

LIDIANE GUABIRABA E SILVA

**ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO E LABORATORIAL DA
TUBERCULOSE BOVINA EM MATADOUROS DO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

**RECIFE
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

LIDIANE GUABIRABA E SILVA

**ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO E LABORATORIAL DA
TUBERCULOSE BOVINA EM MATADOUROS DO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

Co-orientador:

Daniel Friguglietti Brandespim

**RECIFE
2015**

Ficha Catalográfica

S586e Silva, Lidiane Guabiraba e
Estudo anátomo-patológico e laboratorial da tuberculose
bovina em matadouros do Estado de Pernambuco / Lidiane
Guabiraba e Silva. – Recife, 2015.
55 f.: il.

Orientador(a): Lúcio Esmeraldo Honório de Melo.
Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência
Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2015.
Referências.

1. Zoonose 2. Inspeção 3. Matadouro 4. *Post-mortem*
I. Melo, Lúcio Esmeraldo Honório de, orientador II. Título

CDD 636.039

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO E LABORATORIAL DA TUBERCULOSE
BOVINA EM MATADOUROS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Dissertação de Mestrado elaborada por
Lidiane Guabiraba e Silva

Aprovada em 31/08/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Sandra Regina Fonseca de Araújo Valença

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Merilane da Silva Calixto

Universidade Federal de Campina Grande

E mais uma vez, aos meus pais, que nunca mediram esforços para me apoiar e investir na minha educação, sempre buscando o melhor para o meu futuro.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter me proporcionado mais uma experiência cheia de desafios e aprendizado, por não ter desistido de mim quando nem eu mesma mais acreditava ser capaz, sou eternamente grata por estar sempre ao meu lado nas minhas caminhadas. Obrigada!

A minha família, José Guabiraba e Irenise Cordeiro, meus pais, sempre presentes na minha vida e que sei que posso contar sempre que precisar, meus maiores exemplos de amor, dedicação e honestidade; meus irmãos Polliana e Waldiney e cunhada Elize, pelos momentos de apoio, amizade, alegrias e companheirismo; meus sobrinhos Arthur e Heitor, que tornam meus dias mais coloridos e engraçados, Deus não poderia me dar família melhor. Meu muito obrigada, AMO vocês!!

A João Bosco, meu namorado, por sua paciência em escutar minhas reclamações quando as coisas não saiam como eu esperava e incentivo durante toda minha jornada. Você é e sempre será muito especial para mim. Obrigada!

Ao meu orientador, Prof. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo, pela oportunidade e confiança concedidas a mim, pelos conselhos e ensinamentos que com certeza levarei pelo resto de minha jornada, meu muito OBRIGADA.

Aos amigos antigos e novos com os quais compartilhei esses dois anos de pós-graduação, podem ter certeza, aprendi muito com cada um de vocês Mychelle (minha amiga de todas as horas), Wanessa, Thaís, Monica, Kenya, Floriano, Alexandre, Raquel e tantos outros.

Aos amigos de equipe, pois sem eles tudo teria sido mais difícil e menos prazeroso, Daniel, Luan, Otávio, Rummenigge, com os quais dei o ponta pé inicial nos trabalhos e que mesmo longe sempre me ajudaram; a Renatinha, minha companheira de todas as horas (boas e difíceis – e olhe que não foram poucas) por estar ao meu lado nessa jornada, a Tamyres, que foi quem me incentivou a tentar o mestrado e que mesmo a tantos quilômetros de distância sempre me ajudou no que podia; a Luiz e Artur, por sempre se mostrarem a disposição. Meus mais sinceros agradecimentos!

As minhas amigas espalhadas pelo Brasil a fora, mas que sempre se fazem presentes e sei que torcem sempre por mim Patrícia e Fernanda; Ana Paula, por em tão pouco tempo de amizade, sempre foi muito solícita em me ajudar nas horas que precisei.

A todos da UFRPE, que das mais diferentes formas me ajudaram, seja com uma palavra amiga, um conselho, incentivo, tirando minhas dúvidas, escutando minhas lamentações, vibrando com minhas conquistas e acima de tudo fazendo com que eu não desistisse: André Mariano, Ellen, Lúcia, Cláudia, Janaina, Alexandre, Robério, Pollyana, Mayume, Jeferson, estagiários da Clínica de Grandes entre muitos outros.

A todos os colaboradores: a Ana Albertina – que além de uma amiga querida, foi meu anjo da guarda com todo seu carinho e acima de tudo profissionalismo sem igual; ao LANAGRO em nome de Vânia e Irineu que se mostraram dispostos a ajudar; ao

FAMA - prof. Adrião e Diogo pela sua paciência comigo e por me ensinar a pensar sempre positivo e respirar fundo quando as coisas não saíram do jeito que planejamos; a todos da Histologia – Prof. Valdemiro e Simone que contribuíram de forma essencial para os resultados do trabalho; a todos do Laboratório de Bacteriologia – Renata, André, profs. Rinaldo e Leonildo; Laboratório de virose – Luiz Cosme e prof. Rita, sempre muito prestativa. Meu muito obrigada a TODOS!

A todos os veterinários, administradores e profissionais da linha de abate dos matadouros regionais pela disponibilidade, recepção e atenção, mesmo quando isso implicava na mudança da rotina de todos, obrigada por tornarem esse trabalho possível.

A FACEPE pelo apoio financeiro.

“Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes.”

Paulo Freire

RESUMO

A tuberculose bovina é uma enfermidade de evolução crônica e debilitante, que acomete principalmente bovinos e bubalinos, ocasionada por bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo considerada uma zoonose de grande importância à saúde pública, que promove o desenvolvimento progressivo de lesões nodulares denominadas tubérculos, localizadas em diferentes órgãos e tecidos. Responsável por prejuízos diretos e indiretos apresenta uma distribuição mundial, onde a redução dos casos deve-se à adoção de medidas estratégicas, baseadas no sacrifício de animais positivos, implantação de um eficiente processo de pasteurização do leite e na investigação epidemiológica retrospectiva a partir do monitoramento de carcaças de animais com lesões sugestivas de tuberculose em matadouros. No presente estudo foram coletadas amostras biológicas de linfonodos pulmonares, bem como de fragmentos teciduais de pulmão com alterações compatíveis de 141 animais da espécie bovina, abatidos em seis matadouros do Estado de Pernambuco os quais foram submetidos à inspeção *post mortem*; baciloscopia utilizando à técnica de impressão tecidual e coloração de *Ziehl-Neelsen* e histopatologia pelo método de microtomia de parafina, coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina. Um único animal mostrou-se positivo para todos os testes realizados, incluindo o isolamento bacteriológico em meio sólido de OGAWA KUDOH, ao qual foi submetido. Objetivou-se com esse trabalho, realizar um estudo anátomo-patológico e laboratorial da tuberculose bovina em matadouros do Estado de Pernambuco, com intuito que, os dados obtidos sirvam como base para um melhor entendimento do comportamento da tuberculose bovina no Estado e na adoção de estratégias no controle e erradicação da tuberculose zoonótica.

Palavras chave: zoonose, inspeção, matadouro, *post-mortem*.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a disease of chronic and debilitating developments affecting mainly cattle and buffalo, caused by bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* and is considered a zoonosis of great importance to public health, which promotes the progressive development of nodular lesions called tubercles located in different organs and tissues. Responsible for direct and indirect losses has a worldwide distribution, where the reduction in cases is due to the adoption of strategic measures based on the sacrifice of positive animals, implementation of an efficient milk pasteurization process and retrospective epidemiological investigation from monitoring of animal carcasses with lesions suggestive of tuberculosis in slaughterhouses. In the present study biological samples of pulmonary lymph nodes were collected and lung tissue samples with consistent changes of 141 bovine animals slaughtered in six slaughterhouses in the state of Pernambuco who underwent post-mortem inspection; tissue smear using the printing technique and Ziehl-Neelsen and histopathology the paraffin microtome method, stained by hematoxylin and eosin staining techniques. A single animal was positive for all the tests, including bacterial isolation in solid medium OGAWA Kudoh, which has been subjected. The objective of this work, conduct a clinical pathology and laboratory study of bovine tuberculosis in the State of Pernambuco slaughterhouses order that the data obtained serve as the basis for a better understanding of bovine tuberculosis behavior in the state and adoption strategies for the control and eradication of zoonotic tuberculosis.

Key words: zoonosis, inspection, slaughter, post-mortem.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Localização dos municípios das Microrregiões do Recife 01 (Paulista e São Lourenço da Mata), da Mata Setentrional 02 (Itambé e Paudalho) e da Mata Meridional 03 (Escada e Ribeirão), do estado de Pernambuco.	30
Figura 2. Lesões características de tuberculose em fragmento pulmonar bovino.	36
Figura 3. Bacilos álcool-ácido resistentes, observados por microscopia óptica. Aumento de 100X.	37
Figura 4. Imagens de lesões características de tuberculose. Em A, formação de calcificação em fragmento de pulmão (A) obj. 10x; em B, zona de transição entre área de necrose (E) e região cortical e capsular (F), obj. 40x; em C, presença de células gigantes de Langhans, obj. 40x e em D com obj. 100x.	38
Figura 5. Colônias crescidas em meio sólido de OGAWA KUDOH (A); processo de semeadura para o isolamento bacteriológico (B).	39

LISTA DE TABELA

	Pág.
Tabela 1. Origem/ Procedência dos bovinos avaliados no estudo. Recife, 2015.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilos Álcool Ácido Resistentes
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
GTA	Guia de Transporte Animal
HE	Hematoxilina-Eosina
IFN	Interferon
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OIE	World Organisation for Animal Health
OK	Ogawa Kudoh
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCT	Programa de Controle da Tuberculose
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
TCC	Teste Cervical Comparativo
TCS	Teste Cervical Simples
TPC	Teste da Prega Caudal
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 TUBERCULOSE BOVINA E SEU CARÁTER ZONÓTICO	16
2.1.1 ETIOLOGIA	16
2.1.2 DISTRIBUIÇÃO	17
2.1.3 TRANSMISSÃO	17
2.1.4 PATOGENIA	19
2.1.5 SÍNDROME CLÍNICA	21
2.1.6 DIAGNÓSTICO	23
2.1.7 CONTROLE E INSPEÇÃO EM MATADOURO: ASPECTOS IMPORTANTES	26
3. OBJETIVOS	29
3.1 GERAL	29
3.2 ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 AMOSTRAGEM	30
4.2 COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	32
4.3 ANÁLISE BACILOSCÓPICA	32
4.4 CULTIVO BACTERIOLÓGICO	33
4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	34
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina é uma enfermidade de evolução crônica e debilitante, que acomete principalmente bovinos e bubalinos, sendo considerada uma zoonose de grande importância à saúde pública (ABRAHÃO *et al.*, 2005). É ocasionada por bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que promovem o desenvolvimento progressivo de lesões nodulares denominadas tubérculos, as quais podem localizar-se em qualquer órgão ou tecido (PINTO, 2003; BRASIL, 2006). As lesões macroscópicas da tuberculose, geralmente, caracterizam-se por nódulos acinzentados, que contem áreas centrais amareladas, de aspecto caseoso circundada por cápsula esbranquiçada (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

Sua distribuição é de ocorrência mundial, onde países desenvolvidos, com rigorosos programas de controle e erradicação, inspeção de carnes e pasteurização do leite, possuem baixa prevalência, diferente dos países em desenvolvimento, que ainda apresentam alta prevalência (ABRAHÃO, 1998; MELO, 1999). Os prejuízos diretos e indiretos, a perda de prestígio e credibilidade das unidades de criações, onde a doença é constatada, tem sido motivo de grandes perdas econômicas (BRASIL, 2006).

A redução dos casos em bovinos deve-se à adoção de medidas estratégicas, as quais se baseiam no sacrifício de animais positivos, na implantação de um eficiente processo de pasteurização do leite e na investigação epidemiológica retrospectiva a partir do monitoramento de carcaças de animais com lesões sugestivas de tuberculose em matadouros (WEDLOCK *et al.*, 2002). Deve-se ainda, ressaltar a importância da espécie caprina, tanto quanto a bovina, como fator de risco para tuberculose zoonótica, alertando as autoridades na adoção de novas estratégias de controle e erradicação envolvendo a tuberculose caprina, a qual já é uma realidade no Estado de Pernambuco (MELO *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2012).

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser realizado por métodos diretos e indiretos, entre eles estão os diagnósticos: clínicos, anatomopatológico, bacteriológico, alérgico-cutâneo, que são os mais comumente utilizados. No entanto, os avanços da biologia molecular e dos conhecimentos sobre a imunidade contra as micobactérias levaram ao aparecimento de novos métodos para o diagnóstico, entre as quais cabe mencionar a reação em cadeia da polimerase *Polymerase Chain Reaction* (PCR), a prova sorológica ELISA, a prova de gama interferon em cultivos de sangue total, entre outros (BRASIL, 2006). A inspeção de rotina de carcaças em matadouros frigoríficos é importante no diagnóstico das lesões tuberculosas, fundamental como instrumento de sentinela epidemiológica e de

rastreabilidade no combate a tuberculose, porém o tempo destinado pode ser insuficiente, o que dificulta o exame detalhado. Durante o processo de inspeção, só é possível detectar e identificar macroscopicamente cerca de 47% das lesões tuberculosas, chamando a atenção para os casos de tuberculose onde os animais não apresentam lesões macroscópicas detectáveis no exame post mortem (CORNER, 1994; WHIPPLE *et al.* 1996).

A realidade da tuberculose bovina no Brasil, em meio ao comércio clandestino de carne, associada à falta de dados estatísticos confiáveis, torna-se uma grande ameaça à saúde pública (ANTORE, 1998). No Estado de Pernambuco, a prevalência registrada nos catálogos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foi de 5,7% (BRASIL, 2006). Contudo, em estudos realizados por Mendes *et al.* (2008) e por Melo *et al.* (2010), as prevalências encontradas foram de 15,2% e 11,5%, respectivamente, bem superiores às notificadas pelo MAPA.

A tuberculose zoonótica, está muitas vezes associada às atividades profissionais de risco, mais frequente em indivíduos que lidam diretamente com animais infectados ou com produtos provenientes destes, como tratadores, magarefes, veterinários e laboratoristas (RUGGIERO *et al.*, 2007). Nos países em desenvolvimento, os riscos de infecção pelo *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) na população é maior, devido a uma maior exposição dos seres humanos aos animais, principalmente quando se leva em conta a cultura do consumo de leite cru e de produtos lácteos derivados de rebanhos que não possuem controle da tuberculose bovina (BERG *et al.*, 2011). No Brasil, não existem estimativas sobre a proporção de pacientes com tuberculose causada pelo *M. bovis*. No entanto, é de suma importância que o sistema responsável pela saúde da população tenha conhecimento da ocorrência desse evento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Pernambuco ocupa, atualmente, o quarto lugar no Brasil em taxa de incidência de tuberculose e o segundo lugar em mortalidade. Entre as capitais brasileiras, Recife é a terceira em taxa de incidência (dados de 2013) e a primeira em número de óbitos (SES, 2015).

Neste contexto, o objetivo com a elaboração deste trabalho foi realizar um estudo anátomo-patológico e laboratorial da tuberculose bovina em matadouros do Estado de Pernambuco, com intuito de que, os dados obtidos sirvam como base para um melhor entendimento do comportamento da tuberculose bovina no Estado e na adoção de estratégias no controle e erradicação da tuberculose zoonótica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TUBERCULOSE BOVINA E SEU CARÁTER ZONÓTICO

2.1.1 ETIOLOGIA

As bactérias causadoras da tuberculose pertencem à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. A tuberculose bovina causada pelo *Mycobacterium bovis*, a qual pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, é uma doença granulomatosa, de evolução crônica e efeito debilitante, caracterizada por lesões nodulares, de evolução progressiva conhecida como tubérculos, podendo estas, estarem localizadas em qualquer órgão ou tecido (BRASIL, 2006; PAES, 2010; PINTO, 2003; RIET-CORREA *et al.*, 2001). É também responsável pela doença humana, fazendo da bactéria uma importante espécie zoonótica (MORRIS *et al.*, 1994).

A tuberculose causada por *M. bovis* em seres humanos é clínica e patologicamente indistinguível da doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), principal agente da tuberculose no ser humano, o qual também pode acometer a espécie bovina, sem causar doença progressiva, todavia, ocasionalmente, pode sensibilizá-los ao teste tuberculínico (COSIVI *et al.*, 1998; BRASIL, 2006; RUA-DOMENECH, 2006).

As bactérias da espécie *M. bovis* apresentam-se de forma bacilar, delgadas e alongadas, medindo de 0,5 a 7,0 µm de comprimento por 0,3 µm de largura, imóveis, não capsuladas, não flageladas. São bacilos gram positivos, álcool-ácido resistentes (BAAR), ou seja, uma vez corada pela fúccina, não se decora na presença de uma mistura de álcool e ácido clorídrico, na técnica conhecida como coloração de Ziel-Neelsen (RAVIGLIONE *et al.*, 1995; ROXO, 1997; BRASIL, 2006; PAES, 2010).

O bacilo possui moderada resistência ao calor, dissecação e a diversos desinfetantes, podendo sobreviver em pastagens, aviários, matéria orgânica, fezes e cama de galinha, por um período de 6 meses a 4 anos, à depender da influência de fatores como a temperatura, umidade, pH e exposição a luz solar (RUGGIERO *et al.*, 2007; COELHO, 2002). No entanto, está comprovado que a técnica de pasteurização do leite é capaz de destruir o bacilo da tuberculose, assim como alguns fenóis orgânicos, que conseguem matá-la em meia hora, se forem usados a 3% (GERMANO & GERMANO, 2010; CORRÊA & CORRÊA, 1992).

2.1.2 DISTRIBUIÇÃO

A tuberculose bovina apresenta distribuição mundial, concentrando-se principalmente nos países em desenvolvimento e na América do Sul, a qual detém a maior população bovina. Com menor frequência encontram-se os países desenvolvidos, onde as políticas de controle e erradicação, com bases em tuberculinização e sacrifício dos animais reagentes, estão em fase avançada, final ou até mesmo já erradicado, como é o caso de alguns países da Europa (ROXO, 1997; WEDLOCK *et al.*, 2002; BRASIL, 2006).

Assim, como os casos de tuberculose bovina, a infecção causada pelo *M. bovis* em humanos também são notificadas em todo o mundo (UNE & MORI, 2007). Os casos de tuberculose humana de origem bovina são estimados em 1% nos países em desenvolvimento, enquanto que nos países desenvolvidos esse percentual é de 5%; estima-se ainda que ocorram 80.000 casos novos de tuberculose em humanos no Brasil, dos quais aproximadamente 4.000 são causados por *M. bovis* (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

No Brasil faltam estatísticas confiáveis acerca da ocorrência e distribuição das enfermidades, em especial da tuberculose bovina, onde há poucos dados referentes sua prevalência nas diferentes regiões (RIET-CORREA *et al.*, 2001; LILEMBAUM, 2000). Entretanto, em 14 Estados brasileiros, a prevalência da tuberculose bovina variou de 0,9% a 1,7% entre os anos de 1986 a 1996, segundo dados do Ministério da Agricultura (ABRAHÃO, 1998). No período de 1989 a 1998, dados de notificações oficiais indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais reagentes à tuberculina (BRASIL, 2006). Em uma população avaliada em aproximadamente 170 milhões de bovinos no Brasil, calcula-se que exista 200mil animais infectados (LEITE *et al.*, 2003).

2.1.3 TRANSMISSÃO

O *M. bovis* possui uma ampla cadeia de hospedeiros que abrange diversas espécies de mamíferos, inclusive o homem, sendo os bovinos, caprinos e suínos os mais suscetíveis, no entanto, a infecção independe das estações do ano, do clima, do sexo, da região.

Existem várias portas de entradas para o bacilo, sendo as mais frequentes as vias:

1. Respiratória: com aproximadamente 90% dos casos, principalmente em animais mantidos em regime de confinamento, onde a infecção se dá basicamente pela inalação de partículas infectadas excretadas na tosse ou secreção nasal de um animal

com tuberculose pulmonar ativa, onde nesses casos, o complexo primário será localizado nos órgãos digestivos e linfonodos regionais;

2. Alimentar: considerada a segunda via mais importante, está geralmente relacionada à ingestão de leite proveniente de vacas infectadas, consumo de alimentos e água contaminados, podendo está última, quando estagnada em cochos, por exemplo, causar infecção até 18 dias do último uso por animal tuberculoso, diferente da água corrente (RADOSTITS *et al.*, 2002; ABRAHÃO, 1998; CORRÊA & CORRÊA, 1992).

No entanto, pode ocorrer também infecção por vias menos comuns como as:

1. Cutâneas: a infecção pode ocorrer por contato com objetos contaminados;
2. Venéreas: pode ocorrer nos bovinos se houver lesões da infecção no pênis ou na mucosa prepucial dos machos ou ainda da vulva e/ou mucosa vaginal das fêmeas;
3. Congênitas: a transmissão pode ocorrer para o feto via vasos sanguíneos umbilicais, a partir da infecção presente no útero da fêmea, e mais raramente da deglutição do líquido amniótico infectado (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994; NEILL *et al.*, 1994; RADOSTITS *et al.*, 2002; BRASIL, 2006).

A principal fonte de infecção são os próprios animais infectados inseridos no rebanho, principalmente em criações onde existe o regime de confinamento. O agente pode ser eliminado pelo ar expirado, fezes, urina, leite (onde o bacilo é eliminado de forma intermitente em apenas 1% das vacas doentes, causando infecção principalmente em animais jovens e humanos), corrimento nasal, secreções vaginais e uterinas e pelo sêmen, a depender dos órgãos atingidos e a sua eliminação ocorre antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos (BRASIL, 2006; ROXO, 1997).

O homem é um hospedeiro acidental para o *M. bovis*, onde a ingestão do leite cru contaminado torna-se uma das principais fontes de infecção humana, no entanto, a adoção rotineira da pasteurização do leite, tem diminuído os casos ocasionados pelo mesmo. Entretanto, mesmo que raros os casos de infecções causadas pelo consumo de produtos cárneos contaminados aqui no Brasil, já que existe uma baixa incidência do agente em tecidos musculares e da população não ter costume de consumir carne crua, tal risco não deve ser ignorado, principalmente se considerarmos o grande número de abates clandestinos e de animais descartados de rebanhos positivos em matadouros que não atendem às normas exigidas pela lei (GERMANO & GERMANO, 2010; SOUZA *et al.*, 1999).

O risco da tuberculose zoonótica é maior nos grupos das crianças, idosos e pessoas com deficiência imunológica, é também considerada uma doença ocupacional de grande

importância para trabalhadores rurais que lidam com bovinos, profissionais de matadouros devido ao contato íntimo com as carcaças e órgãos de animais contaminados. Existindo assim, a possibilidade de indivíduos infectados disseminarem o bacilo não só para outras pessoas, mas também para o gado (BRASIL, 2006; GERMANO & GERMANO, 2010).

2.1.4 PATOGENIA

O *M. bovis* apresenta como principal porta de entrada no hospedeiro a via aerógena, acometendo pulmões e os linfonodos regionais por meio da inalação de aerossóis contaminados, tornando-se uma realidade para cerca de 90% dos casos de tuberculose bovina (ROXO, 1997).

Contudo, o bacilo também pode ser transmitido pela via digestiva, principalmente em bezerros lactentes, provenientes de vacas com mastite tuberculosa, ou mesmo de animais que ingeriram água ou alimentos contaminados, infectando, conseqüentemente, os tecidos do trato digestório, incluindo linfonodos faríngeos, mesentéricos e pré-hepáticos. Sendo assim, a via de entrada pode ser deduzida a partir da localização das lesões post mortem (POLLOCK & NEILL, 2002; BRASIL, 2006).

Em casos generalizados, todos os órgãos podem estar comprometidos (ROXO, 1997). O estabelecimento da doença está diretamente relacionado às vias de entrada, bem como à resposta imune desencadeada pelo animal, e aos fatores de virulência destes micro-organismos (NEILL, *et al.* 1994).

A virulência das micobactérias está associada ao mecanismo de evasão imunológica que as mesmas desenvolvem, permitindo sua sobrevivência e multiplicação dentro de células imunológicas do hospedeiro (CORREA & CORREA, 1992). Ao ingressar em um organismo, há uma multiplicação inicial na porta de entrada, seguida de fagocitose por neutrófilos e, principalmente, macrófagos, originando fagossomos no citoplasma. Contudo, o *M. bovis* impede a fusão desta estrutura com o lisossomo para a formação do fagolisossomo, bloqueando a ação enzimática, o que leva à permanência do micro-organismo dentro da célula (PAES, 2010).

Assim, o *M. bovis* começa a se multiplicar e sensibilizar várias células no local da invasão, a exemplo dos linfócitos T CD4+, plasmócitos e os próprios macrófagos, os quais são ativados, se modificando e originando células epitelióides e células de *Langherans* (CORREA & CORREA, 1992; NEILL *et al.*, 2005). Foi demonstrado que os neutrófilos

participam efetivamente na formação da lesão inicial em bezerros, embora as outras células desempenhem um papel mais relevante (CASSIDY *et al.*, 1998).

Estes componentes celulares se dispõem em várias camadas concêntricas e formam as lesões típicas da tuberculose, denominadas granulomas ou tubérculos, cujo centro é necrótico e pode haver precipitação de sais de cálcio, devido à modificação do pH e amadurecimento do processo (POTEL, 1974; SAUNDERS & COOPERS, 2000; POLLOCK & NEILL, 2002; PAES, 2010). Observa-se também na porção mais centralizada, a presença de bacilos álcool-ácido resistentes, característicos das micobactérias (NEILL *et al.*, 2001).

Paralelamente, as bactérias serão carreadas pelos macrófagos até os linfonodos satélites. Os fibroblastos chegam em seguida ao local da lesão para formar uma cápsula na tentativa de conter o processo (AMENI *et al.* 2000). A formação completa destas estruturas granulomatosas, seja em órgãos parenquimatoso ou no seu linfonodo satélite, se dá em aproximadamente 4 a 6 semanas após a infecção primária (NEILL *et al.*, 1994; BRASIL, 2008; PAES, 2010), porém de 8 a 14 dias já se pode observar o foco primário microscopicamente (POTEL, 1974; CASSIDY *et al.*, 1998).

As micobactérias podem ainda ultrapassar a barreira conectiva do granuloma e se disseminar pelas vias linfo-hematógenas do hospedeiro, gerando uma bacteremia profusa e atingindo outros órgãos, o que promove a formação de tubérculos pós-primários de diversos tamanhos, sendo os menores são chamados de tubérculos miliares, devido ao aspecto semelhante a um grão de milho (“*milium*”).

Se houver septicemia e invasão a outros órgãos, as bactérias serão fagocitadas por macrófagos, os quais deverão apresentar os antígenos ao Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC). Os linfócitos T reconhecem estes antígenos apresentados e irão modular a resposta imune por meio da produção de citocinas, sobretudo o interferon (IFN) gama, ativando outros macrófagos. Estas células são induzidas a diminuir o pH do fagolisossomo e liberar enzimas lisossomais, podendo levar à morte bacteriana (WEDLOCK *et al.*, 2002).

Além disso, o óxido nítrico e o fator de necrose tumoral alfa são componentes que também participam da reação imunológica contra o *Mycobacterium*, reorganizando o arranjo da lesão e ativando a função endotelial local (CHAN *et al.*, 1995; SCOTT-ALGOOD *et al.*, 2003; WATERS *et al.*, 2003).

Sob o aspecto macroscópico, as lesões são de coloração esbranquiçada ou amarelada, apresentando diversos tamanhos e o exsudato apresenta a consistência normalmente caseosa, devido à apoptose de macrófagos e células T, sendo envolto por uma cápsula fibrosa, embora

possa estar mais purulento em determinadas situações, a depender da evolução do processo (BERNHAGEN *et al.*, 1996; FAYYAZI *et al.*, 2000; GIL, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 2001).

De acordo com fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro e ao agente infeccioso, o organismo animal pode responder ativamente ao processo infeccioso e alcançar a remissão do quadro, por meio da reabsorção dos tecidos em necrose e reorganização fibroblástica. Caso este evento não ocorra, o animal entra na fase crônica da enfermidade com perpetuação e possível disseminação da infecção (POTEL, 1974; CORREA & CORREA, 1992).

2.1.5 SÍNDROME CLÍNICA

A tuberculose bovina caracteriza-se por ser uma enfermidade de curso crônica, onde as diferentes localizações das lesões causam uma grande variedade na ocorrência dos sinais clínicos, tanto em bovinos como nos seres humanos. Em infecções recentes, a manifestação de sinais importantes para o diagnóstico é de pouca relevância, uma vez que os animais podem apresentar-se aparentemente sadios, sendo detectada somente pelo teste tuberculínico. No entanto, animais que apresentam um grau avançado da doença, a realização de um exame clínico e uma investigação epidemiológica criteriosa são de extrema importância para a elaboração de um diagnóstico definitivo (HUCHZERMAYER *et al.*, 1994; ROXO, 1997; PALMER, WATERS, 2006).

Nos animais sintomáticos, mesmo que os sinais clínicos possam estar associados à localização da infecção em determinado órgão, alguns sinais sistêmicos evidentes podem ser observados como linfadenomegalia localizada ou generalizada, temperatura oscilante, sinais respiratórios, dispneia, secreção nasal, manifestação rápida de cansaço, a ocorrência de tosse seca não produtiva, apetite caprichoso, emagrecimento progressivo não associado a outros sinais, diminuição da produção de carne e leite acarretando em uma perda de 10 a 25% nas suas produções (RIET-CORREA *et al.*, 2001; ACHA & SZYFRES, 2003; BLOOD *et al.* 2002; ROXO, 1997; BRASIL, 2001).

A tuberculose bovina pode se desenvolver das mais variadas formas, podendo apresentar casos de remissão, recidiva, dificilmente ocorre auto cura e aprisionamento da infecção. Das mais diferentes formas da tuberculose se apresentar nos bovinos, as mais comuns ocorrem nos linfonodos e nos pulmões, sendo considerada rara a tuberculose em nível renal, hepático, esplênico, ósseo, articular, mamário e reprodutor, sendo usualmente causada por disseminação hematogénea (COETZER & TUSTIN, 2004). O exame clínico dos animais

suspeitos de tuberculose deve constar a auscultação, a percussão, a termometria e a palpação das glândulas mamárias e linfonodos superficiais (ROXO, 1997).

Além dos sinais gerais já citados, quando o sistema pulmonar é o mais afetado pela doença, os sinais mais comuns incluem tosse crônica, úmida e leve, taquipnéia e hiperpnéia evidentes e em estágios avançados, ruídos pulmonares como crepitações, sibilos e pontos silenciosos ocupados por granulomas; os ruídos de fricção pleural podem ocorrer raramente (SMITH, 2006). Disfagia e respiração ruidosa ocorrem devido à obstrução da faringe resultante do aumento do linfonodo retrofaríngeo (BLOOD *et al.*, 1989). A manifestação em linfonodos tem grande importância diagnóstica, podendo afetar um ou vários linfonodos, uni ou bilateralmente, esse último sendo o mais comum. Apresentam-se com elevações, geralmente indolores, com aspecto tumoral, mas sem estarem aderidos à pele (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Segundo Radostits *et al.* (2002), as lesões do trato reprodutivo são raras, onde no macho pode ocorrer orquite caracterizada pelo aumento e endurecimento do testículo sem causar dor; nas fêmeas são descritas lesões na placenta semelhantes com as que ocorrem nos casos de brucelose, a tuberculose também pode provocar peritonite, bursite, salpingite, metrite – podendo ocorrer infertilidade, aborto no final da gestação ou morte do recém-nascido por tuberculose generalizada. Enquanto que na tuberculose intestinal os sintomas são bastante inespecíficos, quando aparentes, pode ocorrer diarréia alternando com constipação causada pela compressão do aumento dos linfonodos regionais, acompanhadas de cólicas ocasionais, como resultado de pressão no esôfago pelo aumento dos linfonodos mediastinais e pode ocorrer também episódios de timpanismo (BERR, 1988; HUCHZERMEYER *et al.*, 1994).

A tuberculose óssea apresenta lesões nas articulações do jarrete, mais raramente, do carpo ou tarso e excepcionalmente ocorrem complicações nas articulações falangianas isoladamente. Clinicamente é possível observar inflamação dolorosa e transtorno funcional nas articulações afetadas (BEER, 1988). Em animais jovens pode ocorrer osteomielite, particularmente nas vértebras, arcos costais e ossos chatos da pelve, podendo drenar através das fístulas no córtex do osso afetado, causando miosite e artrite na região (HUCHZERMEYER *et al.*, 1994). Na tuberculose do encéfalo e meninges, uma infecção rapidamente fatal, pode ocorrer sintomas nervosos centrais, generalizados ou focais, dependendo de sua localização. Alguns sinais neurológicos observados são: andar inseguro e cambaleante, excitabilidade, movimento de pedalar, paralisia total ou parcial de alguns nervos cranianos (ROSEMBERGER *et al.*, 1990; JONES *et al.*, 1997).

Quando a infecção tem como foco o aparelho mamário, conhecida como mastite tuberculosa, apresenta uma grande preocupação à saúde pública, sendo os principais sinais clínicos: o endurecimento e o aumento da glândula mamária, alterações no leite que o tornam um fluido claro de cor âmbar. O leite ao ser inspecionado nas fases iniciais da infecção pode apresentar um aspecto normal, contudo, com o avançar da doença ele pode ser constituído apenas esse fluido (RADOSTITS *et al.*, 2002).

2.1.6 DIAGNÓSTICO

Para a realização do diagnóstico da tuberculose bovina são utilizados métodos diretos e indiretos, onde os diretos baseiam-se na detecção e identificação do agente etiológico no material biológico e os indiretos, na pesquisa da resposta imunológica do hospedeiro ao agente, que pode ser humoral (produção de anticorpos circulantes) ou celular (mediada por linfócitos e macrófagos). Embora muito se saiba a respeito da tuberculose, o diagnóstico da doença e a identificação da micobactéria ainda não é uma questão simples; atualmente existem métodos de diagnósticos adequados, entretanto, não existe um que tenha uma eficácia absoluta, sendo assim, todos devem ser aplicados com critério e respeitando cada situação epidemiológica (BRASIL, 2006; MICHEL *et al.*, 2010).

O diagnóstico clínico da tuberculose tem valor relativo e sem alguns casos, de difícil interpretação, isso porque alguns animais podem estar infectados, mas ao exame clínico apresentarem-se aparentemente sadios, além de apresentarem sintomas inespecíficos quem podem ser confundidos com outras doenças. No entanto, é de grande importância nos fenômenos de anergia, onde a doença já se encontra em estado avançado não sendo detectado pelos testes tuberculínicos (BRASIL, 2006; RIET-CORREA *et al.*, 2001).

A inspeção *post-mortem* de carcaças em matadouros ou a necropsia minuciosa, através da detecção de lesões típicas, e não patognomônicas constituem importantes ferramentas no diagnóstico da tuberculose bovina. As lesões apresentam-se como nódulos de 1 a 3 cm de diâmetro ou mais, que podem ser confluentes, de aspecto purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar necrose de caseificação no centro da lesão, ou, ainda, calcificação nos casos mais avançados (CORNER, 1994; BRASIL, 2006). Os linfonodos mais recomendados são os mandibulares, os parotídeos, os retrofaríngeos, o mediastinais, os traqueobrônquicos e os mesentéricos (BROWN & DE ANDA, 1998).

Na inspeção realizada em matadouros são encontradas diversas doenças como actinobacilose, piogranuloma estafilocócico, hidatidose policística e alguns tumores, as quais apresentam lesões macroscópicas similares à tuberculose. Para diferenciar essas lesões da tuberculose é necessário o exame histológico (RIET-CORREA *et al.*, 2001). Sendo assim, o diagnóstico histopatológico é um importante exame complementar a inspeção *post-mortem* de carcaças com lesões suspeitas de tuberculose. Com a coloração de hematoxilina-eosina (HE), que é uma técnica indireta, pode-se detectar o granuloma, considerado a lesão característica desta doença (CORNER, 1994; CASSIDY *et al.*, 1999).

As lesões tuberculosas quando visualizadas ao exame histológico caracterizam-se por uma área central de necrose caseosa, às vezes mineralizada, circundada por células gigantes tipo Langhans, células epitelióides, histiócitos e na periferia a presença de mononucleares, linfócitos e raros plasmócitos, circundados por tecido conjuntivo fibroso, configurando o folículo tuberculoso (OLIVEIRA *et al.*, 1986). O método de coloração de *Ziehl-Neelsen* para visualização de BAAR é barato e rápido, no entanto, só é possível revelar bacilos quando em concentrações superiores a 10^3 bactérias por mL, não sendo possível com esta técnica distinguir os membros da família *Mycobacteriaceae* (BARKSDALE & KIM, 1977).

O diagnóstico indireto *in vivo* da tuberculose bovina é realizado por meio de testes cutâneos, que consiste na inoculação intradérmica de tuberculinas, que são as formas mais usuais de diagnóstico e tem representado um papel fundamental em programas de erradicação, como o primeiro teste diagnóstico, porém com a desvantagem de não demonstrar infecções recentes (MONAGHAN *et al.*, 1994; NEILL, 1994; NEILL *et al.*, 2001; RIET-CORREA *et al.*, 2001).

Existem três tipos de testes cutâneos que são utilizados para o diagnóstico da tuberculose bovina utilizando tuberculinas, são eles:

- Teste da prega caudal (TPC) - utilizado como prova de triagem, exclusivo para gado de corte;
- Teste cervical simples (TCS) – indicado para o gado de leite como prova de rotina;
- Teste cervical comparativo (TCC) – considerado a prova confirmatória para animais reagentes ao TPC ou ao TCS (BRASIL, 2006).

O teste cutâneo consiste na inoculação intradérmica de 0,1 mL da tuberculina, para ambos os testes, deve-se observar no momento da aplicação a formação da pápula. Após 72h da inoculação, é realizada uma leitura da reação alérgica com a ajuda de um cutímetro,

determina-se então a diferença entre as medidas da dobra da pele antes e após a inoculação (RIET-CORREA *et al.*, 2001) e é realizada então a interpretação dos dados obtidos, podendo revelar infecções a partir de 3 a 8 semanas da exposição ao *Mycobacterium*

Trata-se de um teste de boa sensibilidade e especificidade, considerado como referência pela OIE, mas para o sucesso dessa técnica são necessários alguns cuidados como: escolha certa do tipo de teste, equipamentos adequados, critérios de leitura, qualidade da tuberculina, atenção aos casos de anergia (animais idosos, caquéticos ou com lesões avançadas), a prova não deve ser realizada 30 dias antes ou depois do parto e deve sempre ser realizada por um médico veterinário (BRASIL, 2006; RIET-CORREA *et al.*, 2001).

O diagnóstico bacteriológico é um teste direto, definitivo e considerado padrão ouro, que permite a detecção do patógeno em amostras clínicas, mediante isolamento e tipificação da bactéria, muito importante para a vigilância epidemiológica da enfermidade. Entretanto, o isolamento bacteriológico requer um longo período de incubação, as micobactérias patogênicas crescem lentamente (em até 90 dias, ou mais) onde 10% das amostras de *M. bovis* só apresentam colônias visíveis após 60 dias de cultivo (CORRÊA & CORRÊA, 1992; BRASIL, 2006; RIET-CORREA *et al.*, 2001).

A pesquisa de (BAAR), podem ser realizadas através de lâminas coradas pela técnica de *Ziehl-Neelsen* a partir de amostras frescas, apesar de tratar-se de um método de baixa sensibilidade e não identificar a espécie, quando positivo, a probabilidade de que se trate de uma micobactéria é muito grande. As micobactérias crescem em meios especiais, como o meio de Löwenstein-Jensen, constituídos por gema de ovo e amido, enriquecidos com asparagina e contendo verde malaquita para inibir organismos contaminantes (CORRÊA & CORRÊA, 1992; BRASIL, 2006). No entanto, para isolamento do *M. bovis* o meio de cultura utilizado é conhecido como Stonebrink – Leslie, que contém piruvato ao invés de glicerol. Outros meios usados são Ogawa, Sauton, Kirschner, Middlebrook e Tween (O' REILLY & DABORN, 1995). Fatores como qualidade do meio de cultura, descontaminação da amostra, condições de incubação, viabilidade e carga bacteriana devem ser levados em consideração para o sucesso do isolamento (ARAÚJO *et al.*, 2005).

Nos últimos anos novos métodos para o diagnóstico da tuberculose bovina estão surgindo e em etapa de estudo, entre as quais podemos citar a prova sorológica ELISA, a prova de gama interferon, diferentes métodos de amplificação genética e a PCR, que permitem identificar rapidamente as espécies micobacterianas. A aplicabilidade de algumas

técnicas, de forma complementar a bacteriologia clássica, já é uma realidade nos programas de controle e erradicação (BRASIL, 2006; RIET-CORREA *et al.*, 2001).

No Brasil, pesquisas realizadas por Zanini *et al.* (2001) e Araújo *et al.* (2005), descrevem o uso do PCR como método de diagnóstico rápido e preciso da tuberculose bovina, podendo auxiliar a inspeção sanitária dos matadouros frigoríficos. Apesar disso, embora bastante eficiente, ainda existem alguns entraves relacionados à técnica, como as extrações de DNA genômico amplificável de qualidade e a disponibilidade de oligonucleotídeos com alta especificidade para diferentes espécies (KHAN; YADAV, 2004).

2.1.7 CONTROLE E INSPEÇÃO EM MATADOURO: ASPECTOS IMPORTANTES

A tuberculose bovina trata-se de uma enfermidade que compõe a lista da World Organisation for Animal Health (OIE) de doenças de notificação obrigatória, uma vez diagnosticada, deverá seguir o fluxo de informação partindo dos serviços de defesa e inspeção oficiais de cada Município/Estadual, esta é remetida ao MAPA, que informará através de boletins, a OIE, na França (BRASIL, 2001). Por se uma doença de curso crônica e não apresentar sinais clínicos alarmantes como ocorre nos casos de doenças agudas, tem sido nos últimos anos, um dos principais motivos da falta de motivação para o seu controle, não só por parte dos médicos veterinários, bem como criadores, autoridades sanitárias e consumidores de produtos de origem animal doença (BRASIL, 2006).

O Brasil está entre as 34 nações incluindo o Caribe, que detêm 76% do rebanho bovino desta área, e que adota o teste-sacrifício como medida de controle e a notificação para os órgãos competentes. Em 22 países, a doença é parcialmente controlada ou não tem controle algum, onde países como Cuba, Uruguai e Venezuela apresentam taxas de prevalência da infecção muito baixas, moderadas na Argentina, Paraguai, Brasil e Chile, e elevada na Bolívia (COSIVI *et al.*, 1998). Instituído em 2001 pelo MAPA, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), tem como objetivo a diminuição da prevalência e a incidência dos casos de tuberculose, bem como o impacto negativo dessa zoonose na saúde pública, além de promover a criação de propriedades certificadas como livres ou monitoradas, onde essas enfermidades são controladas com rigor, que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário aumentando assim, a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2006).

Assim sendo, seu principal plano de estratégia é o abate sanitário dos animais que reagirem positivamente à prova da tuberculínica, realizadas periodicamente, para isso é

imprescindível que as autoridades invistam em políticas de incentivo aos produtores, seja através da indenização dos animais sacrificados, bem como no estímulo à valorização dos produtos provenientes de propriedades livres da doença (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

Além de todas as ações já citadas, outras medidas tão importantes quanto, podem ser adotadas para evitar que a doença se instale na propriedade como limpeza e desinfecção das instalações, controle de trânsito de animais, cuidado na introdução de novos animais no rebanho (com testes negativos, provenientes de rebanhos livres, quarentenário e isolamento de animais suspeitos), exame clínico nos casos de anergia, confirmação do diagnóstico através de exames histopatológicos e bacteriológicos, eliminar o leite de vacas reagentes para qualquer finalidade e o monitoramento pelo serviço de inspeção das carcaças no momento do abate para detecção de lesões tuberculosas (ROXO,1995; FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997; BRASIL, 2006).

No Brasil, é de responsabilidade da Divisão de Normas Técnicas do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do MAPA, o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), desta forma, os serviços de inspeção oficiais possuem respaldo legal e o médico veterinário tem a responsabilidade da decisão e competência legal, de condenar ou não, carcaças e vísceras ao verificar, mesmo que empiricamente, lesões sugestivas de tuberculose com objetivo de promover a saúde pública (CORRY & HINTON, 1997). Desta forma, países onde a tuberculose é de caráter endêmico e que apresentam um desempenho satisfatório nos serviços de inspeção em matadouros e um programa de erradicação solidificado, tem conseguido reduzir a prevalência da doença, uma vez que o diagnóstico precoce é importante para controle e erradicação do bacilo (KANTOR; RITACCO, 2006).

As unidades de matadouros juntamente com o serviço de inspeção sanitária médico-veterinária, constituem uma fundamental ferramenta no diagnóstico de enfermidades, entre elas as de caráter zoonótico, representando assim, um importante instrumento para a saúde pública, impedindo que carcaças impróprias para consumo humano sejam comercializadas, além de possibilitar a avaliação de programas de controle e erradicação dessas enfermidades (UNGAR *et al.*,1992; PEREIRA *et al.*, 2006); além de ser uma importante fonte alternativa de dados (SENASA, 2004). Assim sendo, os matadouros podem fornecer a base científica para o planejamento regional de programas de controle e erradicação da tuberculose (TORRES, 2004), onde todas as informações obtidas por meio de inspeções são de grande importância para a compreensão das doenças nos animais de abate (RAJI *et al.*,2010).

No entanto, a prevalência da tuberculose bovina continua subestimada, pois mesmo sendo reservado ao matadouro o papel de sentinela epidemiológica e de rastreabilidade tão importantes aos programas de combate às doenças, menos de 50% das lesões tuberculosas são detectáveis macroscopicamente durante a inspeção de rotina, o que chama atenção para os casos de tuberculose onde os animais abatidos não apresentam lesões macroscopicamente detectáveis nos exames *post-mortem* (CORNER, 1994).

Para saúde pública, o risco de contrair o *M. bovis* através da ingestão de produtos cárneos é menor, isso ocorre principalmente pela baixa incidência do agente em tecidos musculares e do hábito de não se comer carne crua no Brasil, entretanto o risco não deve ser descartado devido a grande quantidade de abates clandestinos, ou mesmo o abate de animais descartados de rebanhos positivos em matadouros que não atendem às normas de inspeção exigidas pelo rigor da lei (SOUZA *et al.*, 1999).

Até o presente, os tratamentos de bovinos tuberculosos, apesar de diversos estudos, têm sido proibidos em países que têm programas de controle, pois não é possível obter por meio de tratamento a eliminação de todos os animais portadores do agente; mantendo desta forma a fonte de infecção e a doença no rebanho. Sendo assim, esse tipo de prática não é adotada como tática de ação pelo PNCEBT (ROXO, 1997; LAGE *et al.*, 1998; BRASIL, 2006).

No Brasil, assim como nos países em desenvolvimento, o controle da tuberculose humana tem se tornado um sério desafio (GUIMARÃES & LANGONI, 2009). Para a profilaxia, o Programa de Controle da Tuberculose (PCT) preconiza a vacinação BCG e a quimioprofilaxia para grupos com maior risco (HIJJAR & PROCÓPIO, 2006). Em humanos o tratamento é padronizado no Brasil. As medicações são distribuídas pelo sistema de saúde, através de seus postos municipais de atendimento (ABC DA SAÚDE E PREVENÇÃO, 2015).

Como medida de controle da transmissão de *M. bovis* para seres humanos, a pasteurização ou esterilização do leite e derivados, a adoção do serviço de inspeção sanitária para os produtos de origem animal destinados ao consumo humano, diminuem os riscos. Além do monitoramento frequente da saúde dos trabalhadores rurais, de ações de restrição de contato com possíveis reservatórios domésticos, sinantrópicos ou silvestres (BRASIL, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar um estudo anátomo-patológico e laboratorial da tuberculose bovina em matadouros do Estado de Pernambuco

3.2 ESPECÍFICOS

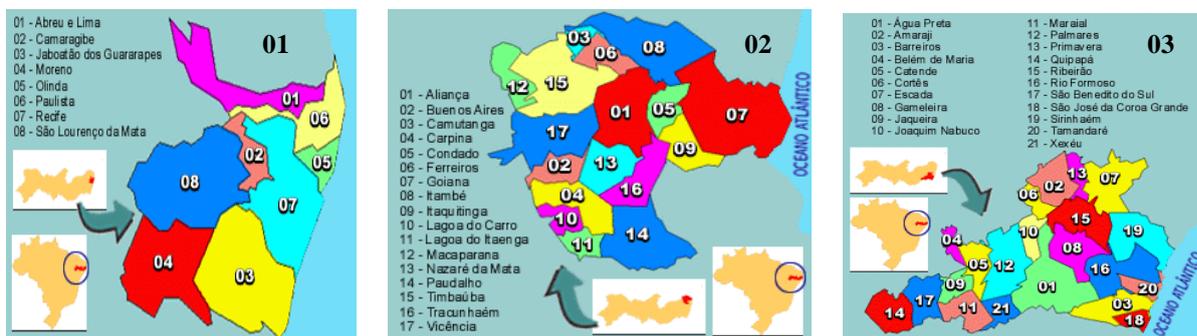
- Identificar macroscopicamente, lesões sugestivas de tuberculose bovina por meio da inspeção *post-mortem* das carcaças durante o processo de abate;
- Visualizar por meio da baciloscopia os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) utilizando as técnicas de impressão tecidual (*imprint*) e a coloração de Ziehl-Neelsen;
- Identificar morfológicamente por meio da histologia lesões características de tuberculose;
- Isolar em meio de cultura específica micobactérias provenientes de amostras de animais com lesões sugestivas de tuberculose avaliadas durante a inspeção *post-mortem* e positivas a baciloscopia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal sendo aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE sob o número de licença 056/2015.

4.1 AMOSTRAGEM

A pesquisa foi realizada entre os anos de 2013 e 2015, a amostragem foi estabelecida por conveniência, com base em estudo não probabilístico (MAROTTI *et al.*, 2008), sendo avaliados 141 bovinos, provenientes de abatedouros dos municípios das Microrregiões do Recife (Paulista e São Lourenço da Mata), da Mata Setentrional (Itambé e Paudalho) e da Mata Meridional (Escada e Ribeirão), do Estado de Pernambuco (Fig. 01).



Fonte: <http://www.citybrazil.com.br/pe/microrregiao>.

Figura 01. Localização dos municípios das Microrregiões do Recife 01 (Paulista e São Lourenço da Mata), da Mata Setentrional 02 (Itambé e Paudalho) e da Mata Meridional 03 (Escada e Ribeirão), do Estado de Pernambuco.

Os dados da origem dos animais abatidos foram obtidos através dos Guias de Transporte Animal (GTA), disponibilizados pelos responsáveis técnicos de cada abatedouro, descritos na Tabela 1. A origem dos animais abatidos em São Lourenço da Mata.

Tabela 1. Origem/ Procedência dos bovinos avaliados no estudo. Recife, 2015.

MATADOURO	QUANTIDADE INDIVIDUAL POR MATADOURO	ORIGEM	
		MUNICÍPIO	ESTADO
Paulista	4	Chorrochó	BA
	1	São Domingos do Maranhão	MA
	16	Caetés	PE
	10	Moreno	PE
TOTAL**	31		
São Lourenço da Mata	30	NI*	NI*
TOTAL**	30		
Paudalho	20	Orobó	PE
TOTAL**	20		
Ribeirão	19	Ribeirão	PE
	1	Joaquim Nabuco	PE
TOTAL**	20		
Escada	3	Brejão	PE
	4	Caruaru	PE
	3	Pombos	PE
	7	Amaraji	PE
	3	Primavera	PE
TOTAL**	20		
Itambé	6	Ferreiros	PE
	2	Timbaúba	PE
	1	Camutanga	PE
	3	Juripiranga	PB
	1	Goiana	PE
	6	Pilar	PB
	1	Lagoa do Carro	PE
TOTAL**	20		

* NI = Não informado

**TOTAL – corresponde ao número total de amostras coletadas em cada matadouros.

4.2 COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Todos os animais abatidos foram submetidos a condições físicas semelhantes, seguindo todas as etapas preconizadas durante o processo de abate, todos portavam o GTA. Chegando ao abatedouro os animais eram descarregados nos currais de recepção, onde permaneciam em repouso e jejum, nesse período era realizada a inspeção *ante-mortem* e a separação por lotes de acordo com a procedência. Após esse período, os animais eram submetidos a um banho de aspersão e conduzidos ao boxe de atordoamento onde eram realizadas as insensibilizações por meio de marreta pneumática, aplicadas na parte superior da cabeça dos animais. Atordoados os animais eram transportados em trilhos aéreos até o local de sangria realizada por meio de corte dos grandes vasos do pescoço, seguida da esfolagem, remoção do couro e cabeça. Na evisceração, as carcaças eram abertas com serra elétrica, as vísceras retiradas e carregadas em bandejas para inspeção *post-mortem* para análise de alterações macroscópicas com ênfase em lesões sugestivas de tuberculose, nesse momento eram realizadas as colheitas dos linfonodos pulmonares, bem como de fragmentos teciduais de pulmão com alterações compatíveis. Por fim, as carcaças eram encaminhadas a câmaras frigoríficas para comercialização ou condenadas total ou parcialmente de acordo com o tipo de lesões observadas (BRASIL, 2006; SARCINELLI *et al.*, 2007).

As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis, refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório Clínico de Animais de Produção do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), para posterior processamento. Estes espécimes foram separados em duas alíquotas, onde foram encaminhados à análise a fresco, pela técnica de impressão tecidual (*imprint*) e isolamento bacteriológico, ao armazenamento em formalina tamponada a 10% para posterior processamento visando à análise histopatológica.

4.3 ANÁLISE BACILOSCÓPICA

Para avaliação baciloscóptica, os fragmentos de linfonodo pulmonar dos bovinos em estudo foram seccionados em sentido sagital e submetidos, em duplicata, à técnica de impressão tecidual (*imprint*) em lâminas de vidro secas ao ar, as quais foram coradas utilizando-se o conjunto de coloração de *Ziehl-Neelsen* (New Prov®) pelo método de *Ziehl-*

Neelsen conforme instruções do fabricante, descristas a seguir, para visualização de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

Coloração de *Ziehl-Neelsen*:

- Após a impressão tecidual (*imprint*), as lâminas foram fixadas pelo aquecimento em bico de Bunsen;
- As lâminas foram cobertas com fucsina funicada a 0,3% e submetidas ao aquecimento lento pelo lado inverso até a emissão de vapores visíveis;
- Removeu-se o excesso de fucsina funicada das lâminas e verteu-se água corrente lentamente;
- As lâminas foram cobertas com solução descorante de álcool-ácido a 3% e aguardou-se 1 minuto;
- Removeu-se o excesso de álcool-ácido das lâminas e verteu-se água corrente lentamente;
- As lâminas foram cobertas com azul de metileno a 0,3% e aguardou-se 30 segundos;
- Removeu-se o excesso de azul de metileno das lâminas e verteu-se água corrente lentamente;
- Aguardou-se e secagem completa das lâminas e, em seguida, procedeu-se a análise microscópica com aumento de 100x (MOLINARO *et al.*, 2010a).

4.4 CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Para o isolamento bacteriológico, amostras de tecido pulmonar e/ou linfonodo foram semeadas em meio sólido de OGAWA KUDOH (OK) (Laborclin®). Para tal, foram seguidas as recomendações do kit comercial da Laborclin®, seguindo as seguintes etapas:

- Mergulhou-se um swab estéril na amostra biológica, com cuidado para que a amostra estivesse impregnada ao swab, pressionando-o contra a parede do recipiente contendo a amostra;

- Mergulhou-se o swab em um tubo contendo solução de hidróxido de sódio 1N (N/1); aguardando por no máximo 2 minutos para descontaminação;
- Retirou-se o swab da solução de hidróxido, em seguida foi realizada a semeadura por estriamento na superfície inclinada do vial com o meio de OK;
- Semeou-se em dois tubos, em seguida o vial foi fechado e as amostras incubadas em estufa a 35 – 37 °C por até 60 dias;
- O crescimento foi controlado semanalmente, à medida que foram observadas o crescimento de colônias (culturas positivas) estas foram encaminhadas para observação microscópica.

As colônias com características sugestivas de micobactérias foram analisadas sob os aspectos macroscópicos e microscópicos, fixadas em lâmina de vidro e coradas pelo método e coloração de *Ziehl Neelsen* para pesquisa de BAAR (CORRÊA & CORRÊA, 1992; CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972).

4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As amostras foram fixadas e processadas pelo método de microtomia de parafina utilizando-se o método descritos em Molinaro *et al.* (2010b), com adaptações, de acordo com o protocolo abaixo:

- As amostras foram fixadas com Formalina tamponada a 10% por 48 horas;
- Em seguida lavou-se por 2 horas em água corrente;
- As amostras foram armazenadas em álcool a 70% até o processamento;
- Devidamente identificadas, as amostras foram submersas em álcool a 80% durante 30 minutos;
- Passado o tempo, foram novamente submersas em álcool a 90% durante mais 30 minutos;
- Em seguida, as amostras foram mergulhadas em álcool absoluto por 30 minutos, retiradas e mergulhadas novamente em nova solução de álcool absoluto por mais 30 minutos;

- Passada a fase de desidratação, as amostras foram mergulhadas em xilol durante 40 minutos, retiradas e novamente mergulhadas em nova solução de xilol por mais 40 minutos;
- Passada a fase de clarificação, em estufa, as amostras foram mergulhadas duas vezes seguidas em parafinas diferentes por um tempo de 30 minutos cada,
- Por fim foram feitos cortes do material com espessura de 6µm em micrótomo Leica RM2025 para elaboração de duas lâminas, as quais foram corados pelas técnicas de rotina de hematoxilina-eosina (HE), para avaliação morfológica, com o propósito de observar lesões histológicas.

Coelho (2002) descreve como tubérculo completo se apresentar todos os elementos tais como necrose caseosa, infiltrado linfocitário, plasmocitário e macrofágico, células epitelióides e células gigantes de Langhans. E incompleto quando faltar um dos três elementos, necrose caseosa, células gigantes de Langhans ou macrófagos. Será típico quando existir célula gigante e atípico quando essa faltar.

5. RESULTADOS

Para o presente estudo, foram realizadas as seguintes técnicas de diagnósticos: análise macroscópica das carcaças, realizada durante o processo de inspeções *post-mortem* para observação de lesões sugestivas de tuberculose; a baciloscopia; a histopatologia e o cultivo. Onde, dentre as 141 carcaças analisadas apenas uma, foi diagnosticado como positivo para tuberculose para todos os testes realizados, equivalendo a 0,71% do total de amostras. O bovino com diagnóstico positivo foi abatido no matadouro do município de Ribeirão-PE, assim como a sua origem.

Durante as inspeções *post-mortem*, o animal positivo acima citado apresentava lesões anatomopatológicas típicas de tuberculose, devido à presença de tubérculos granulomatosos (Fig. 02) não apenas em linfonodos pulmonares, mas também distribuídos em diversos órgãos abdominais e torácicos, caracterizando macroscopicamente, um quadro sugestivo de tuberculose generalizada.

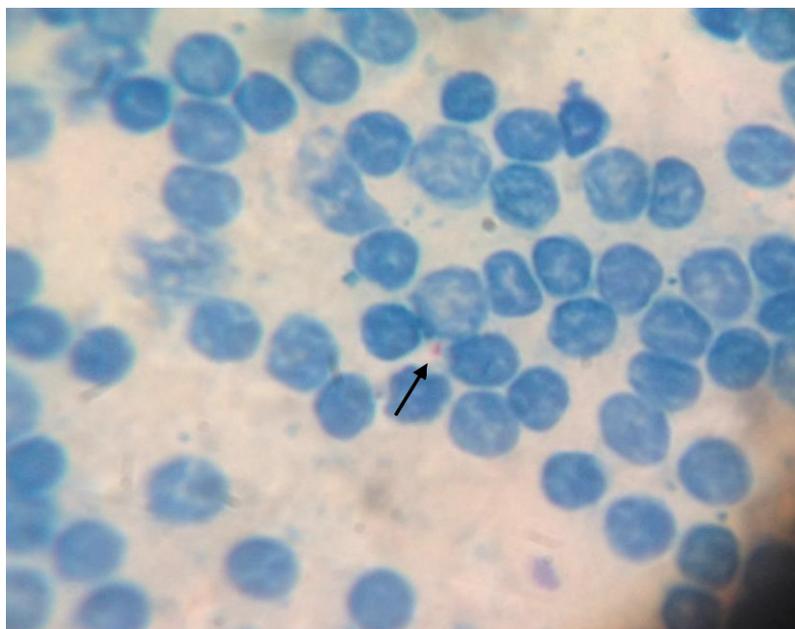


Fonte: Arquivo pessoal

Figura 02. Lesões características de tuberculose em fragmento pulmonar bovino.

Na avaliação baciloscópica, o mesmo animal que apresentou, durante a inspeção, lesões sugestivas para a tuberculose, mostrou-se positivo (Fig. 03) na análise das lâminas confeccionadas pela técnica de impressão tecidual (*imprint*) e coradas pelo método de *Ziehl-Neelsen*, na qual foi possível a visualização de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), caracterizados como cocobacilo de coloração vermelha intensa. Nas 140 amostras

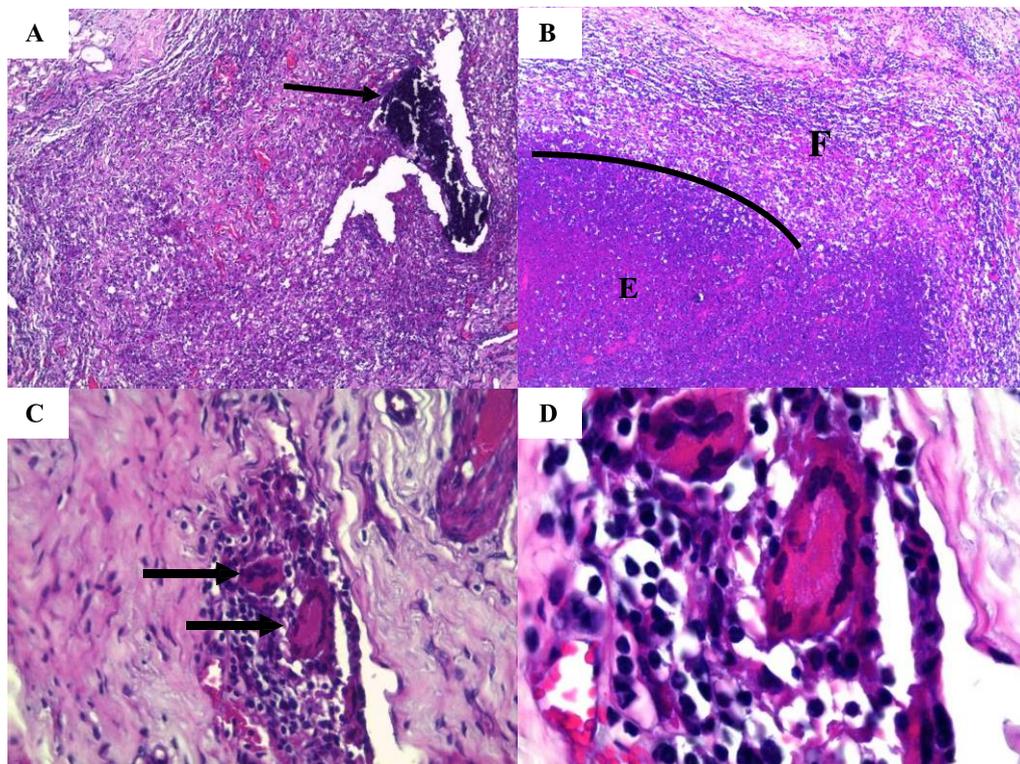
remanescentes não foram visualizados estes bacilos, sendo, desta forma, consideradas negativas.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 03. Bacilos álcool-ácido resistentes, observados por microscopia óptica. Aumento de 100X.

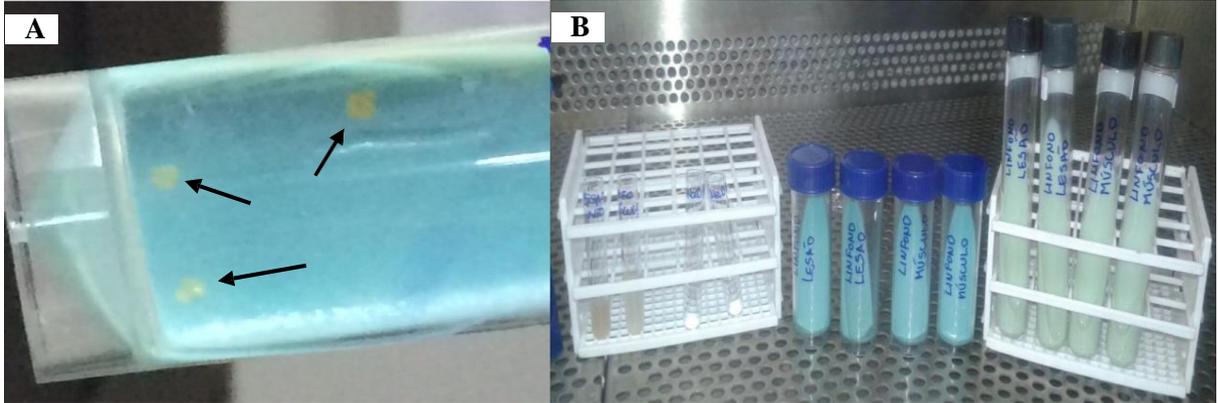
Nos achados histopatológicos, o mesmo animal dos 141 avaliados, também positivo às técnicas anteriores, apresentou lesões compatíveis para tuberculose, onde foram observadas formações de granulomas clássicos, com áreas de necrose com e sem calcificação, formação de fibrose, proliferação de linfócitos, presença de células epitelióides e células gigantes de Langhans (Fig. 04).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 04. Imagens de lesões características de tuberculose. Em A, formação de calcificação em fragmento de pulmão (A) obj. 10x; em B, zona de transição entre área de necrose (E) e região cortical e capsular (F), obj. 40x; em C, presença de células gigantes de Langhans, obj. 40x e em D com obj. 100x.

Quanto ao cultivo bacteriológico no meio de OGAWA KUDOH, apenas a amostra positiva à avaliação anátomopatológica e baciloscópica foi encaminhada, no intuito de isolar o agente etiológico e ratificar o quadro de tuberculose. Observou-se o crescimento de colônias arredondadas, de aspecto rugoso e coloração creme (Fig. 05), sugestivo de micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 05. Colônias crescidas em meio sólido de OGAWA KUDOH (A); processo de semeadura para o isolamento bacteriológico (B).

6. DISCUSSÃO

A frequência de 0,71% observada nesse estudo de animais diagnosticados positivamente para tuberculose a partir de amostras de animais abatidos em matadouros do Estado de Pernambuco, mostrou-se semelhante ao estudo de Furlanetto *et al.* (2012), que menciona uma frequência de 0,007%, em pesquisa realizada em matadouros no Estado de Mato Grosso.

A ocorrência da tuberculose bovina nos matadouros estudados foi considerada relativamente baixa, provavelmente devido ao caráter crônico da enfermidade, a qual se manifesta sob os aspectos clínicos e anatomopatológicos após um longo período de infecção, situação esta não vivenciada normalmente por animais de corte (O'REILLY & DABORN, 1995; OIE, 2008).

A reduzida frequência observada nestes matadouros permite a sistematização da vigilância epidemiológica da doença a partir do rastreamento de propriedades foco (PEREZ *et al.*, 2002), podendo esta estratégia se tornar uma ferramenta preliminar, de baixo custo e auxiliar no processo de controle e erradicação da tuberculose bovina no Estado de Pernambuco, a exemplo do que foi mencionado em estudo anterior no Estado da Bahia (ALZAMORA FILHO, 2013).

Outro modelo que pode ser citado é um relato no Mato Grosso do Sul, onde um único bovino suspeito de tuberculose, avaliado na inspeção de rotina de um matadouro, impulsionou o início de uma epidemiológica retrospectiva, permitindo a detecção do foco, bem como a implementação de medidas de controle e saneamento (JORGE, 2010).

Na Argentina, experimentos realizados por Perez *et al.* (2002) sobre a tuberculose bovina em animais de matadouro, possibilitou estimar a prevalência e caracterizar a doença por meio da distribuição territorial dos bovinos abatidos.

Com relação aos achados anatomopatológicos, vários trabalhos apontam que a maioria das lesões sugestivas de tuberculose concentram-se na região torácica, sugerindo que a infecção ocorre principalmente por via aerógena (ARAÚJO, 2004; SOUZA *et al.*, 2003; SANDOVAL, 2012). Whipple *et al.* (1996), por exemplo, descreveram que 60% e 27% dos achados são visualizados na região torácica e na cabeça, respectivamente.

Neste contexto, a maior evidência do meio de transmissão da *Mycobacterium bovis* a um bovino está diretamente associada à localização das lesões observadas em matadouros, durante a inspeção *post-mortem* (PHILLIPS *et al.*, 2003).

Quanto à localização das lesões, um estudo com 400 bovinos tuberculosos definiu que 84% (336/400) apresentavam granulomas em linfonodos, semelhante ao encontrado no animal positivo do presente estudo, e a distribuição dos mesmos por ordem decrescente de acometimento foi: retrofaríngeos (49,2% - 183/336), mediastinais (24,4% - 91/336), mandibulares (6,4% - 24/336), traqueobrônquicos (3% - 12/336), mesentéricos (2,4% - 9/336) ou uma combinação destes (MILIAN-SUAZO *et al.*, 2000).

Um fator importante a destacar é que parte dos bovinos com infecção insipiente pelo *M. bovis* que chegam ao matadouro não apresentam ainda lesões necroscópicas características (MILIAN-SUAZO *et al.*, 2000; OKANO, 2007), o que dificulta a notificação da doença, justificando, desta forma, a colheita de fragmentos de linfonodos de todas as carcaças selecionadas. Pequenas lesões são identificadas apenas mediante técnicas mais apuradas, incluindo o diagnóstico microscópico (MCILROY *et al.*, 1986), como utilizado neste estudo.

Além disso, diversas enfermidades, como actinobacilose, piogranuloma estafilocócico, mucormicose, coccidioidomicose, pentastomíase, hidatidose policística e alguns tumores, devido à similaridade entre as lesões macroscópicas na carcaça, entram no diagnóstico diferencial para tuberculose bovina, necessitando de análise laboratorial para confirmação do caso (RIET-CORREA & GARCIA, 2001).

Neste estudo, a associação entre os achados de inspeção *post-mortem* de rotina em matadouros e o diagnóstico laboratorial, incluindo técnicas baciloscópicas, histopatológicas e microbiológicas, foi eficiente na identificação do *Mycobacterium* sp. a partir de fragmentos de tecidos lesionados.

A baciloscopia e a histopatologia de tecidos infectados, por apresentar baixo custo e rápida disponibilização do resultado, são recomendadas em matadouros-frigoríficos como método auxiliar na notificação da tuberculose e condenação de carcaças (CORNER, 1994; OKANO, 2007).

O método microbiológico através do meio de cultivo Ogawa-Kudoh, é uma excelente opção para o crescimento de micobactérias, devido à sua seletividade, além de ser econômico e apresentar uma boa sensibilidade, confirmando os casos de tuberculose, inclusive para amostras negativas à baciloscopia. A técnica é empregada em alguns Estados do Brasil e em outros países da América Latina (BRASIL, 2008), mas ainda não está amplamente disseminado nos laboratórios veterinários do país.

De acordo com a literatura, as micobactérias crescidas no meio de Ogawa-Kudoh formam típicas colônias de coloração creme a amareladas, pequenas, arredondadas, com

bordas irregulares e superfície granular (CORNER, 1994; MOTA *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2003), compatíveis com os isolados da presente pesquisa. A utilização do meio de Ogawa-Kudoh neste estudo demonstrou sua boa reprodutibilidade para o cultivo de micobactérias e uma alternativa na rotina laboratorial, visto que os meios mais clássicos, como Stonebrink-Leslie e Löwenstein Jensen apresentam maior custo no isolamento e laboriosidade na execução (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

7. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, foi possível concluir que a tuberculose bovina encontra-se presente no rebanho do Estado de Pernambuco, que se trata de uma enfermidade possível de ser identificada em animais provenientes de matadouros e que à inspeção *post-mortem*, apesar de apresentar limitações mostrou-se bastante eficaz.

A associação do processo de inspeção *post-mortem* a técnicas laboratoriais como a baciloscopia e a histologia, além do baixo custo e rapidez dos resultados, mostrou-se eficiente como método auxiliar em matadouros-frigoríficos, além do cultivo bacteriológico para o diagnóstico definitivo, o que irá contribuir para o correto destino da carcaça, corroborando com o controle da enfermidade e com as práticas de saúde pública, visto se tratar de uma zoonose.

Adicionalmente, a notificação de casos de tuberculose em matadouros serve como alerta às autoridades sanitárias do Estado para a adoção de estratégias que visem à investigação epidemiológica e, conseqüentemente, detecção dos focos da doença para promoção de saneamento, controle e erradicação.

8. REFERÊNCIAS

ABC DA SAÚDE. Tuberculose Pulmonar. Autor: Márcio Ataíde Lança. art. 432. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?432>>. Acesso em: 15.07. 2015.

ABRAHÃO, R. M. C. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. São Paulo; 1998. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. 1998.

ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco de transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. *Archives of Veterinary Science*, v.10, n.2, p.1-17, 2005.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. *Bacterioses and Mycoses*. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, p. 107-297. 2003.

ALZAMORA FILHO, F. Diagnóstico bacteriológico e molecular da tuberculose bovina a partir de lesões de bovinos abatidos no Estado da Bahia. 2013. (99)p. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

AMENI, G.; MIÖRNER, H.; ROGER, F.; *et al.* Comparasion between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberbulosis in Ethiopia. *Trop Anim. Health Prod.*, v. 32, p. 267-276, 2000.

ANTORE, A. 41% da produção de leite é clandestina. *Folha de São Paulo*, São Paulo, Caderno 3, p.1-4. 30 ago. 1998.

ARAÚJO, C. P. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cultura e sua identificação pela reação de polimerase em cadeia. 2004. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2004.

ARAÚJO, C. P.; LEITE, C. Q. F.; PRINCE, K. A.; *et al.* *Mycobacterium bovis* identification by molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 749-752. 2005.

BARKSDALE, L.; KIM, K. *Mycobacterium*. *Bacteriological*, v.41, p. 217-372, 1977.

BEER, J. *Doenças Infecciosas em Animais Domésticos*. Roca. 380p. São Paulo. 1988.

BERG, S.; GARCIA-PELAYO, M. C.; MÜLLER, B.; *et al.* African 2, a Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* Epidemiologically Important in East Africa. *Journal Bacteriology*, v. 193, n. 3, p. 670-678, 2011.

BERNHAGEN, J.; BACHER, M.; CALANDRA, T.; *et al.* An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J Exp Med*. 183:277–282. 1996.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. *Clínica veterinária*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1263p. 1989.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; *et al.* *Clinica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 818, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO. *Legislação nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal – PNCEBT*, 55p. 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BROWN, W. H.; DE ANDA, J. H. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. JAVMA, v. 212, 557-559, 1998.

CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M.; *et al.*. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. J. Comp. Pathol., v. 119, p. 27-44, 1998.

CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M.; *et al.*. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis* - inoculated Calves. J Comp Path. 121:321–337. 1999.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Diagnóstico de laboratório de la tuberculosis animal. Buenos Aires: CPZ, 48p. (Nota técnica, 26). 1972.

CHAN, J.; TANAKA, K.; CARROL, D.; *et al.*. Effect of nitricoxide synthese inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun., v. 63, n. 2, p. 736-740, 1995.

COELHO, H. E. Patologia Veterinária. Barueri:Manole, 234p. 2002.

COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. Infectious Diseases of Livestock (2ª ed., vol. 3, pp. 1965-1969, 1973-1987). Oxford Southern Africa. 2004.

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

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. 2ª ed. São Paulo: MEDSI - Editora Médica e Científica Ltda, p.317-335. 1992.

CORRY, J. E. L.; HINTON, M. H. Zoonoses in the meat industry: a review. *Acta Veterinaria Hungarica*, vol 45 (4), pp. 457 – 479 - 1997.

COSIVI, O.; GRANDE, J. M.; DABORN, C. J.; *et al.* Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, v.4, p.59-70, 1998.

FAYYAZI, A.; EICHMEYER, B.; SORURI, A.; *et al.* Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *J. Pathol.*, v. 191, p. 417-425, 2000.

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. *Higiene alimentar*, v. 11, n. 47, p. 9-13, 1997.

FURLANETTO, L. V.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE JÚNIOR, C. A.; *et al.* Prevalência de tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso. *Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.2, p.274-280, 2012.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 4^a ed. Editora Manole, Barueri-SP, 2010.

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

GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos a saúde pública. *Vet e Zootec.*, p. 38- 51, v. 16, n. 1, mar., 2009.

HIJJAR, M. A.; PROCÓPIO, M. J. Revisão Tuberculose - epidemiologia e controle no Brasil. *Tuberculose Artigos: Vol. 5, N. 2. Jun/Dez – 2006*.

HUCHZERMEYER, H. F. K. A. *et al.* Tuberculosis. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. *Infectious diseases of Livestock*. United Kingdom: Oxford University Press, p. 1425-1444. v. 2. 1994.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Veterinary pathology. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1415 p. 1997.

JORGE, K. S. G. Identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos e sua importância na ocorrência de tuberculose zoonótica. 2010. 97f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2010.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiol*, v.112, n.2-4, p.111-118, 2006.

KHAN, I. U. H.; YADAV, J. S. Development of a single-tube, cell lysis-based, genus-specific PCR method for rapid identification of Mycobacteria: optimization of cell lysis, PCR primers and conditions, and restriction pattern analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 424, p. 453-457, 2004.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech*. 53(4):241-5. 2001.

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

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

LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, p. 145-151, 2000.

MAROTTI, J.; GALHARDO. A.P.M.; FURUYAMA. R.J.; *et al.*. Amostragem em pesquisa clínica: Tamanho da amostra. *Revta Odontol. USP* 20 (2):186-194. 2008.

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

MELO, V. O.; SOARES, A. S.; ANDRADE, S. M. Avaliação do programa de controle da tuberculose em Londrina-PR no Ano de 1996. *Informe Epidemiológico do SUS* 8 (4):53-62. 1999.

MELO, L. E. H.; MELO, M. T.; ALMEIDA, A. V.; *et al.* Intercorrência entre tuberculose bovina e caprina: um fator de risco da tuberculose zoonótica no Estado de Pernambuco. *Anais 1º Congresso Brasileiro de Saúde Pública Veterinária, Guarapari, ES. (Resumo) 2005.*

MELO, L. E. H.; FERNADES, A. C. C.; SILVA, T. I. B.; *et al.* Estudo retrospectivo e prospectivo da intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose dos bovinos em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco. In: *Seminário Nacional Sobre Brucelose e Tuberculose Animal (SNBTA). 2010. Belo Horizonte, 2010.*

MELO, L. E. H.; MOTA, R. A.; MAIA, F. C. L.; *et al.* Ocorrência e caracterização da tuberculose em caprinos leiteiros criados no estado de Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 32(9):831-837, setembro 2012.

MENDES, E. I.; FERNADES, A. C. C.; SÁ, L. M. E.; *et al.* Prevalência da leucose enzoótica e da tuberculose dos bovinos em rebanho leiteiros do Estado de Pernambuco. In: *35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET). Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 2008.*

MICHEL, A. L.; MULLER, B.; VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Vet Microbiol.* 140:371-378. 2010.

MILIAN-SUAZO, F.; SALMAN, M. D.; RAMIREZ, C.; *et al.* Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. *Am J of Vet Res*, v. 61, 86-89, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tuberculose. 09 Abril 2014.
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/742-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/11-tuberculose/11937-tuberculose>. Acessado em: 15/04/2015.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Técnicas citológicas. In: CAPUTO L. F. G.; MOTA, E. M.; GITIRANA, L. B. (org). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Capítulo 4 - volume 2 - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010a.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Técnicas histológicas. In: CAPUTO L. F. G.; GITIRANA, L. B. ; MANSO, P. P. A. (org). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Capítulo 3 - volume 2 - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010b.

MONAGHAN, M.; DOHERTY, M. L.; COLLINS, D.; *et al.*. The tuberculin test. *Vet Microbiol.* 40:111-124. 1994.

MONTEIRO, P. H. T.; MARTINS, M. C.; UEKI, S. Y. M.; *et al.*. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 34, p. 171-174, 2003.

MOTA, P. M. P. C.; LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; *et al.*. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.53, n.4, 2001.

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

NEILL, S. D.; CASSIDY, J.; HANNA, J.; *et al.*. Detection of *mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Veterinary Record*, v. 135, n. 6, p. 134-135, 1994.

NEILL, S. D.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, v. 81, n. 1/2, p. 79-86, 2001.

NEILL, S. D.; SKUCE, R. A. POLLOCK, J. M. Tuberculosis: new light from an old window. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p. 1261-1269, 2005.

OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6th edition, 2008. Disponível em: <http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_Index.htm>. Acesso em: 26 JUN. 2015.

OKANO, W. Post mortem, citologia, histopatologia e bacteriologia no diagnóstico da tuberculose bovina – matadouro-frigorífico da Região Norte do Paraná / Werner Okano. – Botucatu [s.n.], 2007.

OLIVEIRA, P. R.; REIS, D. O.; RIBEIRO, S. C. A.; *et al.* Prevalência da tuberculose em carcaças e vísceras de bovinos abatidos em Uberlândia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 38, n. 6, p. 965-971, 1986.

OLIVEIRA, M. S. C.; CLEONI, A. M. L.; MOURA, M. M. F.. Análise do método ogawa-kudoh e comparação com o método lauril sulfato de sódio-lowenstein-jensen para diagnóstico da tuberculose no estado de Rondônia. *Revista Pesquisa & Criação - Volume 10, Número 2*, 127-137. Julho/Dezembro de 2011.

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

PAES, A. C. Tuberculose bovina. In: PIRES, A. V. *Bovinocultura de corte*. Piracicaba: FEALQ, 993 p. 2010.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*, v. 112, p. 181-190, 2006.

PEREIRA, M. A. V.; SCHAWANZ, V. S.; BARBOSA, C. G. Prevalência da cisticercose em carcaças de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro, submetidos ao controle do Serviço de Inspeção Federal (SIF-RJ), no período de 1997 a 2003. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, n. 1, p. 83-87, 2006.

PEREZ, A. M.; WARD, M.; TORRES, P.; *et al.* Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, v. 56, p. 63 – 74, 2002.

PHILLIPS, C. J. C.; FOSTER, C. R. W.; MORRIS, P. A.; *et al.* The transmissão of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res in Vet Sci*, n. 74, p. 1- 15, 2003.

PINTO, P. S. A. Atualização em controle da tuberculose no contexto da inspeção de carnes. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.19, n.1, p.115-121, 2003.

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

POTEL, K. *Tratado de Anatomia Patológica General Veterinária*. Zaragoza: Editorial Acribia, 480p. 1974.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; *et al.* *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*, p.677-680. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1737p. 2002.

RAJI, M. A.; SALAMI, S. O.; AMEH, J. A. Pathological conditions and lesions observed in slaughtered cattle in Zaria abattoir. *Journal of Clinical Pathology and Forensic Medicine*, v. 1, n. 2, p. 9-12, 2010.

RAVIGLIONE, M. C.; SNIDER, D. E. J.; KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic, *JAVMA*, v. 273, p. 220-226, 1995.

RIET-CORREA, F.; GARCIA, M. Tuberculose. In: RIET CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDÉZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. (org). Doenças dos Ruminantes e eqüinos. 2. ed. São Paulo, v.1, p.351-362. 2001.

ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A. B.; PAULA, A. *et al.* Tuberculose. In: Tarantino, A. B. Doenças Pulmonares. 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.233-97. 1990.

ROXO, E.. Tuberculose. In: GONÇALVES, C. A. *et al.* Zoonoses. Campinas. CATI, p. 115-20. 1995.

ROXO, E. *M. bovis* como causa de zoonose. Revista Ciências Farmacêuticas, v. 18, n. 1, p. 101-108, 1997.

RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis, v. 86, p. 77-109, 2006.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V.C.A.; *et al.* Tuberculose Bovina: alternativas para o diagnóstico. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.74, n.1, p.55-65, jan./mar., 2007.

SANDOVAL, H. O. F. Prevalencia y perdidas econômicas provocadas por tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) em uma planta faenadora de La Región de Los Lagos, 2006-2010. Boletín Veterinario Oficial, BVO, n.14, 16 p. I semestre 2012.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. Abate de Bovinos. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Boletim Técnico - PIE-UFES:007 - Editado: 01.08.2007.

SAUNDERS, B. M.; COOPER, A. M. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. Immunol. Cell. Biol., v. 78, p. 334-341, 2000.

SCOTT-ALGOOD, H. M.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Chemokines and tuberculosis. Cytokine Growth Factor Rev., v. 14, p. 467-477, 2003.

SENASA - SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL -. Plan Piloto de Vigilancia Epidemiologica de La Tuberculosis Bovina por Medio de La Faena em Frigorificos y Mataderos em La Provincia de Entre Rios. Buenos Aires, 53p, 2004.

SES, SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE. Tuberculose: 4,5 mil casos por ano em PE. 24/03/2015. <<http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/tuberculose-45-mil-casos-por-ano-em-pe>> Acesso em: 15.05. 2015.

SMITH, B. P. Medicina interna de grandes animais. 3Ed. São Paulo: Manole. p.588-589, 2006.

SOUZA, A. V.; SOUZA, C. F. A.; SOUZA, R. M.; *et al.*. A importância da tuberculose bovina como zoonose. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 22-27, 1999.

SOUZA, R. D.; REIS, D. O.; GUIMARÃES, K. C. S.; *et al.*. Linfonodos com maior frequência de localização para tuberculose bovina, em animais abatidos em um frigorífico sob inspeção federal, no município de Uberlândia – MG. Higiene Alimentar, v.17, n.106, p. 35-39, 2003.

TORRES, P. Situación de la tuberculosis en la Republica Argentina, Programa Nacional de Control y Erradicacións de la tuberculosis. SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Animal), Secretaria de Agricultura, Buenos Aires, 2004.

UNE, Y.; MORI, T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, v. 30; p. 415– 425; 2007.

UNGAR, M. L.; GERMANO, P. M. L. Prevalência da cisticercose bovina no Estado de São Paulo. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.26, n.3, p.167-172, 1992.

WATERS, W. R.; PALMER, M. V.; WIPPLE, D. L.; *et al.*. Diagnosis implications of antigens-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis* – infected cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol., v. 10, p. 960- 966, 2003.

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

WHIPPLE, D. L.; BOLIN, C. A.; MILLER, J. M. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Inv*, v. 8, p. 351-354, 1996.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T. P.; *et al.*. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction Identification un Bovine Lymphonode Biopsies and Genotyping in isolates from Southeast Brazil by Spolygotyping and restriction Fragment Length Polymorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 1- 5, 2001.