008).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) tem como objetivo principal baixar a prevalência e a incidência destas enfermidades. Nele, o diagnóstico recomendado é o teste tuberculinização intradérmica, com a intenção de eliminar os animais positivos. No entanto, os testes intradérmicos não são 100% específicos (WOOD et al., 1991, MONHAGAN, 1994; FRÁGUAS et al., 2008), e a ocorrência de reações falso-positivas, aliado o abate desnecessário do animal coloca muitas vezes em risco a credibilidade de todo programa de controle (SOUZA et al., 2016).

Para que um programa de controle funcione, ele tem que permitir uma rápida decisão e para isso é imprescindível uma rede laboratorial que disponibilize o suporte técnico e um diagnóstico rápido, específico e sensível (RUGGIERO et al., 2007). Porém, vários métodos bacteriológicos foram desenvolvidos, mas não podem ser utilizados isoladamente, para um resultado eficaz e completo (COSIVI et al., 1998; RUGGIERO et al., 2007), sendo necessário a utilização de técnicas complementares.

Os métodos histológicos empregados no diagnóstico da tuberculose são rápidos e baratos (RUGGIERO et al., 2007; FURLANETTO et al., 2012), porém apresentam baixa especificidade e sensibilidade (FURLANETTO et al., 2012). A cultura bacteriológica, apesar de ser “padrão-ouro” precisa de grande quantidade de bacilos viáveis (RUGGIERO et al., 2007; FURLANETTO et al., 2012) que demoram muito tempo para o crescimento.

Já o ensaio de ELISA (*enzyme-lynked immuno sorbent assay*) pode ser utilizado como um exame complementar em animais anérgicos (RUGGIERO et al., 2007), sendo um teste simples, rápido e de fácil execução. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), assim como outros métodos moleculares, podem ser consideradas um avanço promissor no diagnóstico rápido da tuberculose, além de apresentar elevadas especificidade e sensibilidade (RUGGIERO et al., 2007).

Apesar do desenvolvimento de diversos métodos de diagnósticos, nenhum deles pode ser empregado de forma isolada. Assim, há a necessidade do uso de técnicas complementares para um diagnóstico mais eficaz e completo (RUGGIERO et al., 2007). Sendo assim, objetivou-se a comparação de diferentes métodos complementares de diagnósticos da tuberculose bovina em animais naturalmente infectados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram estudados 28 bovinos encaminhados ao abate sanitário em matadouro localizado no estado do Rio Grande do Sul. O grupo de animais estudados se caracterizou por bovinos leiteiros, fêmeas, a maioria com idade superior a 48 meses de uma mesma propriedade de exploração leiteira de um município localizado na região norte do estado do Rio Grande do Sul. Foram realizados em todos os animais a provade tuberculinização intradérmica comparativa, realizada por médicos veterinários habilitados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e conforme recomendações do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Amostra de sangue

De todos os animais foram colhidos amostra de sangue sem anticolagulante, antes da aplicação da tuberculina no momento do teste intradérmico. Os tubos com sangue foram identificados, centrifugados e então o soro foi armazenado em alíquotas de dois mL em tubos tipo *eppendorf* a -20°C para posterior realização da prova sorológica (ELISA).

Amostras de tecido

Durante a inspeção macroscópica conforme o regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (BRASIL, 1952), foram colhidas amostras de tecidos, principalmente de linfonodos retrofaríngeos e traqueobrônquicos, fígado e pulmão. As amostras eram colhidas independentemente de apresentarem lesão macroscópica sugestiva de tuberculose. As amostras foram divididas em duas frações, sendo uma armazenada em um frasco contendo formol tamponado a 10%, para realização de exame histopatológico, e a outra congelada a -20°C até o momento do processamento bacteriológico conforme recomendação descrita no Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 2005).

Testes diagnóstico

1. Exame Histológico

As frações de tecido destinadas ao exame histológico foram clivadas e processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina, e empregadas a coloração de hematoxilina-eosina (HE) e Ziehl-Neelsen (ZN) no laboratório de patologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

2. Baciloscopia e Bacteriologia

As amostras de tecidos destinadas ao exame bacteriológico foram manipuladas de acordo com Manual de Bacteriologia da Tuberculose (BRASIL, 2005), encaminhada ao Laboratório de Micobactérias da Fundação Universidade Federal de Rio Grande (FURG). As amostras eram colocadas em placas de petri estéreis para a maceração do tecido com auxílio de uma lâmina de bisturi. Após a maceração, foi coletado uma amostra com um suabe que posteriormente foi feito um esfregaço em lâmina simples de microscopia na qual foi corada pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) para evidenciar a presença de Bacilo Álcool Ácido Resistente (BAAR) sob microscopia comum, de acordo com as recomendações do manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose (BRASIL, 2008). Após, os suabes foram submetidos à descontaminação pelo método de Petroff modificado e a semeadura em meio líquido (7H9 de Middlebrook enriquecido com ácido pirúvico e OADC) e em meio

Stornebrink (Lowestein-Jensen com ácido pirúvico), incubadas em estufa a 37°C e foram observadas uma vez por semana, durante 12 semanas.

3. Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular foi realizado pela técnica da PCR. A extração do molecular do isolado da cultura foi feito de modo adaptado por Meikle et al. (2007). Os isolados foram testados por meio da PCR, utilizando oligonucleotídeos para amplificação das sequências genômicas RvD1-Rv2031c e IS6110, específico para *M. bovis* e para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. O DNA das colônias isoladas foi extraído através da lise térmica (100° C por 10 minutos) e amplificado por PCR. A análise dos produtos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com o corante SYBR® Safe gel stain 10.000X (Invitrogen).

4. Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico foi realizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Corte, Campo Grande. Foi realizado o ensaio ELISA com antígeno quimera recombinante, utilizando as proteínas recombinantes MPB70, MPB83 e ESAT-6. A interpretação dos resultados foi determinada pela relação da absorbância da amostra/positivo (A/P). As amostras com relação A/P inferior a 0,3 foram consideradas negativas, já a relação igual ou superior a 0,3 foram consideradas positivas para anticorpos contra *M. bovis* (WARTERS et al., 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de diferentes técnicas complementares no diagnóstico da TB bovina podem ser observados na tabela 1. Através da inspeção sanitária foi verificada que das 28 carcaças avaliadas, 14 (50%) apresentaram algum tipo de lesão macroscópica sugestiva de tuberculose. Os tecidos que tiveram a maior ocorrência de lesão (figura 1) foram o fígado (13/28), o linfonodo traqueobrônquico (6/28), o pulmão e o linfonodo submandibular (5/28). As lesões observadas foram nódulos granulomatosos de aspecto

purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa, e em alguns casos ainda foi observado calcificação no interior da lesão.

Tabela 1: Resultado dos testes diagnósticos realizado em 28 bovinos reagentes no teste cervical comparativo.

	TCC*			Bacteriologia				
Amostra	Δ*	Macroscopia	Microscopia	7H9	Stornebrink	BK**	PCR	ELISA
1	4,5	+	+	-	-	-	-	+
23	8	+	-	+	-	-	-	-
25	7,9	+	+	-	-	-	-	+
44	4	+	-	+	+	+	-	+
52	4,5	-	-	-	+	-	-	+
60	6,2	-	-	+	+	-	-	+
77	5,1	-	-	+	+	-	-	+
91	4,2	-	+	-	-	-	-	-
97	4,9	+	+	+	-	-	-	+
104	6,1	-	-	-	-	-	-	+
108	12,2	+	+	+	+	+	+	+
110	>30	+	+	+	+	+	+	+
112	6,2	-	-	-	-	-	-	+
118	4,3	+	-	-	-	-	-	+
127	7,8	+	-	-	-	-	-	+
128	4,2	-	-	-	+	-	-	+
140	5,3	-	-	-	+	-	-	+
143	8,1	+	-	-	+	-	-	+
157	10,4	-	+	-	+	+	+	+
163	18,8	+	+	+	+	+	+	+
173	19,4	-	-	-	-	-	-	+
176	4,7	-	-	-	-	-	-	+
181	>30	+	+	-	-	-	-	+
184	4,2	-	-	+	+	+	+	+
356	4,9	-	-	-	-	-	-	+
370	4	-	+	-	+	+	+	+
371	4,6	+	+	-	+	-	-	+
590	5,5	+	+	-	+	-	-	+

*TCC: Teste Cervical Comparativo, resultado (Δ) obtido através da subtração da medida da dobra da pele 72 horas, após inoculação, a medida da pele no dia da inoculação.
**BK: Exame baciloscópico

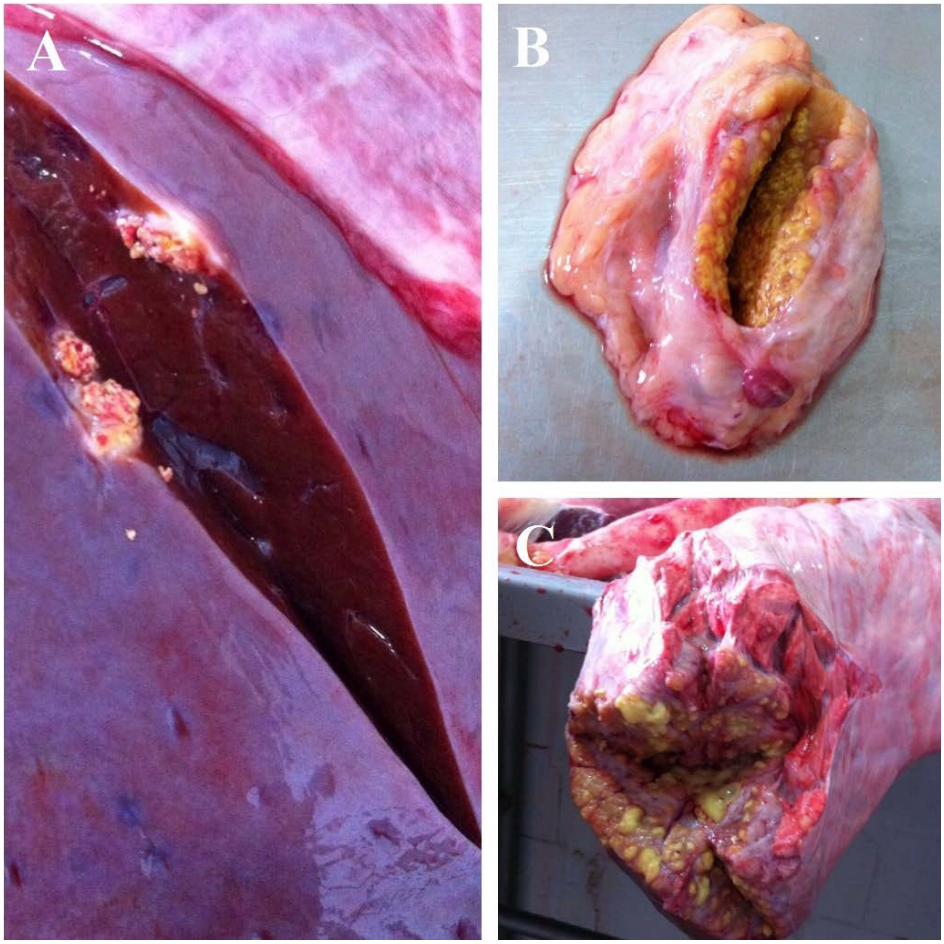

Figura 1: Lesões nodulares típicas de tuberculose em órgãos de bovinos reagentes no teste cervical comparativo. (A) Fígado apresentando lesões nodulares de 1 a 2 cm de diâmetro. (B) Linfonodo traqueobrônquico com processo inflamatório. (C) Pulmão com processo inflamatório granulomatoso contendo exsudato de aspecto caseoso a purulento em seu interior.

A sensibilidade encontrada semelhante à encontrada por Pinto et al. (2004) que foi observado lesões em 44% dos animais positivos durante a necropsia, porém foi inferior à encontrada por um estudo feito por Fráguas et al. (2008) que observou 72,16% das carcaças com lesão macroscópica e por Menin et al. (2013) que observou 95,2% desses bovinos apresentavam lesões visíveis graves, associada a TB. A macroscopia pode ser um método de alta sensibilidade se a inspeção visual for bem realizada, de forma minuciosa durante o abate sanitário, principalmente ser a inspeção for mais detalhada em linfonodos da cabeça, torácicos e mesentéricos, e ainda o baço, rim, úbere e regiões genitais (CORNER, 1994). Porém, a classificação das lesões pode ser subjetiva, pois muitos processos inflamatórios granulomatosos apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para TB.

Em 14 (14/28) animais positivos no teste tuberculínico não foi observada nenhuma lesão sugestiva a TB bovina, o que pode ocorrer devido ao estágio inicial da doença, contato com outras micobactérias, quantidade pequena de bacilos no tubérculo, vacas em final da gestação, presença de impurezas na tuberculina utilizada, infecções intercorrentes com bactérias pseudotuberculosas (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) (TRYLICH, 1960; SOUZA et al., 1999; SOUZA et al., 2016) e até mesmo o tempo destinado para a inspeção sanitária que pode ter sido insuficiente para o exame mais detalhado (CORNER, 1994),uma vez que 58% dos animais infectados apresentam apenas uma única lesão (CORNER et al., 1990; FRÁGUAS et al., 2008).

Foram verificados nos achados histológicos corados em HE que nas 12 amostras coletadas das 28 carcaças, apresentaram ao corte histológico áreas multifocais de necrose caseosa circundadas por infiltrado inflamatório de células epitelioides, macrófagos, linfócitos e células gigantes de Langhans, e no centro, calcificação. Foram encontradas em sua maioria das vezes em linfonodos traqueobrônquicos (22,22%), seguidos pelo fígado (18,52%) e pulmão (14,81%). Das 14 lesões verificadas pela inspeção como sugestivas de tuberculose, nove (9/14) foram confirmadas pela microscopia. O resultado foi superior ao encontrado por Pinto et al. (2004) que a sensibilidade foi de 18% e estudos feito por Souza et al. (2016) que encontrou 32,5%. No entanto, era o que se imaginava encontrar, uma vez que as totalidades dos animais no nosso estudo eram reativos ao teste intradérmico e oriundos de um rebanho naturalmente infectado. Já em cinco (5/14) animais as lesões macroscópicas semelhantes à tuberculose não foram confirmadas no exame histológico. O que pode ser explicado pela presença de processos inflamatórios granulomatosos de outras etiologias, com características macroscópicas bem semelhantes à TB, tais como linfossarcoma, linfadenites inespecíficas, nocardiose e actinobacilose (REIS et al., 1995, ROXO, 1997, SOUZA et al., 2016).

As amostras teciduais coletadas dos bovinos foram cultivadas e apenas 15 (15/28) amostras foram isoladas no meio de cultura de Stonebrink, e nove (9/28) amostras no meio 7H9. Os isolados provenientes de tecidos com lesões sugestivas de TB apresentaram colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo-pálida, com bordas irregulares e superfície granular, característico de micobactérias.

A baixa sensibilidade do isolamento do agente já foi descrita por Pinto et al. (2002), devido a ausência de micobactérias nas lesões. Isso se deve ao fato da deficiência do método de

isolamento devido à descontaminação; dificuldade de se multiplicar no cultivo; morte da micobactéria após promover a lesão devido à própria defesa do organismo e até mesmo a lesão causada por outro microrganismo.

Foi observada em apenas sete (7/28) amostras a presença de BAAR pela coloração de ZN. Dessas, quatro apresentavam lesões compatíveis com TB durante a inspeção visual. Este índice foi inferior ao encontrado por Pinto et al. (2004), Fráguas et al. (2008), porém foi superior ao encontrado por Souza et al. (2016). A técnica é considerada um exame rotineiro em casos de TB humana, porém não é tão sensível no diagnóstico da TB bovina, pois os bacilos nem sempre são observados na amostra, mesmo com a presença de lesões compatíveis à TB devido à pequena quantidade de bacilos na lesão (ANDRADE RIET-CORREA E MIEKLE, 1991; TABOSA et al., 2000; FRÁGUAS et al., 2008).

O fragmento de 500 pb específico de *M. bovis* foi observado em seis (21,42%) amostras de DNA obtida através do isolamento do agente (figura 2). O que diverge dos resultados encontrados na literatura que reportam a sensibilidade baixa. Estudo realizado por Furlanettoet al. (2012) encontrou sensibilidade de 7%, resultado condizente com outros estudos. Souza et al. (2016) observou sensibilidade de 2,5% do fragmento 500 pb, obtida do muco nasal. O fato de ter sido encontrado uma maior sensibilidade em nosso estudo, pode ser devida procedência da amostra. No presente estudo, a presença do DNA foi obtida através do isolamento bacteriano, já no estudo realizado por Souza et al. (2016) utilizou-se muco nasal, o que pode ter pequena quantidade de bacilos na amostra, conforme já relatada em outros estudos (DE KANTOR; ROSWURM, 1978; SOUZA et al., 2016).

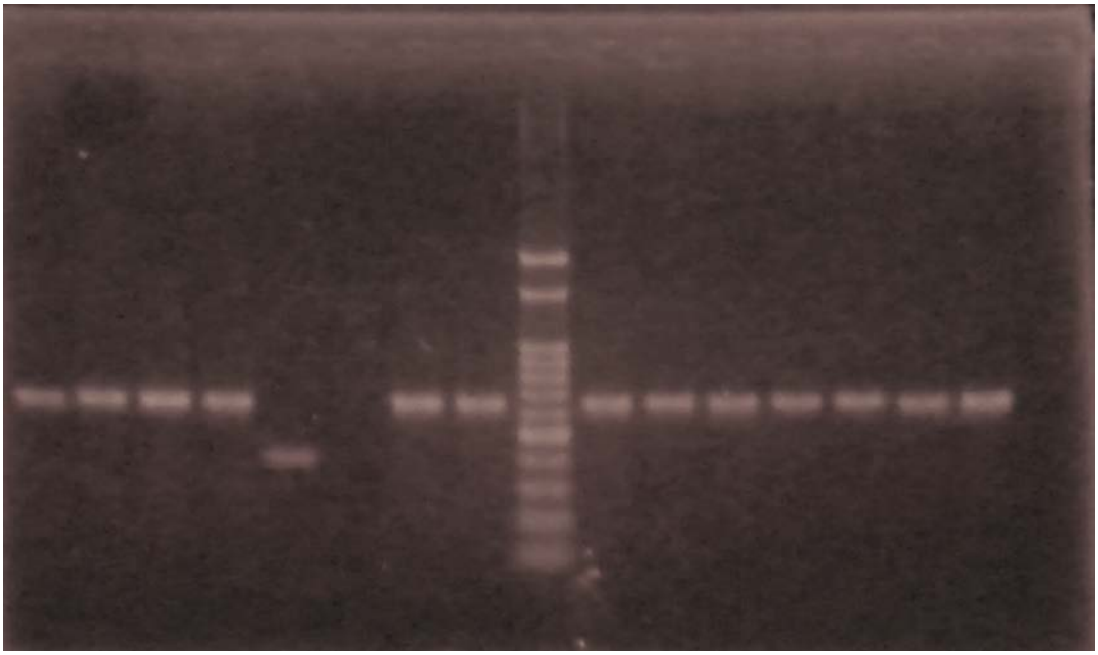

Figura 2: Detecção de DNA de *Mycobacterium bovis* por PCR dos isolados bacterianos. DNA extraído de 13 isolados bacterianos.

Entre as 28 amostras de soro analisadas pela técnica de ELISA, 26 (26/28) foram considerados positivos, com valor de densidade óptica superior a 0,3 na relação A/P. O emprego de um teste sorológico que utiliza uma combinação de proteínas, como foi realizado neste estudo, possibilitou um resultado satisfatório. Estudo que utilizou testes comerciais, teve a sensibilidade de 2,5% (SOUZA et al., 2016), justificando que os testes sorológicos tem problemas de sensibilidade e especificidade que variam em função dos antígenos empregados no ensaio. Desse modo, a utilização de proteínas recombinantes para serem utilizadas nos testes complementares pode ser uma útil ferramenta para o sucesso do diagnóstico da TB bovina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como não existe apenas um método *ante* ou *post mortem* com eficácia absoluta na detecção do *M. bovis,* é recomendado que seja utilizado mais de um método para o diagnóstico da TB bovina.

A utilização de proteínas recombinantes nos ensaios sorológicos pode contribuir tanto para o diagnóstico da TB bovina, quanto para o sucesso do PNCEBT. E ainda, a realização da

inspeção macroscópica mais detalhada é uma ferramenta imprescindível na vigilância em abatedouros, juntamente com o exame histopatológico, pois auxilia a confirmação da presença da lesão granulomatosa.

Além disso, a técnica de PCR também poderá ser utilizada, pois além de ser uma técnica confirmatória e específica, ela é rápida, tempo muito inferior ao do método bacteriológico. Assim, a associação de diferentes métodos pode garantir a confiabilidade no diagnóstico e a redução das perdas econômicas relativas a essa enfermidade.

USE OF COMPLEMENTARY METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is an important infectious disease caused by *Mycobacterium bovis*, considered both a public health problem and the economic losses it causes. The control and eradication program is based on the diagnosis through intradermal tests in the live animal and slaughter of the positive ones. This study aimed to compare diagnostic methods for bovine tuberculosis. Macroscopic examination, histopathological characterization, microbiological culture, identification of acid-fast bacilli (AFB), molecular and serological identification were performed. A total of 28 tuberculin-resistant test animals were slaughtered in a slaughter house understate inspection in the state of Rio Grande do Sul. Blood samples were taken before tuberculin application during the intradermal test. On the other hand, tissue samples with or without macroscopic lesion suggestive of tuberculosis were collectedat the time of slaughter. In the macroscopic evaluation, 14 animals (50%) presented lesions suggestive of tuberculosis. In the histological evaluation, 12 samples (42.86%) had a characteristic granulomatous lesion. In the microbiological culture, 15 samples (53.57%) were grown in the Stornebrink culture medium, and 9 samples (32.14%) in the 7H9 medium. The identification of BAAR was only possible in 7 samples (25%). Already the molecular identification was seen in 6 samples (21.42%) and the serological in 26 samples (92.85%). Detailed macroscopic examination associated with the use of the

serological test and together with the examination with the histopathological examination contributes both to the diagnosis of tuberculosis and to the success of a control and eradication plan.

Keywords: Macroscopic. Histopathology. Bacteriology. PCR. ELISA

USO DE MÉTODOS COMPLEMENTARIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una importante enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium bovis*, considerada tanto un problema em la salud pública como em lãs pérdidas económicas que genera. El programa de control y erradicación se basa em el diagnóstico a través de lãs pruebas intradérmicas em el animal vivo y El sacrificio de los positivos. Este trabajo tuvo como objetivo La comparación de métodos de diagnóstico para la tuberculosis bovina. Se realizo un examen macroscópico, caracterización histopatológica cultivo microbiológico, identificación de bacilos alcohol-ácidos resistentes (BAAR), identificación molecular y serológica. Un total de 28 bovinos reactivos a prueba de tuberculinización fue abatida em mataderos-nevera bajo servicio de inspección estatal em el estado de Rio Grande do Sul. Las muestras de sangre fueron tomadas antes de la aplicación de la tuberculina durante la realización de la prueba intradérmica. Las muestras de tejidos con o sin lesión macroscópica sugestiva de tuberculosis, fueron recogidas em el momento del sacrificio. Em la evaluación macroscópica, 14 animales (50%) presentaron lesión sugestiva de tuberculosis. Em la evaluación histológica 12 muestras (42,86%) presentaron lesión granulomatosa característica. Em el cultivo microbiológico, 15 muestras (53,57%) crecieron em medio de cultivo de Stornebrink, y 9 muestras (32,14%) em el medio 7H9. La identificación de BAAR solo fue posibleen 7 muestras (25%). La identificación molecular fue vista em 6 estras (21,42%) y la serológica en 26 muestras (92,85%). El examen macroscópico detallado, asociado a lautilización del ensayo serológico y junto com el examen

histopatológico, contribuye tanto al diagnóstico de la tuberculosis y al éxito de un plan de control y erradicación.

Palabras clave: Macroscópico. Histopatología. Bacteriología. PCR. ELISA

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília. 154p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3ed. Rio de Janeiro, 2005. 240p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): Manual técnico.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2006. 184p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Ministério da Saúde, Brasília, 2008. 436p.

CORNER, L. A. *Post mortem*diagnosisof*Mycobacterium bovis*infection in cattle. **VeterinaryMicrobiology**, v.1, n.40, p.53-63, 1994.

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

FURLANETTO, L. V.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE JÚNIOR, C. A.; CARVALHO, R. C. T.; SILVA, F. G. S.; SILVA, J. T.; LILENBAUM, W.; PASCHOALIN, V. M. F. Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.11, p.1138-44, 2012.

MEIKLE, V.; SCHNEIDER, M.; AZENZO, G.; ZUMARRAGA, M.; MAGNANO, G.; CATALDI, A. Individual animals of a cattle herd infected with the same *Mycobacterium bovis* genotype shows importante variations in bacteriological, histopathological and imune response parameters. **Zoonoses And Public Health**, v.54, n.2, p.86-93, 2007.

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

PINTO, P. S. A.; VILORIA, M. I. V.; BEVILACQUA, P. D. Avaliação do desempenho dos exames anatomopatológico e histopatológico na inspeção *post mortem* de bovinos suspeitos ou reagentes à prova de tuberculinização. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.1, n.11, p.27-31, 2012.

SOUZA, M. A.; BOMBONATO, N. G.; SOARES, P. M.; RAMOS, G. B.; CASTRO, I. P.; MEDEIROS, A. A.; LIMA, A. M. C. Exames complementares no diagnóstico da tuberculose em bovinos reagentes à tuberculinização comparada**. Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p.1-8, 2016.

WATERS, W. R.; BUDDLE, B. M.; VORDERMEIER, H. M.; GORMLEY, E.; PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; BANNANTINE, J. P.; SATBEL, J. R.; LINSCOTT, R.; MARTEL, E.; MILIAN, F.; FOSHAUG, W.; LAWRENCE, J. C. Development and evaluation of na enzyme-linked immune sorbent assay for use um the detection of bovine tuberculosis in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.11, n.18, p.1882-88, 2011.

4 Considerações Finais

Observa-se que é recomendado que se utilize mais de um método para o diagnóstico da TB bovina, devido a ausência de apenas um método *ante* ou *postmortem* com eficácia absoluta na detecção do *M. bovis*. A associação de diferentes métodos de detecção pode garantir a credibilidade no diagnóstico da TB bovina.

A realização de uma inspeção macroscópica detalhada é de extrema importância na vigilância em abatedouros, juntamente com o exame microscópico, na detecção da presença da lesão granulomatosa. Já o uso de proteínas recombinantes em ensaios sorológico pode contribuir para o sucesso do PNCEBT, quanto para o diagnóstico da TB bovina.

Uma ferramenta rápida que pode ser associada também é a técnica de PCR, sendo uma técnica confirmatória e específica. Sendo assim, a utilização de diferentes técnicas podem garantir o diagnóstico da TB bovina e reduzir as perdas econômicas associadas a essa enfermidade.

Referências

ACHA, P. N.; SYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2ª Ed. Publicación Científica No. 503. 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.** Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília. 154p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3ed. Rio de Janeiro, 2005. 240p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): Manual técnico**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2006. 184p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias**. Ministério da Saúde, Brasília, 2008. 436p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Norma Interna SDA 02/2012**. Brasília, 2012. 04p.

CASTRO, K. G.; LIEVORE, J. P. M.; CARVALHO, G. D. Tuberculose bovina: diagnóstico, controle e profilaxia. **Pubvet**, v.3, n.30, 2009.

COAD, M.; CLIFFORD, D.; RHODES, S. G.; HEWINSON, R. G.; VORDERMEIER, H. M.; WHELAN, A. O. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associatedwith elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1beta responses. **Veterinary Research**, v.41, n.2, p.1-12, 2010.

CORNER, L. A.; MELVILLE, L.; McCUBBIN, K.; SMALL, K. J.; McCORNICK, B. S.; ROTHEL, J. S. Efficiency of inspection procedures for detection of tuberculous lesions in cattle. **Australian Veterinary Journal,** v.67, n.3, p.389-392, 1990.

DIAS, I. C. L. Prevenção de zoonoses ocupacionais em abatedouros de bovinos. **Vivências**, v.8, n.15, p.89-98, 2012.

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

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

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

HADDAD, N.; MASSELOT, M.; DURAND, B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. **Researchin Veterinary Science,** v.76, p.1-18, 2004.

LEITE, Bruno Meireles. **Aspectos epidemiológicos e econômicos da certificação de propriedade leiteiras como livres de brucelose e tuberculose bovina**. 2012. 81p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, Distrito Federal. 2012.

LÔBO, José Ricardo. **Análise custo-benefício da certificação de propriedade livres de tuberculose bovina**. 2008. 84p. Dissertação (Mestrado Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal. 2008.

MARASSI, C. D.; MEDEIROS, L.; FIGUEIREDO, E.; FONSECA, L. S.; DUARTE, R.; PASCHOALIN, V.; OELEMANN, W. M. R.; LILENBAUM, W. A multidisciplinary approach to diagnose naturally occurring bovine tuberculosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.1, p.15-20, 2013.

MEDEIROS, L. S.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E. E. S.; LEITE, J.; FERREIRA, A. M. R.; LILENBAUM, W. Assessing the histopathology to depict the different stages of bovine tuberculosis infection in naturally infected herd. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.2, p.135-39, 2012.

MEIKLE, V.; SCHNEIDER, M.; AZENZO, G.; ZUMARRAGA, M.; MAGNANO, G.; CATALDI, A. Individual animals of a cattle herd infected with the same *Mycobacterium bovis* genotype shows importante variations in bacteriological, histopathological and imune response parameters. **Zoonoses And Public Health,** v.54, P.86-93, 2007.

MELO, Elaine Silva de Pádua. **Avaliação do uso de proteínas recombinantes de Mycobacterium bovis como antígenos em teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose bovina**. 2014. 100f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso, Campo Grande. 2014.

MICHEL, A. L.; MULLER, B.; VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface. A problem or not ? **Veterinary Microbiology**, v.140, p.371-81, 2010.

MULLER, B.; DURR, S.; ALONSO, S.; HATTENDORF, J.; LAISSE, C. J. M.; PARSON, S. D. C.; HELDEN, P. D.; ZINSSTAG, J. Zoonotic *Mycobacterium bovis* – Induced. Tuberculosis in Humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.6, p.899-908, 2013.

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

REVIRIEGO GORDEJO, F. J.; VERMEERSCH, J. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. **Veterinary Microbiology**, v.112, n.2-4, p.101-109, 2006.

ROCHA, A. C. F.; FIGUEIREDO, S. C.; ROSALES, C. A. R.; GRISI FILHO, J. H. H.; KEID, L. B.; SOARES, R. M.; FERREIRA NETO, J. S. Molecular discrimination os *Mycobacterium bovis* in São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Disease**, v.13, n.1, p.17-21, 2013.

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

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

SOUZA, Ingrid Ieda Fernando de. **Avaliação de proteínas recombinantes para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* por ELISA**. 2012. 62f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2012.

SOUZA, M. A.; BOMBONATO, N. G.; SOARES, P. M.; RAMOS, G. B.; CASTRO, I. P.; MEDEIROS, A. A.; LIMA, A. M. C. Exames complementares no diagnóstico da tuberculose em bovinos reagentes à tuberculinização comparada. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p.1-8, 2016.

VELOSO, Flávio Pereira. **Prevalência e fatores de risco da tuberculose bovina no Estado de Santa Catarina.** 2014. 31f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, Distrito Federal. 2014.

VENDRAME, Fabiano Benitez. **Situação epidemiológica da tuberculose bovina no estado de Rondônia.** 2013. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

Anexo

UFPel

CEEA

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Pelotas, 04 de abril de 2016

Certificado

Certificamos que após análise das correções realizadas, a proposta intitulada **"Epidemiologia da Tuberculose Bovina nos Assentamentos da Reforma Agrária no Rio Grande do Sul e Análise de Custo"**, registrada com o nº 23110.007807/2015-16, sob a responsabilidade de **Luiz Filipe Damé Schuh** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 21/03/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa ( ) Ensino
Vigência da autorização	05/04/2016 a 30/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Bovina/ Variável
Nº de animais	300
Idade	Variável
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Assentamentos da Reforma Agrária no RS

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à *CEEA*.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 7807-2015**).

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2016

Assinatura do Professor Responsável: _____