

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**TUBERCULOSE BOVINA: DIAGNÓSTICO
INTRADÉRMICO E EXAMES COMPLEMENTARES
EM PROPRIEDADE DE EXPLORAÇÃO LEITEIRA**

Mariana Assunção de Souza

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Fevereiro de 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**TUBERCULOSE BOVINA: DIAGNÓSTICO
INTRADÉRMICO E EXAMES COMPLEMENTARES
EM PROPRIEDADE DE EXPLORAÇÃO LEITEIRA**

Mariana Assunção de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima-Ribeiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Fevereiro de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S729t Souza, Mariana Assunção de, 1986-
2013 Tuberculose bovina: diagnóstico intradérmico e exames complementares em propriedade de exploração leiteira / Mariana Assunção de Souza. -- 2013.
78f. : il.
- Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Tuberculose em bovino -- Teses. I. Ribeiro, Anna Monteiro Correia Lima. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

*“Vive de tal forma que deixes pegadas
luminosas no caminho percorrido, como
estrelas apontando o rumo da felicidade e
não deixes ninguém afastar-se de ti sem
que leve um traço de bondade, ou um
sinal de paz da tua vida”.*

Joanna de Ângelis

In memoriam a minha querida avó Olinda,
pelos anos de convivência e ensinamentos.

Aos meus pais Evado e Dirce,
pelo amor compreensão e eterno incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de conhecimento intelectual e crescimento espiritual. Aos anjos protetores que nos guiam sempre pelo caminho do bem e alicerçam a nossa existência.

Aos meus pais Evaldo e Dirce e aos meus irmãos Patrícia, Nathália e Marcelo, pelo amor, apoio, compreensão, convivência e inspiração.

Ao meu namorado Guilherme, pelo carinho, companheirismo, amizade e torcida.

A minha querida amiga e professora orientadora, Dra. Anna Lima, pela confiança, orientação, ensinamentos e por todos os anos de agradável convivência, que sempre com muito entusiasmo e dedicação conduz o nosso grupo de pesquisa.

Ao médico veterinário do MAPA, Marconi Barros pela atenção que teve com o nosso trabalho, e pelo empenho em nos ajudar na realização desta pesquisa. Muito obrigada!

Ao médico veterinário Nélio Roberto Amâncio de Ávila, que mesmo não tendo o conhecido pessoalmente, foi muito gentil e atencioso nos enviando todas as informações necessárias a respeito da propriedade estudada.

As minhas queridas amigas Polly, Tati, Mariane, Muriell, Day, Gabi e Nádia. Muito obrigada pela importante ajuda nas coletas, por vezes de madrugada; na realização dos exames, pela troca de experiências e principalmente por todos nossos momentos felizes de convívio e união.

Aos funcionários do Frigorífico FRISAGO, que nos receberam e colaboraram na colheita do material de pesquisa.

A Dra. Silvia Zimmerman e Andréa Leão Carneiro Frezza, pela doação dos Kits de ELISA da IDEXX e colaboração na realização dos exames.

Ao querido amigo e técnico do Laboratório de Patologia Animal, Igor Castro, pelo auxílio e ajuda na confecção das lâminas de histopatologia.

A Profa. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros, pela atenção e valiosa ajuda na leitura das lâminas.

A médica veterinária Dra. Eliana Roxo, do Instituto Biológico de São Paulo pela doação do DNA de *Mycobacterium bovis*.

Aos amigos Sílvia, Jacque, Sandra, Beletinho, João Helder, Renatinha, Higor, Carla e Tathi que contribuíram muito para minha formação pessoal e profissional.

A técnica Andressa Souza, do Laboratório de Epidemiologia Molecular da UNESP Jaboticabal, pelo auxílio na técnica de PCR.

A CAPES e CNPq, pela concessão do apoio financeiro.

A todos os meus familiares, amigos, professores e técnicos da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Etiologia	3
2.2 Epidemiologia	4
2.2.1 Ocorrência da tuberculose bovina	4
2.2.2 Fontes de Infecção.....	4
2.3 Patogenia	6
2.4 Sinais Clínicos	7
2.5 Tuberculose como zoonose	8
2.6 Importância econômica	9
2.7 Diagnóstico	9
2.7.1 Diagnóstico Clínico	10
2.7.2 Diagnóstico Alérgico-cutâneo	11
2.7.3 Diagnóstico Bacteriológico	13
2.7.4 Exame Macroscópico	14
2.7.5 Diagnóstico Histopatológico	16
2.7.6 Diagnóstico Sorológico	17
2.7.7 Diagnóstico Molecular	18
2.7 Controle e Profilaxia	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Comitê de Ética na Utilização de Animais	23
3.2 Local	23
3.3 Tuberculinização	23
3.4 Colheita das amostras	24
3.4.1 Amostras de muco nasal	24
3.4.2 Amostras de sangue	25
3.4.3 Amostras de tecido	25

3.5 Testes de diagnóstico	25
3.5.1 Exame Macroscópico	25
3.5.2 Diagnóstico Histopatológico	26
3.5.2.1 Hematoxilina-Eosina (HE)	26
3.5.2.2 Ziehl Neelsen (ZN)	26
3.5.3 Diagnóstico Sorológico	27
3.5.3 Diagnóstico Molecular	27
3.5.3.1 Extração do DNA	27
3.5.3.2 Quantificação do DNA	29
3.5.3.3 Amostra do DNA de <i>Mycobacterium bovis</i>	29
3.5.4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase	29
3.6 Análise Estatística	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Tuberculinização	32
4.2 Exame Macroscópico	35
4.3 Diagnóstico Histopatológico	38
4.3.1 HE	38
4.3.2 ZN	41
4.4 Diagnóstico Sorológico	42
4.5 Diagnóstico Molecular	43
5 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	61
APÊNDICE	62

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente

cm - centímetros

DNA – ácido desoxirribonucléico

dTTP – desoxi-timidina trifosfato

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - enzyme-lynked imunnosorbent assay

g – gramas

g – força gravitacional

HE – Hematoxilina-Eosina

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgG – Imunoglobulina G

μL - microlitro

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar

M – molar

mm – milímetro

NaCl – Cloreto de sódio

pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

PK – Proteinase K

pmol - picomol

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

PPD – Derivado Protéico Purificado (Purified Protein Derivative)

p/v – peso/volume

SDS – dodecil sulfato de sódio

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – Tris-Borato-EDTA

TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

TCS – Teste Cervical Simples

TCC – Teste Cervical Comparativo

V – volts

x – vezes

ZN – Ziehl-Neelsen

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Lesões nodulares típicas de tuberculose em órgãos e carcaça de bovinos positivos no teste cervical comparativo. São Gotardo MG, 2012.....	37
Figura 2. Fotomicrografia de amostras de fígado de bovinos positivos no Teste Cervical Comparativo, obtidas em abate sanitário para Tuberculose bovina, São Gotardo, MG 2012.....	39
Figura 3. Fotomicrografia de amostras de pulmão e linfonodo mediastínico de bovinos positivos no Teste Cervical Comparativo, obtidas em abate sanitário para Tuberculose bovina, São Gotardo, MG 2012	40
Figura 4. DNA genômico total obtido a partir de muco nasal de bovinos reagentes ao teste cervical comparativo para tuberculose.....	44
Figura 5. Detecção do DNA de <i>Mycobacterium bovis</i> por PCR direto de <i>swab</i> nasal de bovinos positivos no teste cervical comparativo para tuberculose. DNA extraído de muco nasal foi usado como molde para a amplificação por PCR da sequência <i>RvD1Rv2031c</i> (500 pb)	46

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na PCR para identificação de <i>Mycobacterium bovis</i>	29
Tabela 2. Desenho do programa utilizado para amplificação do fragmento de DNA de <i>Mycobacterium bovis</i>	30
Tabela 3. Índice de sensibilidade dos exames complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em 40 animais reagentes ao teste cervical comparativo. São Gotardo MG, 2012	47

TUBERCULOSE BOVINA: DIAGNÓSTICO INTRADÉRMICO E EXAMES COMPLEMENTARES EM PROPRIEDADE DE EXPLORAÇÃO LEITEIRA

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência da tuberculose em um plantel bovino pelo teste cervical comparativo (TCC), e analisar a eficiência de exames complementares na confirmação da infecção. O estudo foi realizado em um rebanho de exploração leiteira no município de Perdizes MG. Realizou-se a tuberculinização em 164 bovinos, sendo que destes 40 foram encaminhados ao abate sanitário. A inspeção macroscópica *post mortem* das carcaças foi acompanhada de colheita de amostras de muco nasal, sangue e tecido (fígado, pulmão e linfonodo mediastínico) para os exames de PCR, ELISA e histopatológico com colorações de Hematoxilina-Eosina (HE) e Ziehl-Neelsen (ZN) respectivamente. Dos 164 bovinos avaliados pelo TCC, 41 (25%) foram positivos, 29 (17,68%) inconclusivos e 94 (57,32%) negativos. Dos 40 bovinos encaminhados para abate, 22 (55%) carcaças apresentaram algum tipo de lesão macroscópica sugestiva de tuberculose, sendo 14 (35%) nos linfonodos mediastínicos, sete (17,5%) no fígado e seis (15%) no pulmão. Nos achados histopatológicos visualizados em HE 13 (32,5%) carcaças apresentaram alterações histológicas, sendo seis (15%) nos linfonodos mediastínicos, cinco (12,5%) no fígado e três (7,5%) no pulmão. Não foi observada a presença de bacilos álcool-ácido resistentes em nenhuma das amostras avaliadas. O ensaio sorológico de ELISA/IDEXX identificou um (2,5%) animal reagente, e o teste de PCR detectou DNA de *M. bovis* em uma (2,5%) amostra. Por ser um rebanho leiteiro, a ocorrência da tuberculose pode representar um risco zoonótico. O TCC já deveria ser um exame de rotina obrigatório em toda propriedade que comercializa leite ou carne, pois reconhece infecções recentes, muitas vezes não detectadas em exames complementares.

Palavras-chave: ELISA, Histopatologia, *Mycobacterium bovis*, PCR, Tuberculina

BOVINE TUBERCULOSIS: INTRADERMAL TUBERCULIN TEST AND COMPLEMENTARY DIAGNOSTIC METHODS IN A DAIRY HERD

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the incidence of tuberculosis in a cattle herd by the cervical comparative intradermal tuberculin test (ITT), and analyze the efficiency of complementary diagnostic methods in confirming the infection. The study was conducted on a breeding dairy farm in the city of Perdizes MG. Tuberculin test was performed in 164 cattle, of which 40 were positive and slaughtered. The macroscopic *post mortem* inspection of carcasses was followed by the collection of nasal swabs, blood and tissue samples (liver, lung and mediastinal lymph node) for PCR tests, ELISA and histopathology with Hematoxylin-Eosin (HE) and Ziehl-Neelsen (ZN) respectively. Of the 164 cattle analysed by ITT, 41 (25%) were positive, 29 (17.68%) inconclusive and 94 (57.32%) negative. Of the 40 cattle slaughtered, 22 (55%) carcasses had macroscopic lesions suggestive of tuberculosis, 14 (35%) in the mediastinal lymph nodes, seven (17.5%) in the liver and six (15%) in the lung. The histopathology HE identified 13 (32.5%) carcasses with histological changes, six (15%) in the mediastinal lymph nodes, five (12.5%) in the liver and three (7.5%) in the lung. At ZN, the presence of acid-fast bacilli was not detected in any of samples tested. The ELISA/IDEXX identified one (2.5%) animal reagent, and the PCR test detected DNA of *M. bovis* in one (2.5%) cow. Being a dairy herd, the occurrence of tuberculosis may represent a zoonotic risk. The ITT should already be a routine test required for the farms that sells milk or meat, because it recognizes recent infections, often not detected by other diagnostic methods.

Keywords: ELISA, Histopathology, *Mycobacterium bovis*, PCR, Tuberculin

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina, enfermidade causada pelo *Mycobacterium bovis*, é uma zoonose cujo hospedeiro primário é o bovino. Outras espécies de mamíferos domésticos, animais selvagens e o homem são susceptíveis à infecção por este microrganismo (OIE, 2009). A doença caracteriza-se pelo desenvolvimento progressivo de lesões nodulares denominadas tubérculos, que podem localizar-se em qualquer órgão ou tecido (SOUZA, 1999).

A tuberculose bovina é endêmica em vários países principalmente naqueles em desenvolvimento com rebanhos de criações intensivas, como em bovinos leiteiros (ROXO, 1997), principalmente rebanhos estabulados (MEDEIROS, 2009). No Brasil os dados de notificações oficiais referente ao período de 1989 a 1998 indicaram uma prevalência média no país de 1,3% de animais infectados (BRASIL, 2006).

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser efetuado através de métodos diretos e indiretos. Atualmente no Brasil, o protocolo preconizado pela legislação em vigor recomenda a utilização de testes alérgicos de tuberculinização intradérmica. O exame se baseia na reação de hipersensibilidade tardia, mediada por linfócitos sensibilizados, deflagrada em indivíduos previamente expostos ao bacilo tuberculoso (ROXO et al. 1996). O teste apresenta boa sensibilidade e especificidade, sendo considerado pela OIE como técnica de referência (BRASIL, 2006).

O diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento do agente micobacteriano de lesões ou secreções de animais suspeitos. O exame bacteriológico é confiável e inequívoco considerado “padrão-ouro”, mas requer uma grande quantidade de bacilos viáveis, meios de cultivo específicos, descontaminação drástica da amostra, além de longo período para detecção das primeiras colônias (CORNER, 1994). Apesar de, nos recentes anos, vários métodos bacteriológicos terem sido desenvolvidos, nenhum deles pode ser empregado isoladamente (COSIVI et al., 1998), havendo sempre a necessidade do uso de técnicas complementares para o alcance de uma informação eficaz e completa (RUGGIERO et al., 2007).

A inspeção de rotina de carcaças em matadouros frigoríficos é importante no diagnóstico das lesões tuberculosas, porém o tempo destinado pode ser insuficiente, o que dificulta o exame mais detalhado. A inspeção de rotina só identifica cerca de 47% das lesões tuberculosas macroscopicamente detectáveis (CORNER, 1994). Entre os métodos de diagnóstico que poderiam complementar a inspeção *post mortem* estão os testes histopatológicos, com coloração dos tecidos por hematoxilina-eosina (HE); a baciloscopia, com coloração por Ziehl-Neelsen (ZN); e testes moleculares baseados nas reações em cadeia pela polimerase (PCR) (FURLANETTO et al. 2012).

Testes como o enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) podem ser utilizados como exames complementares aos ensaios baseados na imunidade humoral, e se mostram úteis na identificação de animais anérgicos e com quadros de tuberculose avançada. Em alguns países há a utilização de ELISA associado ao teste de tuberculina em programas de controle sanitário (POLLOCK; NEILL, 2002; LINLENBAUM; FONSECA, 2006; WATERS et al., 2011).

Existem vários métodos de diagnóstico adequados para o controle e erradicação da tuberculose bovina, entretanto, não há um método diagnóstico que tenha uma eficácia absoluta. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência da tuberculose em um plantel bovino pelo teste de tuberculinização, e analisar a eficiência de exames complementares (macroscópico, histopatológico, sorológico e molecular) na confirmação da infecção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

A tuberculose é causada por bacilos imóveis, não esporulados, aeróbios, não capsulados e não flagelados, medindo de 0,3 a 0,6 µm de largura por 1 a 4 µm de comprimento. As micobactérias que causam tuberculose em mamíferos pertencem à Classe Actinobacteria, Ordem Actinomycetales, Família Mycobacteriaceae, Gênero *Mycobacterium* e fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* um grupo de espécies relacionadas constituído, atualmente, por sete espécies – *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum* (componentes clássicos), *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipeddi* – responsáveis por infecção em diferentes mamíferos (SMITH et al., 2006).

Algumas micobactérias, exceto as do complexo *M. tuberculosis*, denominadas de MOOT (*mycobacteria other than tubercle bacilli*), também chamadas de micobactérias “atípicas”, “anônimas”, “não classificadas”, “saprófitas”, “oportunistas”, “não tuberculosas” e, mais atualmente, “ambientais”. Essas micobactérias estão divididas em potencialmente patogênicas ou não patogênicas para o homem. Entre as potencialmente patogênicas, destaca-se o *M. avium*, pertencente ao complexo *M. avium*, MAC ou MAIS, se a estirpe *M. scrofulaceum* estiver incluída (HAAGSMA, 1995; KONEMAN et al., 1993).

As micobactérias assim como bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), isto é, quando corados pela fuccina a quente resistem à descoloração com álcool-ácido - coloração de Ziehl-Neelsen (EISENSTADT; HALL, 1995; ROXO, 1997).

2.2 Epidemiologia

2.2.1 Ocorrência da tuberculose bovina

A tuberculose bovina possui distribuição mundial, mas a sua prevalência é maior em países em desenvolvimento onde o conhecimento da epidemiologia da doença e as ações concretas para o seu controle são limitadas (REVIRIEGO GORDEJO; VERMEERSCH, 2006). No Brasil, a situação da tuberculose bovina não se encontra bem delineada, pois os estudos disponíveis são escassos e não sistematizados. Dados de notificações oficiais da tuberculose bovina indicam prevalência de 3,3% e 1,2% para os períodos de 1967 a 1976 e de 1988 a 1992, respectivamente, e média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2006).

Existe uma estimativa de ocorrência em torno de 5,7% do rebanho nacional, destes, 0,14% corresponde aos achados de lesões em matadouros (KANTOR; RITACCO, 1994; ROXO, 1997). Estudos isolados realizados em diferentes estados a partir do exame de carcaças em matadouros-frigoríficos estimaram prevalência de tuberculose bovina de 0,17% em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 1986), 5,16% no Pará (ALFINITO; OLIVEIRA 1986), 0,36% em São Paulo (RICCETTI et al., 1989) e 0,64% no Rio Grande do Sul (ANDRADE et al., 1991). Mais recentemente, no estado de Minas Gerais foi realizado um estudo para avaliar a prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em 11 matadouros sob Inspeção Federal nos anos de 1993 a 1997. Nesse período foram abatidos 954.640 bovinos, e diagnosticados 681 casos de tuberculose, indicando prevalência de 0,8% (BAPTISTA et al., 2004).

2.2.2 Fontes de infecção

A transmissão da tuberculose bovina pode ser influenciada por diversos fatores, tais como idade, comportamento animal, ambiente, clima, e práticas de manejo (NEILL et al., 2001). A principal fonte de infecção para os rebanhos é o bovino infectado, sendo que a aquisição de animais infectados sem o conhecimento

da situação sanitária que os mesmos se encontram, é a mais importante forma de introdução da tuberculose em um rebanho bovino (BRASIL, 2006).

Várias espécies da fauna silvestre estão relacionadas à manutenção e transmissão de *M. bovis* em todo o mundo. Os reservatórios de fauna silvestre podem dispersar o bacilo tuberculoso por uma variedade de vias como secreções respiratórias, urina ou fezes, sendo que a via de transmissão principal dependerá do tipo de interação entre as populações de diferentes espécies (THOEN et al., 2006). A infecção ocasionada pelo *M. bovis* já foi reportada em diversas espécies animais em todo o mundo (THOEN et al., 2006). Santos et al. (2009) reportaram a ocorrência de veados catingueiros de criatório conservacionista positivos na tuberculinização. Os quatro cervídeos testados apresentaram reações positivas, sendo que dois evoluíram para óbito em menos de 60 dias do teste e os outros dois após três meses. Os pesquisadores concluíram que os veados catingueiros podem representar possíveis reservatórios de *M. bovis* e, conseqüentemente, disseminadores de tuberculose para outros animais.

O bacilo pode ser eliminado pela respiração, leite, fezes, corrimento nasal, urina, secreções vaginais e uterinas e pelo sêmen (ABRAHÃO, 1989; JÚNIOR; SOUZA, 2008). Um grande número de bacilos pode ser eliminado pelas fezes de animais tuberculosos, contaminando as pastagens; contudo tal via de transmissão não parece possuir importância epidemiológica (JÚNIOR; SOUZA, 2008).

A distribuição das lesões tuberculosas encontradas em bovinos naturalmente infectados mostra que 80 a 90% destas infecções ocorrem pela via respiratória sendo esta a porta de entrada mais frequente (MORRIS et al., 1994). A transmissão por esta via é facilitada pela convivência natural, em especial em rebanhos com alta densidade populacional e substancial movimentação de animais. A excreção respiratória seguida pela inalação de *M. bovis* é considerada a principal via através da qual a transmissão bovino-para-bovino ocorre (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

A ingestão de *M. bovis* a partir da ingestão de carcaças infectadas ou de pastagem, água e fômites contaminados são considerados uma via de infecção secundária à respiratória devido a uma quantidade menor de casos de bovinos com lesões mesentéricas. Embora menos freqüente, a transmissão pela via orofaríngea é a principal forma de contaminação para bezerros jovens que se alimentam de leite

materno ou colostro contaminado por *M. bovis* proveniente de vacas tuberculosas (NEILL et al., 1994).

2.3 Patogenia

A tuberculose bovina é uma enfermidade de evolução crônica, caracterizada pela formação de lesões do tipo granulomatosa, de aspecto nodular, denominado tubérculo. A via oro-faríngea é a principal porta de entrada do bacilo da tuberculose em bovinos, favorecendo o aparecimento de lesões, principalmente nos gânglios brônquicos e/ou mediastínicos. Uma vez instalado no alvéolo, o bacilo é capturado por macrófagos alveolares, ativados por linfócitos do tipo T, e o seu destino será determinado por fatores como virulência do microrganismo, carga infectante e resistência do hospedeiro (SOUZA et al., 1999).

A via de infecção por *M. bovis* pode ser deduzida a partir da localização das lesões *post mortem*. Lesões restritas à cavidade torácica sugerem que a infecção ocorreu pela inalação de aerossóis, enquanto que as lesões encontradas nos linfonodos mesentéricos sugerem que a infecção foi adquirida pela ingestão do agente (POLLOCK; NEILL, 2002). No entanto, com a generalização da infecção as lesões podem ser encontradas em praticamente todos os órgãos (ROXO, 1997).

Após a infecção, há uma interação inicial entre os macrófagos alveolares e micobactérias, que definirá os eventos posteriores e decidirá as conseqüências da exposição aos bacilos (POLLOCK; NEILL, 2002). A bactéria pode ser morta e eliminada do hospedeiro, permanecer latente no hospedeiro, levar ao desenvolvimento da tuberculose ativa, ou reativar da latência em alguma etapa no futuro (WELSH et al., 2005).

De acordo com Tortora et al. (1998), se os bacilos não são destruídos, os fagócitos tendem a protegê-los dos anticorpos e outras defesas imunes, e muitos sobrevivem e se multiplicam dentro dos fagócitos. Os macrófagos e outras células defensivas se acumulam no sítio de infecção, formando uma camada circundante. Isto leva a uma lesão fechada, denominada tubérculo, uma característica que dá a doença seu nome.

Os macrófagos assumem uma aparência distinta e são chamados de células epitelióides, ou fundem-se formando células gigantes com numerosos núcleos periféricos, denominadas “células de Langhans”. Esse conjunto forma o centro do granuloma tuberculoso com necrose caseosa na qual pode-se observar mineralização por precipitação de sais de cálcio (SOUZA et al. 1999). Em seguida, uma camada de linfócitos e, em casos mais avançados, uma camada de fibroblastos torna a lesão circunscrita. Um nódulo pulmonar calcificado associado à lesão no linfonodo regional denomina-se “complexo primário” (MORRIS et al. 1994; NEILL et al., 1994; ROXO, 1997). Os nódulos caseosos podem tornar-se confluentes e formar lesões cavitárias (ROXO, 1996).

A maioria dos macrófagos circundantes não são muito bem sucedidos em destruir as bactérias, mas liberam enzimas e citocinas que causam uma inflamação lesiva ao pulmão. Após várias semanas, o interior do tubérculo torna-se caseoso. Os bacilos da tuberculose são microaerófilos, não crescem bem nessa localização. Contudo muitos permanecem dormentes durante anos, e servem como base para a reativação posterior da doença. Em alguns casos, contudo, a lesão caseosa aumenta lentamente e torna-se menos pastosa e mais líquida, um processo denominado liquefação. As condições dentro da cavidade começam a favorecer a proliferação dos bacilos da tuberculose, os quais começam então a se multiplicar pela primeira vez fora dos macrófagos. A doença agora torna-se altamente contagiosa; o líquido produz eficiente gotículas em aerossol quando tossido, e as bactérias começam a escapar do tubérculo. Estes microorganismos começam a penetrar nas vias aéreas do pulmão, e então no sistema circulatório e linfático (TORTORA et al., 1998).

2.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos mais sugestivos da tuberculose são: caquexia, linfonodos aumentados de tamanho, na auscultação áreas de silêncio pulmonar e, em alguns casos, tosse, dispnéia, mastite e infertilidade (CORRÊA; CORRÊA 1992; ROXO, 1997; BRASIL, 2006). A mastite tuberculosa é de difícil diagnóstico, não alterando as características físico-organolépticas do leite (ROXO, 1997). Bovinos tuberculosos,

quando submetidos ao trabalho, não acompanham os outros animais e demonstram cansaço e baixa capacidade respiratória. A dificuldade em se ganhar ou manter o peso e quedas na produção de leite também são relatadas (BRASIL, 2003; OLMSTEAD; RHODE 2004).

O estabelecimento da doença pode ser favorecido por fatores como má-nutrição, doenças intercorrentes, aumento da produção leiteira e gestação. No período inicial da infecção podem não haver sintomas, os sinais clínicos ocorrem em casos mais avançados (HAAGSMA, 1995; NEILL et al., 1994).

2.5 Tuberculose como zoonose

A tuberculose zoonótica, como é chamada a infecção no homem determinada por *M. bovis*, é reconhecidamente uma ameaça à saúde pública em países em desenvolvimento (THOEN et al., 2006). A contaminação no homem dá-se, em grande parte, quando crianças consomem leite contaminado, mas também pode ocorrer por inalação (RADOSTITS, 2000). As lesões costumam concentrar-se no trato digestivo, contudo, a infecção pulmonar ou outras manifestações não pulmonares da doença, como a linfadenite cervical, também podem ocorrer (GRANGE; YATES, 1994).

Em países industrializados, a infecção humana por *M. bovis* tem sido controlada em grande parte pela pasteurização do leite de vaca, inspeção de matadouros, e testes obrigatórios de diagnóstico com abate do gado bovino reativo (ROMERO et al., 2006). No Brasil, apesar da existência do Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), ainda ocorre a comercialização da carne e leite sem controle sanitário, o que representa uma ameaça à saúde pública, já que a ingestão desses produtos é uma possível via da infecção aos seres humanos (ABRAHÃO et al., 2005).

A transmissão da tuberculose bovina para seres humanos ocorre principalmente em pessoas que lidam diariamente e diretamente com animais vivos, assim como os trabalhadores de abatedouros e magarefes, trabalhadores de laticínios e laboratórios (LINS et al., 2010), o que reforça o caráter ocupacional da enfermidade. Trabalhadores do setor pecuário/agrícola podem adquirir a doença

através da inalação de aerossóis em matadouros ou quando da tosse de bovinos infectados e assim desenvolverem quadro de tuberculose pulmonar típica. Pode haver também a transmissão desses pacientes para os bovinos, mas a transmissão do *M. bovis* entre seres humanos é reportada como limitada (COSIVI, et al., 1998).

2.6 Importância econômica

A importância econômica atribuída à tuberculose bovina está baseada nas perdas diretas resultantes da condenação de carcaças em matadouros, da queda no ganho de peso e diminuição da produção de leite, do descarte precoce e eliminação de animais de alto valor zootécnico (LILENBAUM, 2000; PACHECO et al., 2009). Um animal tuberculoso pode apresentar 10 a 25% de queda na capacidade produtiva, além de ser um foco da doença para outros animais, e o homem (ROXO, 1996).

Países da América Latina, pressionados pelas perdas econômicas causadas pela tuberculose e com o propósito de assegurar o mercado de exportações, e se posicionar no mercado internacional, estão sendo sensibilizados a atender as exigências relacionadas ao manejo sanitário do rebanho e a adotar medidas para o controle de zoonoses de relevância para a saúde pública, estabelecendo e mantendo áreas livres de enfermidades (OLMSTEAD; RHODE 2004; KANTOR; RITACCO, 1994).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser efetuado através de métodos diretos e indiretos. Nos diretos há a detecção e identificação do agente etiológico no material biológico enquanto que nos métodos indiretos é pesquisada uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral (produção de anticorpos circulantes) ou celular (medida por linfócitos e macrófagos) (PACHECO et al., 2009).

O diagnóstico da infecção em bovinos *in vivo* é realizado através de métodos indiretos, notadamente os testes imunológicos baseados na resposta mediada por

células, como a intradermorreação (LILENBAUM, 2000). O diagnóstico *post mortem* anatomopatológico ou exame macroscópico, apresenta considerável dificuldade, uma vez que muitos processos inflamatórios granulomatosos possuem características morfológicas semelhantes às descritas para aquelas advindas da tuberculose (REIS et al. 1995).

Entre os métodos de diagnóstico que poderiam complementar a inspeção *post mortem* estão os testes histopatológicos, com coloração dos tecidos por hematoxilina-eosina; a baciloscopia, com coloração por Ziehl-Neelsen; a cultura bacteriológica; e também testes moleculares baseados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) (FURLANETTO et al., 2012).

2.7.1 Diagnóstico Clínico

A grande variabilidade de sintomas e lesões, bem como o caráter crônico da tuberculose, faz com que o diagnóstico clínico tenha valor relativo, porque o animal pode estar infectado, com um foco localizado, e aparentar-se sadio (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Estudos com animais inoculados com *M. bovis* em contato com animais não inoculados demonstraram que não havia sinais clínicos compatíveis com a enfermidade nos dois grupos (CASSIDY et al., 1999). Nos casos de tuberculose avançada, o diagnóstico clínico assume maior importância, pois os animais em geral apresentam decréscimo da sensibilização alérgica, podendo, por vezes, chegar à anergia (BRASIL, 2006).

O exame clínico inclui a auscultação, a percussão, a termometria e a palpação de glândulas mamárias e linfonodos superficiais. Neste último caso, são avaliados principalmente a exarcebação da sensibilidade dolorosa (após a tuberculinização) e a presença de linfadenomegalia. Também são sinais clínicos que devem ser levados em consideração a manifestação intensa de cansaço, a ocorrência de tosse seca não produtiva, a eliminação de secreção nasal e a manifestação de dispnéia (ROXO, 1997). Podem ser reconhecidos também sinais de broncopneumonia com tosse úmida (com presença de escarro) seguida de dispnéia e taquipnéia. Animais tuberculosos, quando submetidos à marcha forçada, tendem a

posicionar-se atrás dos demais, demonstrando cansaço e baixa capacidade respiratória (FUNDEPEC, 2009).

2.7.2 Diagnóstico Alérgico- cutâneo

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose Animal (PNCEBT), instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), determina como método padrão de diagnóstico da tuberculose bovina, a tuberculinização intradérmica.

A tuberculinização é um método rápido, seguro e econômico e serve para pesquisar a sensibilidade dos animais às tuberculoproteínas específicas. Pode revelar infecções incipientes a partir de três a oito semanas da exposição ao *Mycobacterium*, alcançando boa sensibilidade e especificidade. Para que realmente funcione como ferramenta diagnóstica em um programa de controle, é indispensável que o procedimento seja padronizado quanto à produção das tuberculinas, equipamentos para realização das provas, tipos de provas e critérios de leitura (BRASIL, 2006).

O exame intradérmico possui três modalidades, ou seja, prega caudal, cervical simples e cervical comparativo. O teste da prega caudal e cervical simples são empregados como testes de triagem em pecuária de corte e leite, respectivamente. O teste cervical comparativo é utilizado como teste confirmatório, por causa de sua maior especificidade em relação aos testes simples. Esse teste permite eliminar a maior causa de reações falso-positivas, que são as infecções por micobactérias ambientais ou pelas do complexo MAIS, que não são patogênicas para os bovinos e bubalinos, entretanto provocam reações inespecíficas à tuberculinização, dificultando o diagnóstico da tuberculose nessas espécies (NEILL et al., 2001; JORGE, 2001).

A reação alérgica à tuberculina é uma reação de hipersensibilidade retardada tipo IV mediada por resposta celular e com baixa produção de anticorpos. Após a inoculação em animal previamente sensibilizado, a tuberculina é fagocitada e seus peptídeos apresentados na superfície celular dos macrófagos. A resposta específica tem início quando os linfócitos T sensibilizados reconhecem os antígenos

tuberculínicos e secretam citocinas, que ativam células endoteliais venulares e que por sua vez recrutam monócitos e leucócitos do sangue, enquanto outras citocinas convertem os monócitos em macrófagos ativados capazes de eliminar o antígeno. Macroscopicamente a resposta se manifesta na forma de edema e endurecimento progressivo no local da aplicação que atinge seu máximo por volta de 72 horas pós-inoculação, diminuindo em seguida (CORRÊA; CORRÊA, 1992; BRASIL, 2008).

O teste de tuberculina em bovinos apresenta uma sensibilidade com variação entre 32 a 99% e uma especificidade de 75,5 a 99,9% (VITALE et al., 1998). Alguns animais, ainda que infectados, não respondem aos testes tuberculínicos. Fatores como, infecção recente, final de gestação, desnutrição e doença avançada podem ocasionar falsos negativos aos testes. Tais resultados podem ocorrer por variações inerentes ao próprio teste ou por variações na leitura e interpretação do exame (BRASIL, 2006). Contudo, animais em estado avançado de infecção podem manifestar o fenômeno de anergia, definido como ausência de reatividade cutânea à tuberculina em indivíduos previamente sensibilizados (ROXO, 1996).

Como antígenos para desencadear a reação de hipersensibilidade são empregadas tuberculinas sintéticas de dois tipos: o PPD bovino, procedente do *M. bovis*; e o PPD aviário proveniente do *M. avium* (MONAGHAN et al., 1994). Para realização do Teste Cervical Comparativo (TCC) deve-se observar as seguintes condições e critérios:

I – inoculação por via intradérmica na dosagem de 0,1mL de tuberculina PPD aviária inoculado cranialmente e o PPD bovino caudalmente, havendo uma distancia mínima de 15 a 20cm entre as duas inoculações, que deverão ser feitas na região cervical ou na região escapular de bovinos. A inoculação deverá ser efetuada de um mesmo lado de todos os animais do estabelecimento de criação.

I - o local da inoculação será demarcado por tricotomia e a espessura da dobra da pele medida com cutímetro antes da inoculação; As medidas da dobra da pele do local da inoculação da PPD aviária e PPD bovino serão anotadas.

III - após 72 horas, mais ou menos 6 horas da inoculação, será realizada nova medida da dobra da pele, no local de inoculação.

IV – o aumento da espessura da dobra da pele será assim calculado:

(ΔA e ΔB) corresponde à diferença de aumento da dobra da pele provocada pela inoculação do PPD aviário e bovino, respectivamente; ($\Delta B - \Delta A$) corresponde ao resultado obtido por meio da diferença entre as medidas. Os resultados das diferenças ($\Delta B - \Delta A$) são interpretados de acordo com os critérios definidos na Tabela 1 do Regulamento Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Tabela 1 – Interpretação do teste cervical comparativo em bovinos.

	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Interpretação
$\Delta B < 2,0$	-	negativo
$\Delta B < \Delta A$	< 0	negativo
$\Delta B \geq \Delta A$	0,0 a 1,9	negativo
$\Delta B > \Delta A$	2,0 a 3,9	inconclusivo
$\Delta B > \Delta A$	$\geq 4,0$	positivo

Testes intradérmicos não são 100% específicos (MONHAGAN, 1994), 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. Assim, a confirmação de animais reativos através de outros métodos muitas vezes se torna necessária para garantir a confiabilidade do diagnóstico (FRAGUÁS et al., 2008).

2.7.3 Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico definitivo da tuberculose é realizado mediante o isolamento e a identificação do agente por métodos bacteriológicos. É um método seguro e considerado “padrão-ouro”, porém, requer meios de cultivo específicos, descontaminação da amostra, além de longo período para que se obtenha as primeiras colônias (30 a 90 dias) (PINTO et al., 2002), para que obtenha ainda bons resultados na bacteriologia é necessário que os tecidos estejam em boas condições, portanto, a coleta, armazenagem e o tempo até o recebimento no laboratório são fundamentais para o sucesso do isolamento (CORNER, 1994).

O crescimento de *M. bovis* pode durar até mais de oito semanas (WARDS et al., 1995), e em um meio sólido apropriado com piruvato, as colônias são de aspecto liso e de coloração esbranquiçada. Padrões de crescimento característico e

morfologia colonial podem prover um diagnóstico presuntivo de *M. bovis* (OIE, 2008).

Na comparação entre os dois processamentos, Araújo et al. (2005), realizaram estudo anatomopatológico e microbiológico de 72 amostras teciduais provenientes da inspeção post-mortem de bovinos em matadouros-frigoríficos de Mato Grosso do Sul. As lesões sugestivas de tuberculose concentravam-se em linfonodos da região torácica. O exame histopatológico utilizado foi o método hematoxilina-eosina (HE) no qual revelou granuloma em 74% das amostras. No exame microbiológico, 23,6% das amostras cultivadas em meio de Stonebrink apresentaram crescimento de bacilos álcool ácido resistentes em até 23 dias de incubação. Esses resultados reforçam a necessidade de que as lesões sugestivas de tuberculose sejam avaliadas simultaneamente através de mais de um recurso diagnóstico.

2.7.4 Exame Macroscópico

Na inspeção *post-mortem*, pelo exame macroscópico, são detectadas as lesões sugestivas de tuberculose que vão servir de subsídio a formulação do diagnóstico e posterior julgamento da carcaça, conforme os critérios do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA,1962 (MIRANDA et al., 1998). O exame *post-mortem*, realizado pela inspeção sanitária, é uma etapa essencial para o diagnóstico da tuberculose bovina. No entanto, o resultado só pode ser dado como “suspeita diagnóstica”, já que se trata apenas da análise macroscópica da lesão encontrada (BRASIL,1997).

As lesões provocadas pelo *M. bovis* não são patognomônicas da tuberculose bovina. As mesmas apresentam coloração amarelada em bovinos e ligeiramente esbranquiçadas em búfalos. Lesões típicas de tuberculose são localizadas superficialmente ou profundamente, como tubérculos firmes e grosseiros ou construídos a partir de superfícies mucosa ou serosa (HEADLEY, 2002). São nódulos de 1 a 3 cm de diâmetro ou mais, que podem ser confluentes, com aspecto purulento ou caseoso, presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar necrose de

caseificação no centro da lesão, ou ainda, calcificação nos casos mais avançados (BRASIL, 2006).

O tempo destinado para a inspeção de abate pode ser insuficiente para detectar todas as lesões, o que dificulta o exame mais detalhado, além das lesões não visíveis. A rotina de inspeção de carnes pode ser inadequada para identificar lesões discretas e esse fato pode ser observado quando não se identificam lesões de abate de animais reagentes à tuberculinização. A inspeção atenta de pelo menos seis pares de linfonodos entre os da cabeça, torácicos, mesentéricos e da carcaça e em outros órgãos como o pulmão, fígado, baço, rim, úbere e órgãos genitais pode identificar até 95% dos animais com lesões macroscópicas (CORNER, 1994; MORRIS et al., 1994; MENZIES; NEILL, 2000).

O exame macroscópico das carcaças na linha de inspeção apresenta certa dificuldade, uma vez que muitos processos inflamatórios granulomatosos possuem características morfológicas semelhantes às descritas para aquelas advindas da tuberculose (REIS et al., 1995), por isso existe a necessidade de complementação desse diagnóstico por meio do estudo histológico e bacteriológico de lesões macroscopicamente similares à tuberculose (ANDRADE et al., 1991). A inspeção de abate possui sensibilidade baixa, mas seu custo é eficaz para monitorar lesões nos animais (CORNER, 1994).

Situações onde os bovinos positivos aos testes tuberculínicos não apresentem lesões visíveis à necropsia podem ocorrer. Fraguás et al. (2008) identificaram ocorrência de 72,16% de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose em bovinos reagentes ao teste cervical comparativo. Alguns aspectos podem estar envolvidos, tais como: os animais estarem no estágio inicial da doença, lesões estarem localizadas em partes do corpo que geralmente não são examinadas na inspeção de rotina ou contato com outras micobactérias que não o *M. bovis* (SOUZA et al., 1999). Por isso, Para diferenciar falso-positivos de lesões não observadas, é necessário que se faça uma inspeção *post mortem* bem minuciosa, o que muitas vezes é difícil de realizar em matadouro (ROXO, 1997).

Quando se utiliza do exame macroscópico nas linhas de inspeção dos abatedouros, bons resultados são alcançados pelos programas de controle, implementados em regiões com alta prevalência da doença (CORNER, 1994).

Porém, à medida que a prevalência diminui, a identificação dos rebanhos remanescentes se torna progressivamente mais difícil. Embora atualmente não haja nenhum método de diagnóstico, *ante* ou *post mortem*, capaz de identificar todos os animais infectados com *M. bovis*, a detecção se torna mais sensível quando mais de um método de diagnóstico é usado (WHIPPLE et al., 1996).

2.7.5 Diagnóstico Histopatológico

O diagnóstico histopatológico consiste na análise de lesões presentes em material colhido geralmente *post mortem* (BRASIL, 2006). Fragmentos de tecidos com lesões sugestivas de tuberculose podem ser enviados para exame histopatológico em frascos de boca larga, hermeticamente fechados, imersos em solução de formaldeído a 10% (BRASIL, 2003). Depois de serem fixados, incluindo a parafina e microtomizados, os corte histológico dos tecidos lesados podem ser submetidos à coloração de hematoxilina-eosina (HE), e examinados sob microscopia de luz.

A morfologia e organização do granuloma característico da tuberculose possui uma cápsula conjuntiva; adjacente a ela há presença de infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente constituídos por macrófagos e linfócitos; também são observadas células epitelióides, células gigantes tipo Langhans delimitando a área de necrose de caseificação que no seu interior pode conter material amorfo basofílico, resultado da calcificação distrófica (CASSIDY et al., 1999).

Os métodos histológicos empregados para o diagnóstico de tuberculose são rápidos e baratos, contudo, apresentam baixa especificidade e sensibilidade (FURLANETTO et al., 2012). Outros agentes que não o *M. bovis* podem produzir lesões semelhantes à da tuberculose bovina, dificultando o diagnóstico (KANTOR et al., 1981; REIS et al., 1995).

No corte histológico pode ser empregado ainda, coloração especial para visualização de micobactérias. O método clássico de coloração é o Ziehl-Neelsen ou método de coloração a quente e sua variante Fite Faraco. Nesta metodologia as lâminas histopatológicas são coradas com o corante Fucsina e Azul de Metileno (VARELLO et al., 2008). E os bacilos, forma das micobactérias, são visualizados

como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, isolados, aos pares ou em grupos corados em vermelho com o fundo azul (BRASIL, 2004).

Amostras frescas também podem ser fixadas em lâminas e coradas pelo método de Ziehl-Neelsen para a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), contudo a sensibilidade do método é baixa, e um resultado positivo sugere fortemente tratar-se de micobactéria, mas não informa a espécie. Essa mesma colocação pode ser empregada para colônias isoladas em meios de cultura. Muitas características, inclusive a propriedade tintorial, superpõem-se nos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia*, tornando difícil, em alguns casos, a diferenciação de ambos (BRASIL, 2006).

2.7.6 Diagnóstico Sorológico

As infecções micobacterianas determinam primariamente o aparecimento de resposta imune de natureza predominantemente celular, (POLLOCK et al., 2005), por isso teste sorológicos são menos eficientes para detectar o bovino doente nos primeiros estágios da infecção, quando os níveis de anticorpos são baixos (WELSH et al., 2005).

Pollock e Neill (2002) mediram a função das respostas de células B e reportaram que essas células induziram a produção de anticorpos nas etapas avançadas da tuberculose bovina. Este fato foi reforçado por Welsh et al.(2005), que demonstraram o progresso da resposta imunológica celular para humoral em todos os animais tuberculosos analisados. A progressão da doença pode explicar a anergia de alguns bovinos infectados aos testes comuns baseados na hipersensibilidade tardia. A ausência da resposta celular nos animais infectados ocorre em particular quando a carga bacteriana é alta (McNAIR et al., 2000).

Entretanto, existem várias vantagens para o uso dos métodos sorológicos como ELISA para o diagnóstico da tuberculose bovina. Esses testes requerem somente uma manipulação dos animais e somente uma visita do veterinário a fazenda. A amostragem sanguínea pode ser repetida com a frequência necessária sem alterar o estado imune do animal. A interpretação é baseada nos valores numéricos e é mais objetiva que a observação da reação de hipersensibilidade na

pele do animal (LILENBAUM et al., 2001; MEDEIROS, 2009). Para diagnosticar o gado bovino infectado por *Mycobacterium bovis*, os antígenos geralmente empregados são o PPD ou antígenos purificados de *M. bovis* isolados ou associados (LILENBAUM et al., 1999; LILENBAUM et al., 2001; WATERS et al., 2011).

Waters et al. (2011) utilizaram kit comercial de ELISA/IDEXX, e verificaram 63% de sensibilidade do teste em soro sanguíneo de bovinos reagentes aos testes de tuberculinização intradérmica e/ou histopatológico e/ou cultura. Verificou-se que a sensibilidade aumenta à medida que a doença se avança. Contudo, os autores sugerem que o kit pode ser utilizado na rotina de monitoramento de rebanhos que priorizam a eliminação de animais reatores especialmente em regiões ou situações em que os procedimentos do teste tuberculínico não são viáveis.

Embora as análises sorológicas não possam ser consideradas como a primeira escolha em método de diagnóstico, muitos pesquisadores descrevem os objetivos estratégicos de seu uso (SILVA, 2001; LILENBAUM e FONSECA, 2006). A estratégia é baseada na existência dos animais anérgicos (SILVA, 2001; McNAIR et al., 2001) e no aumento dos anticorpos nas etapas mais avançadas da doença (POLLOCK; NEILL, 2002; WELSH et al. 2005).

Lilenbaum e Fonseca (2006) identificaram vacas tuberculosas usando ELISA em 18 rebanhos incluídos em um programa de controle da tuberculose, e confirmaram a infecção mediante o isolamento de *M. bovis* das lesões do pulmão. Neste caso, o ELISA foi empregado como um teste de diagnóstico complementar e melhorou o controle da tuberculose mediante a identificação das vacas anérgicas. Estes animais se mostraram em uma etapa posterior como infectados de acordo com os padrões previamente estabelecidos no protocolo do estudo.

2.7.7 Diagnóstico Molecular

Procedimentos mais avançados para o diagnóstico de tuberculose estão sendo utilizados para a identificação do agente, como as sondas de DNA, e a técnica de PCR (HAAGSMA, 1995). Tais métodos estão sendo desenvolvidos para detectar diretamente o agente em amostras clínicas, para identificar o agente isolado

pelos métodos clássicos de bacteriologia e para avaliar a variação genética dentro de uma espécie de micobactéria (WARDS et al., 1995, BRASIL, 2003).

As técnicas moleculares já encontram alguma aplicação prática dentro dos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, sendo utilizadas de forma complementar aos procedimentos bacteriológicos clássicos (BRASIL, 2003). Devido às dificuldades encontradas no diagnóstico de tuberculose nos animais, como limitações relacionadas à sensibilidade e especificidade do exame alérgico-cutâneo e o longo período para a confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos de rotina, aumentou o interesse pelo desenvolvimento de métodos moleculares para a detecção direta do agente em amostras clínicas, sendo a PCR o teste mais apropriado (RORING et al., 2000; ZANINI et al., 2001; RUGGIERO, 2004).

Para detectar *M. bovis*, o *primer* selecionado poderá ser: gênero-específico, específico para detectar micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, ou espécie-específico, capaz de detectar apenas *M. bovis*. Um par de *primers* específicos para o gênero *Mycobacterium* spp são capazes de delimitar um segmento de 383 pares de base do gene que codifica o antígeno 65 kDa –hsp65 presentes em todas as micobactérias (TB-1: 5' GAGATCGAGCTGGGAGGATCC 3' e TB-2: 5' AGCTGCAGCCAAAGGTGTT 3'). O desenvolvimento de um fragmento genômico espécie-específico para *M. bovis* (JB-21: 5' TCGTCCGCTGATGCAAGTTGC 3' e JB-22: 5' CGTCCGCTGACCTCAAGAAG 3') foi idealizado em 1995 por Rodriguez e colaboradores, que amplificam um fragmento de DNA de 500pb localizado dentro de uma região genômica de 4,999-pb na região da extremidade 3' do gene *RvD1-Rv2031c* (RODRIGUEZ et al., 1999).

Infelizmente essas técnicas não são suficientemente sensíveis para o diagnóstico, com limitada aplicação para o uso diretamente na amostra clínica (WARDS et al., 1995). As principais barreiras para aplicação do método de PCR na rotina laboratorial são a extração de DNA e a escolha dos *primers* adequados (COLLINS et al., 1994). Estudos relacionados com os métodos de extração existem, mas empregam soluções ou kits comerciais inadequados à realidade do produtor brasileiro. A maior dificuldade no processo de extração está relacionada principalmente à pequena quantidade de bacilos presentes em lesões de bovinos

tuberculosos, a dificuldade em concentrar o DNA no pellet e a presença de DNA do animal, além do DNA do agente (RUGGIERO, 2004).

Comparada ao diagnóstico bacteriológico e bioquímico, a técnica de PCR, assim como outros métodos moleculares, é considerada um avanço no diagnóstico rápido da tuberculose, por reduzir o tempo de diagnóstico de meses para poucos dias, além da capacidade de detectar quantidades muito pequenas de bacilos vivos ou mortos na amostra, até 10 fragmentos DNA de micobactéria, o equivalente a 5 organismos (ABRAHÃO, 1998; COLLINS et al., 1994; BEIGE et al., 1995). Wards et al. (1995) desenvolveram um teste de PCR direto de tecidos de bovinos e outros animais. Este teste, utilizado em 110 amostras, detectou, também, amostras negativas na cultura e que não apresentavam nenhum bacilo no exame direto.

Figueiredo et al. (2010) analisaram pela PCR *multiplex* (m-PCR) amostras de *swab* nasal, obtidas a partir de 50 bovinos em propriedade leiteira com histórico de tuberculose. Dessas, 34 vacas foram positivas no teste cervical comparativo e encaminhadas para o abate. As amostras de *swab* nasal foram simultaneamente encaminhadas para cultivo bacteriológico e análise pela m-PCR com par os *primers* JB-21/JB-22 e INS1/INS2. Não foi observado nenhum crescimento de micobactéria na cultura. Já a m-PCR foi capaz de identificar dois (5,9%) animais positivos dentre os 34 reagentes ao teste cervical comparativo.

A eficiência de recuperação do *M. bovis* em amostras de muco nasal é baixa, pois para um resultado positivo é necessário a presença de 10-100 organismos viáveis na amostra, uma condição atendida somente em casos avançados da doença (BARRY et al., 1993). Sabe-se ainda que bovinos experimentalmente infectados com *M. bovis*, após cada infecção, existe um período de defasagem, o qual o microrganismo não pode ser isolado do muco nasal (NEILL et al., 1998; Mc CORRY et al., 2005). A falha na eliminação da bactéria em animais experimentalmente infectados já foi relatada (Mc CORRY et al., 2005). O nível global de desprendimento aumenta durante as primeiras quatro semanas após a exposição ao agente, e em seguida começa a diminuir.

2.8 Controle e Profilaxia

O controle da tuberculose bovina é baseado no diagnóstico oportuno e na eliminação dos animais doentes, junto com a prevenção da disseminação da infecção, tanto dentro como fora dos rebanhos (MORRISON et al., 2000). O desenvolvimento de novos testes de diagnóstico e a aplicação de técnicas de genotipificação para a investigação epidemiológica dos isolados estão entre as principais ferramentas que se projetam como desafios para os programas de controle (JORGE, 2011).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foi instituído em 2001, com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional. O controle da doença se baseia no método teste-e-abate, isto é, no diagnóstico dos animais reativos e envio a matadouros sanitários, onde um grupo de médicos veterinários examina as lesões da carcaça e avalia quanto ao seu destino (BRASIL, 2006).

A principal proposta técnica do programa de controle brasileiro é a certificação de propriedades livres ou monitoradas para tuberculose, dentro dos princípios técnicos sugeridos pelo Código Zoossanitário Internacional. A participação do produtor é voluntária. O saneamento das propriedades infectadas é feito testando-se todos os animais e sacrificando os reagentes positivos. Em propriedades monitoradas, a adesão também é voluntária e os testes de diagnóstico são realizados por amostragem. Para o referido saneamento, o PNCEBT conta com a participação dos médicos veterinários do setor privado, treinados para atuar no programa. Participam, também, os médicos veterinários do serviço oficial, acompanhando a realização das tuberculinizações finais que conferem à propriedade o certificado de monitorada ou livre (BRASIL, 2006).

Entre as estratégias adotadas pelo PNCEBT destaca-se a obrigatoriedade do serviço de inspeção post-mortem em enviar amostras de lesões sugestivas de tuberculose ao laboratório (para exames histopatológicos e bacteriológicos), e quando confirmada a infecção por *M. bovis*, em rebanhos certificados como livres ou monitorados, todos os animais de idade igual ou superior a seis semanas devem ser

submetidos a testes de diagnóstico para tuberculose, destinando os reagentes positivos ao sacrifício (BRASIL, 2006).

Medidas gerais de higiene, como limpeza e desinfecção das instalações, cuidado na introdução de novos animais no rebanho com testes negativos provenientes de rebanhos livres, quarentenário e isolamento de animais suspeitos são importantes para evitar que a doença se instale na propriedade (ROXO, 1995). No que se refere à transmissão da tuberculose pela ingestão do leite contaminado, esta pode ser reduzida significativamente pela pasteurização do leite, mas apenas a completa erradicação da doença poderá proteger o criador, sua família e os consumidores (CASTRO et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética na Utilização de Animais

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo nº 054/12 (Anexo 1).

3.2 Local

Propriedade de exploração leiteira, localizada no Município de Perdizes MG. A propriedade não participava do PNCEBT, e tinha histórico de importação de vacas de propriedade vizinha, sem atestado negativo para tuberculose. Existia o convívio do rebanho bovino com outras espécies domésticas como cães, gatos e eqüinos, além da ocorrência de espécies silvestres próximo à propriedade.

O município de Perdizes - MG, conta com um efetivo de rebanho bovino de 117.256 cabeças e 35.830 vacas ordenhadas (IBGE, 2011). É um dos 20 municípios do Brasil com maior produção leiteira (IBGE, 2010).

3.3 Tuberculinização

Foi realizado no dia 21 de agosto de 2012, por médico veterinário habilitado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e conforme recomendações do PNCEBT, o teste cervical comparativo para tuberculose. Foram examinados 164 bovinos (*Bos taurus*) da raça Girolando, 158 fêmeas e seis machos, com idade aproximada entre seis meses a 14 anos.

Para realização do teste cervical comparativo foram utilizados cutímetro Suprivet de pressão e seringas semi-automáticas multidoso McLintock. As tuberculinas PPD bovina e aviária, produzidas segundo as normas do MAPA, foram adquiridas do laboratório TECPAR/PR, sendo a partida do PPD bovino 012/11 e PPD aviário 006/11, data de fabricação Nov/2011.

Os resultados das diferenças ($\Delta B - \Delta A$) foram interpretados de acordo com os critérios definidos na tabela de teste cervical comparativo do Regulamento Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Conforme as normas do programa brasileiro (BRASIL, 2006) os bovinos com resultado positivo no teste cervical comparativo para tuberculose foram encaminhados ao sacrifício em matadouro frigorífico do estado de Minas Gerais. O abate sanitário foi realizado no dia 26 de outubro de 2012. Os animais reagentes inconclusivos foram submetidos a um segundo teste cervical comparativo, após intervalo mínimo de 60 dias.

3.4 Colheita das amostras

Foram colhidas amostras de 40 bovinos positivos no teste cervical comparativo para tuberculose. O material de análise foi obtido no matadouro-frigorífico Frisago-Frigorífico Ltda (Serviço de Inspeção Estadual n° 3957) de São Gotardo, Minas Gerais. O abate sanitário foi realizado segundo normas da Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais para procedimentos de abate sanitário, e foi acompanhado por fiscais do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e do MAPA.

3.4.1 Amostras de muco nasal

Amostras de muco nasal foram obtidas no momento pós insensibilização dos animais a partir de *swab* de algodão estéril (15cm), o qual foi introduzido e friccionado no assoalho da cavidade nasal (FIGUEIREDO et al., 2010). Os *swabs* foram acondicionados em tubo falcon estéril (15mL) contendo 3mL de solução salina (0,9%). O material foi transportado refrigerado (2 a 8°C) ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e armazenado a (-80°C) em ultrafreezer até o momento de análise.

3.4.2 Amostras de sangue

Durante o abate, na etapa de sangria foram colhidos 50 mL de sangue em tubo tipo falcon estéril sem anticoagulante. O material foi transportado refrigerado (2 a 8°C) ao LADOC-FAMEV-UFU e centrifugado a 3.000 x g por 5 minutos. Em seguida, as amostras de soro foram acondicionadas em microtubos tipo *ependorf* e congeladas a -20°C até a realização dos exames.

3.4.3 Amostras de tecido

Na etapa de inspeção de vísceras, fragmentos de aproximadamente 1,5cm de fígado, linfonodo mediastínico e pulmão foram colhidos e armazenados em frasco plástico estéril contendo formol tamponado a 10% em quantidade suficiente para que todo material estivesse embebido na solução (JONES et al., 2000; BRASIL, 2006). Essas amostras foram colhidas independente de apresentarem ou não lesões características de tuberculose. Quando visualizada a lesão, a zona de transição entre a área lesada e o tecido aparentemente normal foi colhida. O material foi identificado e transportado em recipiente com gelo e encaminhado ao Laboratório de Patologia Animal da UFU para ser processado.

3.5 Testes de diagnóstico

3.5.1 Exame Macroscópico

Durante a inspeção macroscópica realizada de acordo com as Normas vigentes no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1962) foram registradas e fotografadas as lesões sugestivas de tuberculose. Para avaliar melhor as lesões dos órgãos e carcaça, foram efetuados cortes nas vísceras examinadas. Inspeccionou-se carcaça, linfonodos mediastínicos e pulmonares, fígado e pulmão (JONES et al., 2000).

3.5.2 Diagnóstico Histopatológico

3.5.2.1 Hematoxilina-Eosina (HE)

Depois de fixadas em solução formol a 10% por período mínimo de 48 horas, as amostras de pulmão, fígado e linfonodo mediastínico foram seccionadas de maneira que cada fragmento com lesão se constituísse de todas as camadas do granuloma, isto é, a transição entre a lesão e o tecido aparentemente normal, a cápsula e o tecido necrótico. Em seguida, as amostras foram submetidas às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e clarificação, inclusão em parafina e por fim, foram feitos cortes de 4µm em micrótomo (LEICA 2125) e obtidas duas lâminas histológicas de cada bloco. Uma lâmina foi submetida à coloração de Hematoxilina-Eosina, com o objetivo de se visualizar as alterações histológicas, e a outra à coloração de Ziehl-Neelsen, para que fosse investigada a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (TOLOSA et al., 2003).

3.5.2.2 Ziehl-Neelsen (ZN)

Inicialmente as lâminas histológicas foram desparafinizadas e hidratadas, em seguida, foram cobertas na sua totalidade com solução fucsina fenicada de Ziehl (1g de fucsina básica, 100mL de álcool etílico PA, 5g de ácido fênico cristalizado e 100 mL de água destilada). Depois de 30 minutos as lâminas foram lavadas em água corrente de baixa pressão, por 10 minutos, e em seguida cobertas com solução diferenciadora de álcool-ácido (1mL de ácido clorídrico e 100mL de álcool 70%) por aproximadamente 2 minutos, ou até os cortes ficarem de coloração rósea pálido, quando foram novamente lavados e contracorados com solução de azul de metileno (0,5g de azul de metileno, 1mL de ácido acético PA, 100mL de água destilada) durante 2 minutos, em temperatura ambiente (TOLOSA et al., 2003). Após, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente de baixa pressão e finalmente, os cortes foram desidratados com álcool, clarificados com xilol e procedeu-se a montagem final das lâminas.

3.5.3 Diagnóstico Sorológico

Para diagnóstico sorológico da tuberculose bovina empregou-se kit comercial de ELISA – IDEXX[®] *Mycobacterium bovis* Antibody Test. O exame foi realizado no LADOC – FAMEV - UFU, segundo instruções do fabricante.

As amostras de soro e os controles positivo e negativo do kit foram diluídos na proporção 1/50 com o diluente de amostra fornecido pelo kit. As amostras diluídas (100µL/cavidade) foram adicionadas a placa e incubadas na temperatura (18-26°C) por 60 minutos. Após 5 lavagens, 100µL do conjugado anti- IgG bovino: HRPO foi adicionado em cada cavidade e incubado por (18-26°C) por 30 minutos. Em seguida foram realizadas 5 lavagens e acrescido 100 µL do substrato TMB por cavidade. Após 15 minutos de incubação (18-26°C), foi colocado 100µL de solução de interrupção por cavidade. A leitura das absorbâncias foi realizada a 450nm em espectrofotômetro de placas ThermoPlate, e o resultado avaliado pelo programa xCheck 3.3 IDEXX *Laboratories*.

A interpretação dos resultados foi determinada pela relação da absorbância da Amostra/Positivo (A/P). As amostras com relação A/P igual ou maior que 0,30 foram consideradas positivas para anticorpos contra *M. bovis*, e as amostras com relação A/P inferior a 0,30 foram consideradas negativas (WATERS et al., 2011).

3.5.4 Diagnóstico Molecular

3.5.4.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA de *Mycobacterium bovis* foi utilizado o protocolo por lise enzimática com lisozima (Sigma-aldrich) e purificação com fenol clorofórmio (adaptado de BIASE et al., 2002).

Inicialmente os *swabs* com solução salina foram agitados em vórtex, e em seguida centrifugados a 5.000 x g por 15 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado, para que os sedimentos e células de bactéria pudessem se concentrar no fundo do tubo. O sedimento foi transferido para tubos plásticos (2,0 mL) e acrescentados a estes 800µL de tampão de extração [Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA

25mM pH 8.0, NaCl 400mM; SDS 0,5% (p/v)]. As amostras foram agitadas em vórtex e mantidas em banho-maria a 65°C por 60 minutos, sendo agitadas gentilmente a cada 10 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 20 µL Lisozima 20mg/mL e 20 µL de Proteinase k 20mg/mL por 30 minutos a 37°C.

Após adicionou-se 400µL de acetato de potássio 5M à solução que foi misturada por inversão. Nesta etapa, as amostras foram mantidas no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos novos, sendo acrescentado a estes 700 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram misturadas por inversão durante três minutos, e posteriormente centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos.

Acrescentou-se ainda 700 uL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após as soluções foram misturadas por inversão durante três minutos e centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, a fase superior foi transferida para tubos novos, tomando-se cuidado para não tocar na interface orgânica. Acrescentou-se 1000µL de etanol absoluto gelado, que após ser misturada gentilmente foi mantida em freezer -20°C *overnight*.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 13.400 x g por 15 minutos a 4°C. A fase líquida foi descartada e o *pellet* foi lavado com 1000µL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o *pellet* foi colocado para secar em temperatura ambiente $\pm 25^\circ\text{C}$ por 60 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 30µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0) por 24 horas a 4°C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo Sybr safe gel stain 10x (Invitrogen) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) para verificação da qualidade e quantidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em fotodocumentador Alpha Digi Doc (Alpha Innotech).

3.5.4.2 Quantificação do DNA

Alíquotas da solução de DNA obtidas das amostras de *swab* nasal, foram diluídas 1:1000 em água ultrapura obtida em aparelho Milli-Q-Millipore e submetidas à leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, em espectrofotômetro BIOMATE 3S (Thermo Scientific). A quantificação foi realizada para avaliar a qualidade e a concentração de DNA.

3.5.4.3 Amostra do DNA de *Mycobacterium bovis*

O DNA puro da cepa padrão AN5 de *Mycobacterium bovis* utilizado como controle positivo foi doado pela Dra. Eliana Roxo do Instituto Biológico de São Paulo.

3.5.4.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para amplificação do fragmento de DNA de *Mycobacterium bovis* foram utilizados os *primers* JB21 e JB22 (Tabela 1), descritos por Rodriguez et al. (1999), que amplificam um fragmento de 500 pb, localizado dentro de uma região do genoma de 4.999pb na extremidade 3' do gene *RvD1-Rv2031c*, que não está presente em outras espécies de micobactérias.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados na PCR para identificação de *Mycobacterium bovis*.

Primers	Sequência	Amplicon
JB21	5' TCG TCC GCT GAT GCA AGT GC 3'	500 pb
JB22	5'CGT CCG CTG ACC TCA AGA AG 3'	

O procedimento de amplificação foi realizado conforme o seguinte protocolo: tampão de reação 1X [200mM Tris-HCl pH 8.4; 500mM KCl;] 0,2mM de dNTPs [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]; MgCl₂ 2mM; primers JB21/JB22 5 pmol/uL; Taq DNA polimerase 5 U/μL; DNA total 6 μL; água MilliQ q.s.p. 20 μL.

O volume final da solução para a amplificação foi de 20 μL , sendo 6 μL de amostra e 14 μL de mix. O desenho do programa utilizado no aparelho termociclador Select Cyclor (BioProducts) para amplificação do fragmento de DNA de *Mycobacterium bovis* foi realizado conforme Tabela 2.

Tabela 2. Desenho do programa utilizado para amplificação do fragmento de DNA de *Mycobacterium bovis*.

Etapas da PCR	Tempo	Temperatura °C
Desnaturação inicial	5 minutos	94 °C
Desnaturação do DNA	1 minuto – 35 x	94 °C
Hibridação	1 minuto – 35 x	64 °C
Extensão da cadeia de DNA	5 minutos	72 °C
Extensão final	45 segundos – 35 x	72 °C

Análise do produto amplificado

A visualização do produto amplificado (8 μL) foi realizada através da técnica de eletroforese em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,04 M Tris-borato e 1 mM EDTA, pH 8,0), em gel de agarose 1,0 % (p/v). Foi adicionado o corante sybr safe gel stain 10.000X – Invitrogen, 0,5 μL /10mL. O gel foi submetido a voltagem constante de 6-7 V/cm e a visualização das bandas realizada em transluminador ultravioleta (SAMBROOK et al., 1989).

As bandas foram comparadas com padrão de peso molecular (Invitrogen) com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases disposto no gel juntamente com as amostras analisadas. Os géis foram analisados sob luz UV em fotodocumentor Alpha Digi Doc (Alpha Innotech).

3.5.5 Análise Estatística

Foi realizada análise descritiva dos resultados, com cálculo de percentual simples. A eficiência dos testes foi determinada pelo cálculo de sensibilidade dos

exames complementares em relação ao teste cervical comparativo (THRUSFIELD, 2004). Para avaliar o grau de concordância entre os testes, os mesmos foram testados dois a dois em tabela de contingência ($\alpha = 0.05$), pelo teste de McNemar (SAS, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tuberculinização

Dos 164 bovinos testados, 41(25%) foram positivos, 29 (17,7%) inconclusivos e 94 (57,3%) negativos. Dentre os positivos, todas eram fêmeas com idade superior a três anos. Após 60 dias de intervalo foi procedido o reteste nos bovinos inconclusivos, e o TCC detectou mais sete vacas positivas, que também foram encaminhadas ao abate sanitário. O resultado do diagnóstico de tuberculinização dos animais positivos no TCC realizado no dia 21 de Agosto está apresentado no Apêndice 1.

É extremamente preocupante o alto índice (29,2%) de tuberculose bovina encontrado em uma única propriedade, principalmente por se tratar de uma fazenda de exploração leiteira. Tal realidade constitui uma ameaça à saúde pública, visto que o município é um dos grandes produtores de leite do estado de Minas Gerais, e que a ingestão de leite contaminado é a principal via de transmissão da tuberculose para animais jovens e também para o homem (ROXO, 1997).

Como a adesão ao processo de certificação de propriedades livres de tuberculose é voluntária, o proprietário desta fazenda nunca havia feito exames de tuberculose ou brucelose no rebanho. Nos anos de 2010 e 2011, em descarte de vacas em final de ciclo produtivo, o mesmo foi comunicado pelo matadouro-frigorífico que várias carcaças apresentaram lesões sugestivas de tuberculose, e por isso haviam sido condenadas. Mesmo assim nenhuma medida foi tomada pelo produtor. Apesar da resistência do proprietário, somente no ano de 2012 o médico veterinário que fazia assistência técnica na propriedade conseguiu realizar os exames de tuberculinização recomendados pelo programa brasileiro. Nota-se que a falta de conscientização dos produtores, aliada às falhas de comunicação entre os órgãos de defesa sanitária e fiscalização oficial, muitas vezes compromete o trabalho dos médicos veterinários de campo e os objetivos do programa.

É inquestionável o *status* de rebanho infectado, uma vez que os animais foram diagnosticados pelo teste tuberculínico intradérmico, e confirmados pelos exames complementares após o abate sanitário. É necessário que as autoridades

competentes se atentem para a gravidade do problema, pois apesar de mais de 10 anos de implantação do PNCEBT, situações como esta ainda ocorrem em regiões de alta produção do Brasil. A não obrigatoriedade da apresentação de exames negativos de brucelose e tuberculose bovina aos estabelecimentos beneficiadores de leite, é um fato preocupante, uma vez que o leite de animais doentes pode estar sendo comercializado. Soma-se a isso, situações que ainda ocorrem no Brasil, como a distribuição clandestina do leite proveniente de pequenas propriedades rurais, o comércio ilegal de animais tuberculosos e laticínios contaminados (ABRAHÃO, 1998; ABRAHÃO et al., 2005).

O histórico de aquisição de bovinos sem o conhecimento da situação sanitária dos mesmos pode ter sido a mais significativa fonte de infecção para o rebanho bovino estudado, já que a principal forma de introdução da tuberculose em um rebanho é a aquisição de animais infectados (BRASIL, 2006).

Além disso, a existência de animais silvestres próximo a propriedade deve ser considerada, uma vez que várias espécies silvestres são implicadas na manutenção e transmissão de *M. bovis* em todo o mundo. Os reservatórios da fauna silvestre podem dispersar o bacilo pelas secreções respiratórias, urina ou fezes, sendo que a via de transmissão principal dependerá do tipo de interação entre as populações (THOEN et al., 2006). A reação positiva ao exame de tuberculinização em veados catingueiros já foi reportada por Santos et al. (2009). Dentre quatro cervídeos avaliados pelo TCC, todos apresentaram reações positivas, e foram considerados como possíveis reservatórios e disseminadores da tuberculose para outros animais.

Empregado como recomendado pelo PNCEBT, o TCC foi capaz de detectar 41 bovinos reagentes no rebanho, sendo todos encaminhados ao sacrifício. O exame pode revelar infecções a partir de 3 a 8 semanas da exposição ao *Mycobacterium*, alcançando sensibilidade de 68-95%, e especificidade de 96-99% (BRASIL, 2006). Mesmo empregado como primeira escolha, resultados falso-positivos ainda podem ocorrer (MONAGHAN et al., 1994). Animais infectados por *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *Nocardia farcinus* ou outras micobactérias podem ser reativos ao PPD bovino. Desta forma, o TCC é realizado com a finalidade de reduzir a ocorrência de tais reações cruzadas (COLLINS et al., 1994).

Neste surto de Perdizes - MG, o TCC confirmou como infectadas, sete vacas que haviam sido previamente diagnosticadas como inconclusivas. De acordo com o PNCEBT, em caso de resultados inconclusivos, pelo menos 60 dias são necessários para que os testes intradérmicos de tuberculinização sejam repetidos (BRASIL, 2006). Durante este intervalo, os animais inconclusivos foram mantidos em isolamento, para diminuir o risco de propagação da doença para outros animais, bem como para as pessoas que trabalham na fazenda.

A ocorrência de 29 (17,7%) animais inconclusivos demonstra a limitação deste método diagnóstico e a necessidade da utilização de métodos complementares para um resultado conciso (MONAGHAN et al., 1994, ROMERO et al., 1999). Este fato pode estar relacionado a diferentes condições imunológicas apresentadas pelos animais infectados, o que resultaria em diferenças na sensibilidade e especificidade dos testes de acordo com cada animal testado. Em casos de animais recentemente infectados ou em estágio avançado de infecção podem ocorrer resultados falso-negativos ou inconclusivos (MEDEIROS, 2009). Sugere-se que os animais confirmados positivos no reteste estavam com infecção recente no primeiro exame, e desenvolveram resposta mediada por células que foi detectada no segundo exame.

A possibilidade de existir animais positivos dentre os 94 negativos do TCC não pode ser descartada. A ausência da resposta celular nos animais infectados ocorre em particular quando a carga bacteriana é alta (McNAIR et al., 2000), que ocorre quando a evolução da doença já está avançada. O uso de testes intradérmicos como uma única ferramenta para o diagnóstico da tuberculose bovina, pode não detectar todos os animais infectados (LIEBANA et al., 2008), não permitindo a eliminação completa de fontes de infecção do rebanho devido principalmente à ocorrência de animais anérgicos, que não reagem aos testes tuberculínicos (MEDEIROS et al., 2010).

A ocorrência deste foco de tuberculose bovina requer ainda outros cuidados como, por exemplo, deve ser levada em consideração a possível existência de portadores da infecção entre os tratadores, cães, gatos e equinos da propriedade. Cães e gatos podem adquirir a tuberculose bovina por meio de leite contaminado, pela ingestão de carne não cozida (restos de carnes e vísceras de animais abatidos

em matadouros) ou pela via aerógena (GREENE, 1990; WILESMITH; CLIFTON-HADLEY, 1994; ABRAHÃO, 1998). Portanto podem ser potenciais disseminadores do *M. bovis*. A doença nesses animais se localiza, preferencialmente, no trato respiratório em cães e no intestino dos gatos (GREENE, 1990).

O diagnóstico da tuberculose em cães e gatos é muito difícil, uma vez que ainda não existe conduta padronizada de tuberculinização nessas espécies. Para atingir o objetivo de eliminação da tuberculose, em situações como essa, o médico veterinário pode utilizar-se de exames como a radiografia e ultrassonografia, a fim de buscar lesões sugestivas da tuberculose, além de exames clínicos como o hemograma e urinálise. As implicações zoonóticas e o risco de infecção para o homem e outros animais, combinadas com as dificuldades de um tratamento prolongado com antibióticos e a incerteza de obtenção de resultados, são argumentos contra a tentativa de cura de cães e gatos tuberculosos (WILESMITH; CLIFTON-HADLEY, 1994; ABRAHÃO, 1998).

4.2 Exame Macroscópico

Durante a inspeção verificou-se que 22 (55%) carcaças apresentaram algum tipo de lesão macroscópica sugestiva de tuberculose. Os linfonodos mediastínicos foram os que tiveram maior ocorrência (35%), seguido do fígado (17,5%) e pulmão (15%). As lesões visualizadas foram nódulos granulomatosos de aspecto purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa e em alguns casos apresentaram ainda calcificação no centro da lesão, evidenciada pelo ranger da faca ao corte (Figura 1). Duas carcaças (5%) apresentaram quadro de tuberculose generalizada (tuberculose miliar) com nódulos de 1 a 3 cm distribuídos por toda extensão da carcaça. Em 15% dos casos, observou-se ainda aumento de volume dos linfonodos mediastínicos.

As carcaças eram consideradas positivas quando, em pelo menos um dos órgãos avaliados, fosse verificada a presença de lesões sugestivas de tuberculose. O índice de sensibilidade encontrado (55%), foi inferior ao reportado por Fráguas et al. (2008), que observaram (72,16%) de carcaças com lesões e superior ao relatado por Pinto et al. (2004), que foi de (44%) em bovinos reagentes à tuberculinização. Considerando-se que 58% dos animais infectados com tuberculose apresentam

lesões únicas (CORNER et al.,1990) a inspeção mais detalhada de linfonodos, incluindo os da cabeça, torácicos, mesentéricos e da carcaça, bem como baço, rim, úbere e órgãos genitais, aumenta a possibilidade dessas virem a ser visualizadas (CORNER, 1994).

A inspeção macroscópica não detectou lesões sugestivas de tuberculose em 18 (45%) carcaças. Situações em que os bovinos positivos aos testes tuberculínicos não apresentem lesões visíveis à necropsia podem ocorrer (BRASIL, 2006). Alguns aspectos estariam envolvidos, tais como: os animais estarem no estágio inicial da doença, ou contato com outras micobactérias que não o *M. bovis* (SOUZA et al., 1999). Além disso, o tempo destinado para a inspeção de abate pode ser insuficiente para detectar todas as lesões, o que dificulta o exame mais detalhado (CORNER; 1994).

Atribui-se ainda a esta ocorrência o fato dos linfonodos parotídeos e retrofaríngeos não serem examinados na rotina de abate do frigorífico onde ocorreu o descarte dos animais. Trabalhos anteriores apontam o envolvimento dos linfonodos retrofaringeanos (22,9 a 49,2%) nas lesões de tuberculose (CORNER et al., 1990; MILIAN-SUAZO et al., 2000). Segundo Corner et al. (1990), durante a inspeção sanitária em abatedouros, nos animais em que foi observada apenas uma lesão causada por *M. bovis*, o linfonodo retrofaringeano foi o local mais afetado, correspondendo a 43,9% dos casos avaliados.

A utilização do exame macroscópico nas linhas de inspeção dos abatedouros tem demonstrado bons resultados, principalmente quando implementados em regiões com alta prevalência da doença (CORNER, 1994). Porém, à medida que a prevalência diminui, a identificação dos rebanhos remanescentes se torna progressivamente mais difícil (FURLANETTO et al., 2012). Embora atualmente não exista nenhum método de diagnóstico, *ante* ou *post mortem*, capaz de identificar todos os animais infectados com *M. bovis*, a detecção se torna mais sensível quando mais de um método é utilizado (WHIPPLE et al., 1996).

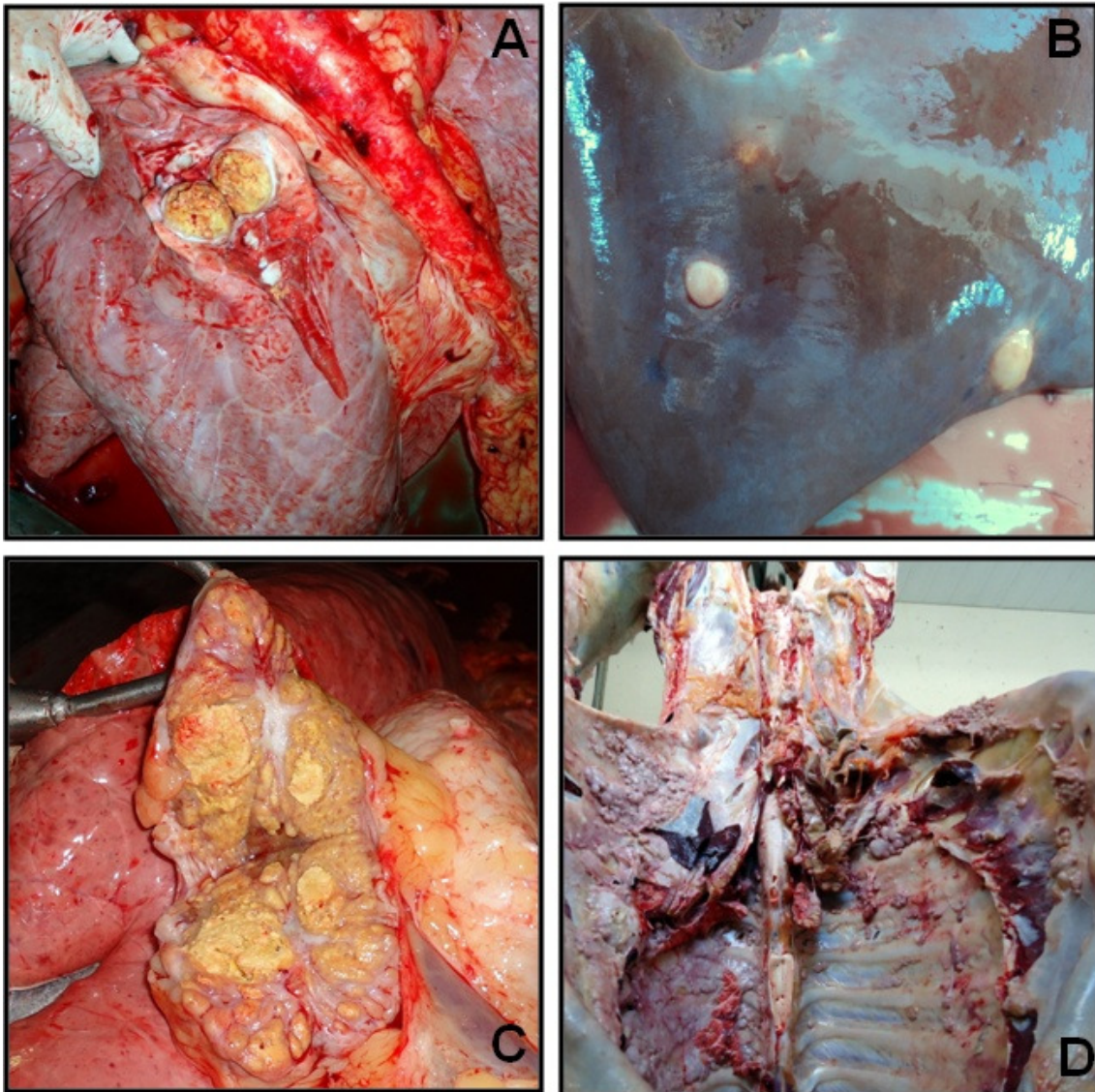


Figura 1. Lesões nodulares típicas de tuberculose em órgãos e carcaça de bovinos positivos no teste cervical comparativo. São Gotardo MG, 2012.

A: Pulmão apresentando lesão nodular com cerca de 3,0 cm de diâmetro, de cor amarelada envolvido por cápsula fibrosa e contendo exsudato com aspecto caseoso em seu interior; **B:** Fígado com nódulos de 1 a 3 cm de diâmetro; **C:** Aumento de volume de linfonodo mediastínico com processo inflamatório granulomatoso contendo exsudato de aspecto caseoso a purulento em seu interior; **D:** Carcaça com aspecto de tuberculose generalizada, apresentando lesões nodulares por toda a extensão da carcaça.

4.3 Diagnóstico Histopatológico

4.3.1 HE

Nos achados histopatológicos visualizados em HE verificou-se que 13 (32,5%) carcaças apresentaram alterações histológicas, sendo essas encontradas com maior frequência nos linfonodos mediastínicos (15%), seguido pelo fígado (12,5%) e pulmão (7,5%). Foi observada a presença de granulomas típicos de tuberculose, em alguns casos, envolvidos por cápsula fibrosa, com um centro de necrose caseosa ou de calcificação circundado por intensa proliferação de células mononucleares, células gigantes de Langhans e zona circunscrita de linfócitos (Figuras 2 e 3). Três amostras de linfonodos evidenciaram lesões difusas, caracterizadas por necrose, sem organizar o granuloma.

Das 22 lesões consideradas positivas no exame macroscópico, 13 foram confirmadas pelo exame histopatológico corado em HE. Em oito animais (20%) as lesões macroscópicas semelhantes à tuberculose encontradas nos linfonodos, não se confirmaram no exame histopatológico. Esta diferença pode ser explicada pela ocorrência de lesões granulomatosas determinadas por outras etiologias, com características macroscópicas indiferenciáveis da tuberculose, como o linfossarcoma e linfadenites inespecíficas (KANTOR et al., 1981; REIS et al., 1995).

Além disso, o fato de nem todas as lesões macroscópicas terem sido confirmadas no exame histopatológico HE pode ser devido a subjetividade no julgamento das mesmas (REIS et al., 1995). Por esta razão, a inspeção sanitária das carcaças deve ser realizada de forma criteriosa, por profissionais bem treinados, para diminuir o risco de alimentos duvidosos chegarem à mesa dos consumidores, ou ainda, segundo Fraguás et al. (2008), a real etiologia e prevalência de lesões granulomatosas não-tuberculosas, requerem ampla atenção por representarem motivo de condenação desnecessária de carcaças, e muitas vezes induzirem ao erro durante os procedimentos de inspeção.

As alterações histológicas encontradas em apenas 13 carcaças podem ser justificadas pelos diferentes estágios de evolução da infecção. A resposta imune é diferente em infecções recentes e avançadas, o que suporta a identificação entre os animais cronicamente ou recentemente infectados (MEDEIROS et al., 2012). Os autores empregaram o exame histopatológico e outros testes complementares para

identificação dos estágios da fisiopatologia da tuberculose, e concluíram que nem todos os animais doentes de um rebanho encontram-se na mesma fase de infecção.

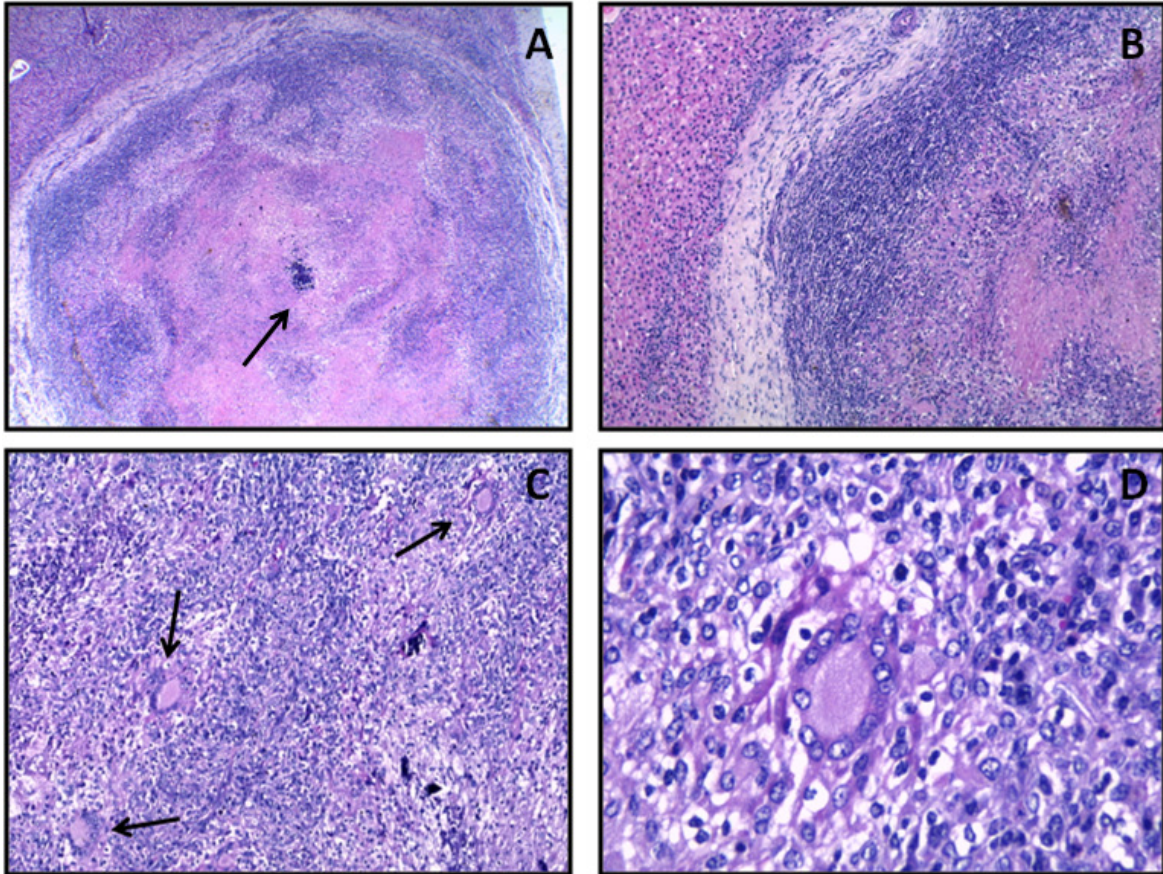


Figura 2. Fotomicrografia de amostras de fígado de bovinos positivos no Teste Cervical Comparativo, obtidas em abate sanitário para Tuberculose bovina, São Gotardo, MG 2012.

A: Secção de fígado. Granuloma envolvido por tecido conjuntivo fibroso, com área central de necrose caseosa com foco de calcificação (seta). HE. 5x **B:** Secção de fígado. Cápsula fibrosa envolvendo zona circunscrita de linfócitos e intensa proliferação de células monocucleares. HE.10x **C:** Parênquima hepático, as setas indicam células gigantes do tipo Langhans. HE. 10x **D:** Célula gigante tipo Langhans. Citoplasma amplo e núcleos dispostos na periferia da célula em forma de ferradura. HE. 40x

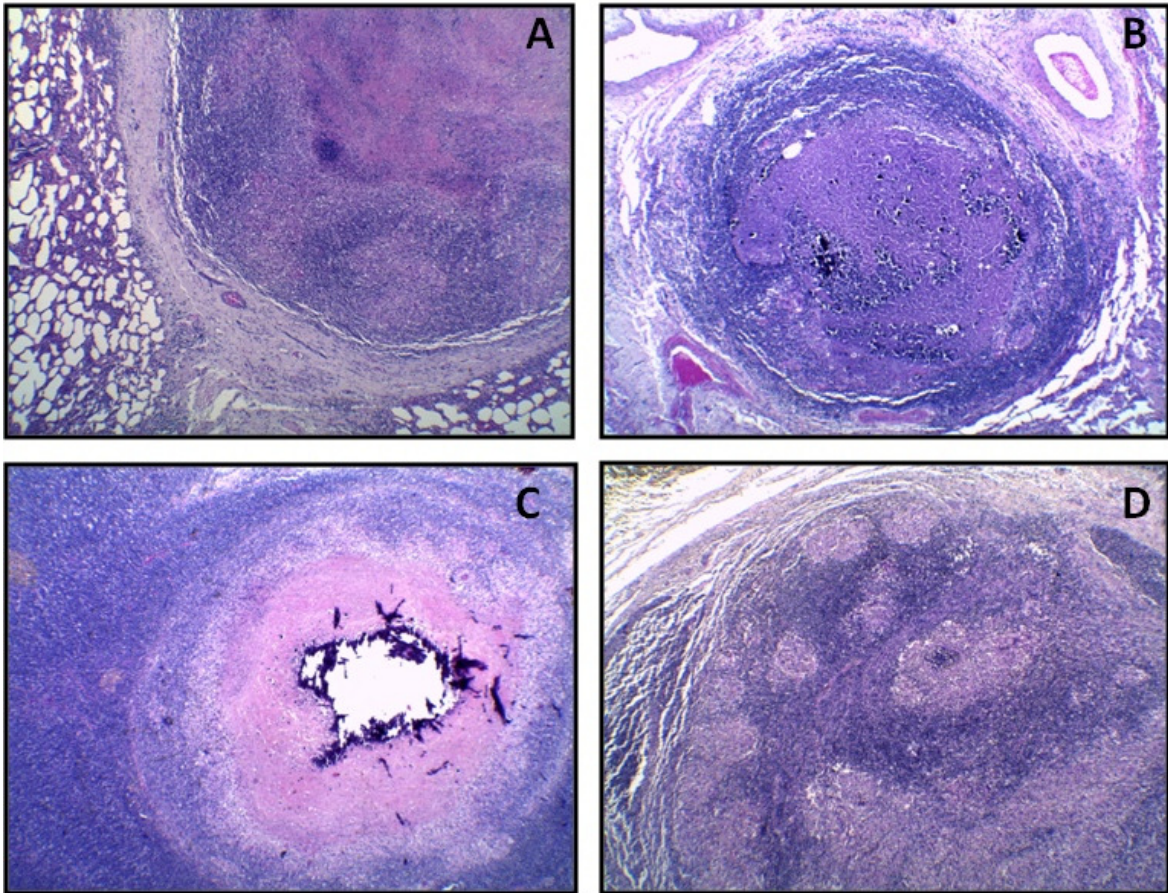


Figura 3. Fotomicrografia de amostras de pulmão e linfonodo mediastínico de bovinos positivos no Teste Cervical Comparativo, obtidas em abate sanitário para Tuberculose bovina, São Gotardo, MG 2012.

A: Secção de pulmão. Granuloma tuberculoso circundado por espessa cápsula fibrosa. Necrose caseosa central com infiltrado de macrófagos modificados (células epitelióides), linfócitos e raros plasmócitos. HE. 5x **B:** Secção de pulmão com granuloma circundado por cápsula de tecido conjuntivo, necrose caseosa central com intensa mineralização. HE. 5x **C:** Secção de linfonodo evidenciando estrutura granulomatosa com área de necrose central e calcificação distrófica HE. 5x **D:** Secção de linfonodo Granuloma tuberculoso com área central de necrose caseosa, mineralizada e formação de cápsula fibrosa ao redor. HE. 5x.

4.3.2 ZN

Não foi observada a presença de BAAR em nenhuma das amostras avaliadas pela coloração de ZN. Embora a técnica seja considerada um exame básico em tuberculose humana, sobretudo do escarro, ela não é tão sensível no diagnóstico histopatológico da tuberculose animal, pois os bacilos nem sempre são visualizados na amostra, mesmo na presença de lesões (FRAGUÁS et al., 2008).

Outros estudos demonstraram também baixa sensibilidade da técnica de ZN quando aplicada em cortes histológicos. Andrade et al. (1991) observaram BAAR em 9,1% das amostras histológicas examinadas. Salazar, (2005) e Furlanetto et al. (2012) relataram ausência de BAAR em amostras de tecidos com lesões sugestivas de tuberculose, confirmadas no exame histopatológico. Esses resultados podem ser justificados pelo fato do teste só conseguir revelar a presença de bacilos álcool-ácido resistente em concentrações superiores a 10^4 bactérias por mL (RODRIGUEZ et al., 2004).

Nas amostras com alterações histológicas do tipo granulomatosa não foi possível identificar BAAR. Esse fato pode ser explicado em função do estágio de progressão da lesão resultante da reação de hipersensibilidade tardia, quando o tubérculo desenvolve necrose de caseificação central, fibrose periférica com circunscrição da lesão, que pode evoluir para resolução e calcificação (MORRIS et al., 1994; NEILL et al., 1994).

Segundo Wards et al. (1995), devido à baixa sensibilidade da técnica, resultados falso-negativos podem ocorrer. Outra desvantagem do exame é que este não é capaz de discriminar entre os membros da família Mycobacteriaceae, ou entre os membros do gênero *Mycobacterium* e outros organismos que partilham da mesma característica tintorial, dos gêneros *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (EISENSTADT; HALL, 1995; ROXO, 1997).

4.4 Diagnóstico Sorológico

Dentre as 40 amostras de soro obtidas no abate sanitário para tuberculose, o ELISA *Mycobacterium bovis* Antibody Test (IDEXX®) identificou apenas um (2,5%) animal reagente, com valor de densidade óptica igual a 0,333 e relação A/P superior a 0,30. A densidade óptica média do controle positivo foi maior que 0,30 e negativo menor que 0,20. O ensaio obteve valores satisfatórios dos controles positivo e negativo, conferindo assim validade ao teste.

Para confirmar o TCC, esperava-se maior número de animais reagentes no teste sorológico de ELISA/IDEXX®, principalmente entre os 13 bovinos que apresentaram lesões granulomatosas no exame histopatológico. Conforme Welsh et al. (2005) na tuberculose bovina, após a diminuição da resposta celular que acontece com a progressão da doença, ocorre aumento da resposta humoral, baseada em anticorpos IgG1. No rebanho deste estudo acredita-se que os animais naturalmente infectados se apresentavam em diferentes estágios de infecção, e por esta razão não se apresentaram com o mesmo padrão de resposta sorológica.

Lilenbaum e Fonseca (2006) indicaram a utilização do ELISA como uma valiosa ferramenta complementar para identificação de animais anérgicos. Os autores avaliaram 18 rebanhos, sendo que dois animais apresentaram-se negativos aos testes intradérmicos. A infecção nestes animais foi identificada através de ELISA e confirmada pelo isolamento de *M.bovis* em lesões pulmonares. Desta forma, os animais foram considerados como a mais provável fonte de infecção e responsáveis pela manutenção da doença nos rebanhos.

O único animal reagente no teste sorológico de ELISA/IDEXX® apresentou também lesões sugestivas de tuberculose no exame macroscópico, que foi confirmado pelo teste histopatológico HE, com lesão do tipo granulomatosa no fígado e pulmão. Medeiros et al. (2012) utilizaram ELISA com as proteínas recombinantes MPB70/ MPB83 em bovinos positivos no TCC e verificaram que dentre nove animais positivos no teste histopatológico HE, três foram também positivos no ELISA, e 10 animais considerados inconclusivos no exame histopatológico, dois foram reativos no ELISA.

O índice de sensibilidade encontrado neste estudo (2,5%) foi inferior ao relatado por Waters et al. (2011), que verificaram 63% de sensibilidade do ELISA/IDEXX[®] em soro sanguíneo de bovinos reagentes aos testes de tuberculinização intradérmica e/ou histopatológico e/ou cultura. Segundo Waters et al. (2011), a sensibilidade do ELISA/IDEXX[®] aumenta com a severidade da doença. Porém, ao contrário do que relatado pelo autor, no presente estudo verificou-se que apesar da tuberculose já se encontrar em quadro avançado, (caracterizado pelas lesões anatomopatológicas presente em mais de 50% das carcaças e hiperplasia de linfonodos) o ELISA/IDEXX[®] só conseguiu identificar um animal reagente.

Outros estudos com testes de ELISA padronizados (LILENBAUM et al., 1999; SILVA, 2001; FRAGUÁS et al., 2008), também demonstraram índices superiores de sensibilidade, 86,47%, 47% e 34,02% respectivamente. Sugere-se que a variação dos índices, possa ser devido aos diferentes tipos e porções antigênicas de *M. bovis* que são utilizados na impregnação das placas de ELISA.

4.5 Diagnóstico Molecular

Extração

O DNA genômico total das amostras mostrou-se de boa qualidade quando avaliado em gel de agarose, sendo representado por uma banda íntegra de alto peso molecular (Figura 4).



Figura 4. DNA genômico total obtido a partir de muco nasal de bovinos reagentes ao teste cervical comparativo para tuberculose. **PM:** padrão de tamanho molecular 100pb. **1-7:** Amostras de DNA de *swab* nasal escolhidas aleatoriamente.

PCR

O fragmento de 500pb específico de *M. bovis* foi observado em apenas uma (2,5%) amostra de DNA obtida a partir de muco nasal de bovino naturalmente infectado, positivo no TCC. O controle positivo de *M. bovis* cepa AN5, controle negativo (mix sem DNA) e amostra de muco nasal positiva estão representadas na Figura 5.

A baixa sensibilidade do exame realizado diretamente a partir de muco nasal, neste estudo, pode ser explicada pelo método de extração empregado e também pela possibilidade de pequena quantidade de bacilos presentes nas amostras. A recuperação do *M. bovis* por meio de técnicas convencionais de cultivo, em muco nasal de bovinos naturalmente infectados, já foi relatada por outros autores, (DE KANTOR; ROSWURM, 1978) com eficiência de recuperação de 8,7%. A eficiência é baixa, pois para um resultado positivo é necessário a presença de 10-100 organismos viáveis na amostra, uma condição atendida somente em casos

avançados da doença (BARRY et al., 1993). A técnica de PCR empregada diretamente em amostras clínicas apresenta certas limitações (WARDS et al., 1995).

Bovinos experimentalmente infectados com *M. bovis*, após cada infecção, existe um período de defasagem, o qual o microrganismo não pode ser isolado do muco nasal (NEILL et al., 1998; Mc CORRY et al., 2005). Diferenças importantes no perfil de eliminação do bacilo foram observadas, o que classificou os bovinos como eliminadores persistentes ou intermitentes (KAO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010). A falha na eliminação da bactéria em animais experimentalmente infectados já foi relatada (Mc CORRY et al., 2005). O nível global de desprendimento aumenta durante as primeiras quatro semanas após a exposição ao agente, e em seguida começa a diminuir (KAO et al., 2007) mas as bactérias ainda podem ser detectadas por várias semanas e em alguns casos durante vários meses (FIGUEIREDO, et al., 2010).

Com o uso da PCR foi possível identificar o DNA de *M. bovis* em dois dias de trabalho, tempo muito inferior ao necessário para a confirmação pelo método bacteriológico, que pode ser, conforme Pinto et al. (2002) de até 90 dias. Tecnologias com base em ácidos nucléicos, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e métodos relacionados tem se mostrado como uma ferramenta de diagnóstico mais rápida, sensível e específica (RUGGIERO, 2004). O PCR é descrito como um método eficiente na determinação da espécie de micobactéria, tornando possível o diagnóstico definitivo em amostras *post-mortem* e em produtos de origem animal (FUVERKI, 2008).

Para amplificação do fragmento genômico *RvD1-Rv2031c* utilizou-se PCR convencional com os *primers* JB21 e JB22, que amplificam um fragmento de 500pb. Figueiredo et al. (2010) identificaram por meio de PCR multiplex, que amplifica simultaneamente as sequências *RvD1-Rv2031c* (específica para *M. bovis*) e IS6110 (presente em todas as espécies do CMT) e verificaram a presença do DNA de *M. bovis* em duas (5,9%) amostras de *swab* nasal de bovinos reagentes no TCC. Mesmo tendo sido procedido o cultivo microbiológico das amostras de *swab* nasal, esses pesquisadores não conseguiram o isolamento do agente.

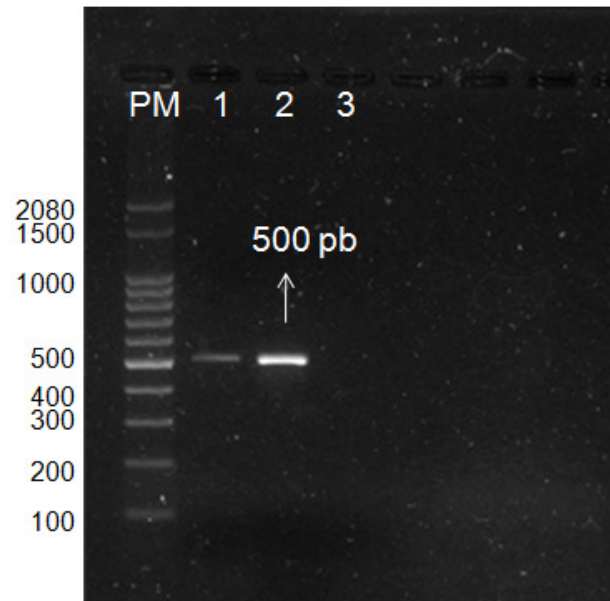


Figura 5: Detecção do DNA de *Mycobacterium bovis* por PCR direto de *swab* nasal de bovinos positivos no teste cervical comparativo para tuberculose. DNA extraído de muco nasal foi usado como molde para a amplificação por PCR da sequência *RvD1Rv2031c* (500pb). Linha PM: marcador de tamanho de fragmento de DNA (100 pb); Linha 1: produto da PCR originado de muco nasal de bovino reagente a tuberculinização obtido de bovino em abatedouros no estado de Minas Gerais, Brasil; Linha 2: cepa de referência *M. bovis* (AN5), usada como controle positivo; Linha 3: Controle negativo (mix sem DNA). A seta indica o fragmento de 500pb de *M. bovis*.

Os índices de sensibilidade dos diferentes métodos complementares utilizados no presente estudo se encontram resumidos na Tabela 3. A especificidade dos testes não foi calculada, uma vez que se estudaram apenas animais com diagnóstico de tuberculose positivo estabelecido pelo método de tuberculinização, conforme recomendação oficial (BRASIL, 2006).

Tabela 3. Índice de sensibilidade dos exames complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em 40 animais reagentes ao teste cervical comparativo*, São Gotardo - MG, 2012.

Teste	Sensibilidade %
Anatomopatológico	55
Histopatológico HE	32,5
ZN	0
Sorológico	2,5
Molecular	2,5

* Em relação ao teste intradérmico, conforme PNCEBT.

Do total de amostras examinadas, nenhuma foi positiva nos cinco testes complementares avaliados. Uma (2,5%) amostra foi positiva para o exame macroscópico, histopatológico (HE) e no ELISA, e outra amostra positiva no exame macroscópico, histopatológico e no PCR.

Os exames complementares foram testados dois a dois pelo teste de McNemar e revelou haver diferença estatística ($p < 0,05$) entre eles quanto a capacidade de reconhecimento dos animais positivos para tuberculose. O exame macroscópico quando comparados com os demais testes complementares, (HE, ZN, ELISA e PCR) revelou diferença estatística ($p < 0,05$). E o teste HE quando comparado com (ZN, ELISA e PCR) também demonstrou haver diferença na eficiência de detecção de bovinos positivos no TCC. Fraguás et al. (2008), recomendam a associação do exame macroscópico e histopatológico como ferramentas complementares que podem ser utilizadas para confirmação de casos duvidosos no abatedouro.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir que:

- A tuberculose bovina encontra-se presente nesta propriedade, com alto índice de prevalência (29,2%), confirmada pelos exame macroscópico e teste histopatológico; porém a eficiência do ELISA/IDEXX e PCR foram baixas, provavelmente devido aos diferentes estágios que os animais naturalmente infectados se encontravam.
- Por ser um rebanho leiteiro, a ocorrência da tuberculose pode representar um risco zoonótico. Por esta razão, o TCC já deveria ser um exame de rotina obrigatório em toda propriedade que comercializa leite ou carne, pois reconhece infecções recentes, muitas vezes não detectadas em exames complementares.
- O exame histopatológico das lesões, embora requeira pessoal e laboratórios especializados, tem boa especificidade e permite a confirmação da presença da lesão granulomatosa;
- Sugere-se que o exame de ELISA/IDEXX[®] seja realizado também em animais negativos à tuberculinização, a fim de identificar os animais anérgicos, sendo estes possíveis reservatórios da tuberculose.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R.M.C.M. **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 da transmissão da tuberculose bovina e outras doenças ao homem: Um problema de saúde pública (Meat and milk Black market - Bovine tuberculosis). **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ALFINITO, J.W., OLIVEIRA, F.R. Estudo epidemiológico da tuberculose bovina na Ilha de Marajó. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 20 Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Sociedade Matogrossense de Medicina Veterinária p.216-217, 1986.

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P.V.; MÉNDEZ, M.C.; SCHILD, A.L. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares á tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.11 p.81-86, 1991.

ARAÚJO, C. P.; LEITE, C. Q. F.; JORGE, K. S. G.; OSÓRIO, A. L. A. R. Identificação pela PCR de Mycobacterium bovis a partir do cultivo de lesões sugestivas de tuberculose bovina oriundas de matadouros-frigoríficos em Mato Grosso do sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.100, n.7, p.1-4, 2005.

BAPTISTA, F; MOREIRA, E. C; SANTOS, W. L. M; NAVEDA, L. A. B. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p.577-580, 2004.

BARRY, T.; GLENNON, M.; SMITH, T.; GANNON, F. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. **Veterinary Record** v.132, n.3, p.66–67, 1993.

BIASE, F.H.; FRANCO, M.M.; GOULART, L.R.; ANTUNES, R.C. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.3, p.313-315, 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, p. 44-45, 1962.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro, 115 p., 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal- PNCEBT**. Brasília-DF, 188 p. 2006.

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

CASTRO, K.G.; LIEVORE, J.P.M.; CARVALHO, G.D. Tuberculose bovina: diagnóstico, controle e profilaxia. **PUBVET**. v. 3, n. 30, p. 648. 2009.

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

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

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. Tuberculose. In:_____ **Enfermidades Infeciosas dos mamíferos Domésticos**, 2ed., Rio de Janeiro: Medsi, p.317-337.,1992.

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

DE KANTOR, I.N.; ROSWURM, J.D. Mycobacteria isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. **American Journal of Veterinary Research**,. v.39, n.7, p.1233- 1234, 1978.

EISENSTADT, J.; HALL, G.S. Microbiology and classification of mycobacteria. **Clinical Dermatology**, v.13, n.3, p.197-206,1995.

FIGUEIREDO E.E.S., CARVALHO R.C.T., SILVESTRE F.G., LILENBAUM W., FONSECA L.S., SILVA J.T.; PASCHOALIN V.M.F. Detection of *Mycobacterium bovis* DNA in nasal swabs from tuberculous cattle by a multiplex PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41 p.386-390, 2010.

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 Veterinárias**. 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. 1138-1144. 2012.

FUVERKI, R.B.N.; MURAKAMI, P.S.; BIONDO, A.W.; BARROS FILHO, I.R. Uso da PCR para detecção e identificação de micobactérias a partir de amostras clínicas de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.73-77, 2008.

GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Geneva, **World Health Organization**, v.94, p.174, 1994.

GREENE, G.E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia, W.B. Saunders, **Mycobacterial infections**. p.558-66: 1990.

HAAGSMA, J. **Bovine tuberculosis**. Geneve: Office International des Épizooties, (Manual Amendment 2). 11p, 1995.

HEADLEY, S. A. Systemic bovine tuberculosis: a case report Tuberculose bovina: um relato de caso. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.23, n.1, p. 75-79, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2010. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2010. **Produção de leite segundo as Unidades da Federação 2010**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab23.pdf. Acesso em 02 de dez. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2011. **Produção da Pecuária Municipal 2011: Bovinos - efetivo dos rebanhos**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1> . Acesso em 02 de dez. 2012.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. 6ª ed. São Paulo Editora Manole, 2000.

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

JÚNIOR, M.E.K.; SOUSA, C.L.M. Considerações sobre a tuberculose bovina no norte Fluminense e no município de Campos dos Goytacazes após o advento do PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. **Perspectivas online**, v.2, n.8, 2008.

KANTOR , I.N.; DE LA VEJA, E.; CABALLERO, P. Estudio de órganos bovinos decomisados por tuberculose, mataderos del gran Buenos Aires. **Revue de Médecine Vétérinaire** v.62, n. 4, p. 282-285, 1981.

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

KAO, R.R.; GRAVENOR, M.B.; CHARLESTON, B.; HOPE, J.C.; MARTIN, M.; HOWARD, C.J. Mycobacterium bovis shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. **Journal of the Royal Society Interface**, v.4, p.545-551, 2007.

LIEBANA, E.; JOHNSON, J.; GOUGH, J.; DURR., P.; JAHANS, K.; CLIFTONHADLEY, R.; SPENCER, Y.; HEWINSON, R.G.; DOWNS, S.H., Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. **Veterinary Journal**., v.176, p.354-360, 2008.

LILENBAUM, W.; SCHETTINI, J.C.; FERREIRA, M.A.S.; SOUZA, G.N.; RIBEIRO,

E.R.; MOREIRA, E.C.; FONSECA, L.S. Evaluation of an ELISA - PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.66, p. 191-195, 1999.

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

LILENBAUM, W.; FONSECA, L.S. O uso de Elisa como ferramenta complementar para o controle da tuberculose bovina no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.2, p.256-261, 2006.

MC CORRY, T.; WHELAN, A.O.; WELSH, M.D.; MCNAIR, J.; WALTON, E.; BRYSON, D.G.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M.; POLLOCK, J.M. Shedding of Mycobacterium bovis in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. **Veterinary Records**, v.157, p.613-618, 2005.

MCNAIR, J.; CORBETT, D.M.; GIRVIN, R.M.; MACKIE, D.P.; POLLOCK, J.M. Characterization of the Early Antibody Response in bovine Tuberculosis: MPB 83 is an Early Target with Diagnostic Potential. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.53, p.365-371, 2001.

MEDEIROS L.S. **Abordagem Multidisciplinar no Diagnóstico da Tuberculose Bovina**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

MEDEIROS L., MARASSI C.D., FIGUEIREDO E.E.S.; LILENBAUM W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine Tuberculosis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41 p.1-4, 2010.

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 a naturally infected herd. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, 2012 .

MILIAN-SUAZO, F.; SALMAN, M.D.; RAMIREZ, C.; PAYEUR, J.B.; RHYAN, J.C.; SANTILLAN, M. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, p.86-89, 2000.

MIRANDA, Z. B.; REYES, S.; CARVALHO, E. C. Q.; SANTOS, J. A. Afecções Inflamatórias Inespecíficas de Bovinos de Interesse para a Inspeção Sanitária. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.20, n.4, p.154-157, 1998.

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

MORRIS, R. S.; PFEIFER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 12, p.153-177, 1994.

MORRISON, W.I., BOURNE, F.J., COX, D.R., DONNELLY, C.A., GETTINBY, G., MCINERNEY, J.P.; Woodroffe, R., Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. Independent Scientific Group on Cattle TB. **Veterinary Records**. v.146, p.236-242, 2000.

NEILL, S.D.; O'BRIEN, J. J.; MCCRACKEN, R.M. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. **Veterinary Records**, v.122, p.184-186, 1988.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D.B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 41-52, 1994.

NEILL, S.D.; HANNA, J.; O'BRIEN, J.J.; MCCracken, R.M. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. **Veterinary Records**, v.123, p.340-343, 1998.

OLIVEIRA, P.R.; REIS, D.O.; RIBEIRO, S.C.A.; COELHO, H.E.; LÚCIO, W.F.; BARBOSA, F.C.; SILVA, P.L. Prevalência da tuberculose em carcaças e vísceras de bovinos abatidos em Uberlândia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.38, p.965-971, 1986.

OLMSTEAD, A.L., RHODE, P.W. An Impossible undertaking: the eradication of bovine tuberculosis in the United States. **The Journal of Economic History**, v.64, n.3, p.01-39, 2004.

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, 46 p., 1995

PACHECO, A. M.; HAMZÈ, A. L.; AVANZA, M. F. B.; PEREIRA, D. M.; PEREIRA, R. E. P.; CIPRIANO, R. S.; LOT, R. F. S. Tuberculose Bovina – Relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 13, 2009.

POLLOCK, J.M., NEILL, S.D. Review *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. **The Veterinary Journal**, v.163, p.115–127, 2002.

PINTO P.S.A., FARIA J.E., VILORIA M.I.V., BEVILACQUA P.D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.3, n.1, p.10-15, 2002.

PINTO, P.S.A.; VILORIA, M.I.V.; FARIA, J.E. 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. 11, n. 1, p. 27-31, 2004.

RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., BLOOD, D.C., HINCHCLIFF, K.W. **Clínica veterinária Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

REIS D.O., ALMEIDA L.; FARIA A.R. Estudo comparativo entre linfossarcoma, tuberculose e linfadenites inespecíficas ocorridas em bovinos abatidos e a confirmação histológica. **Higiene Alimentar**, v.35, p.28-30, 1995.

RICCETI, R.V.; VASCONCELOS, S.A.; ITO, F.H.; CORTES, J.A. Investigação epidemiológica sobre as zoonoses de maior constatação em matadouros. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.26, p.61-68, 1989.

RODRÍGUEZ J.G.; FISSANOTI J.C.; DEL PORTILLO P.; PATARROYO M.E.; ROMANO M.I.; CATALDI A. Amplification of a 500-basepair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 3, p. 2330-2332, 1999.

RODRIGUEZ, C.A.R.; ZUMÁRRAGA, M.J.; OLIVEIRA, E.M. DE D.; CATALDI, A.A.; ROMANO, M.I.; OTTO, H.H.; BONAFÉ, V.L.; FERREIRA NETO, J.S. Caracterização Molecular de Isolados de *Mycobacterium bovis* do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de Spoligotyping. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n.3, p. 277-282, 2004.

ROMERO, R.E.; GARZÓN, D.L.; MEJÍA, G.A.; MONROY, W.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.63, p.101-106, 1999.

ROMERO, B.; ARANAZ, A.; JUAN, L.; ÁLVAREZ, J.; BEZOS, J.; MATEOS, A.; MAMPASO, E.G.; DOMÍNGUEZ, L. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Mycobacterium bovis* Isolates with the Same Spoligotyping Profile as Isolates from

Animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44 n.9, p.3405–3408, 2006.

ROXO, E. Tuberculose. In: GONÇALVES, C. A.; ROXO, E.; CALIL, E. M. B.; KOTAIT, I.; BALDASSI, L.; PORTUGAL, M. A. S. C.; LAUAR, N. M.; CALIL, R. M.; GIORGI, W. **Zoonoses**. Campinas. CATI. p.115-120, 1995.

ROXO, E. Tuberculose bovina: Revisão. (*Bovine Tuberculosis: Review*). **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.63, n.2, p.91-97, 1996.

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

RUGGIERO, A. P. M. **Métodos moleculares aplicados ao diagnóstico da tuberculose bovina** 2004. 68 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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.

SALAZAR F.H.P. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no estado de Mato Grosso, Brasil**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 73p, 2005.

SAMBROK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^aed. Londres: CSHL Press, p. 1448, 2001.

SANTOS A.L.Q.; LIMA-RIBEIRO A.M.C.; PEREIRA, P.C. Teste de tuberculinização em veado catingueiro *Mazama gouazoubira* fisher, 1814 (artiodactyla: cervidae), **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.4, p.693-696, 2009.

SAS – **Statistical Analysis System**, versão 8.0 para Windows, SAS Institute, Carey, NC., EUA, 2000.

SILVA, E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.111-117, 2001.

SMITH, N.H.; GORDON, S.V.; DE LA RUA-DOMENECH, R.; CLIFTON-HADLEY, R.S.; HEWINSON, G. Bottleneck and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. **Nature**, v.4 p.670-681, 2006.

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

THOEN, O.C.; STEELE, J.H.; GILSDORF, M.J. ***Mycobacterium bovis* infection in animals and humans** 2^a ed, 2006.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**, Editora Roca, São Paulo. 556 p. 2004.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. 2.ed. Editora Manole, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6^a edição: São Paulo. ARTMED EDITORA S.A., 1998.

VARELLO K., PEZZOLATO M., MASCARINO D., INGRAVALLE F., CARAMELLI M.; BOZZETTA E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.164-169, 2008.

VITALE, F.; CAPRA, G.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S.

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates and nasal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1050-1055, 1998.

WARDS B.J., COLLINS D.M.; LISLE G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.227-240, 1995.

WATERS W.R; BUDDLE, B.M; VORDERMEIER, H.M.; GORMLEY, E.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C.; BANNANTINE, J.P.; SATBEL, J.R.; LINSKOTT, R.; MARTEL, E.; MILIAN, F.; FOSHAUG, W.; LAWRENCE, J.C. Development and evaluation of an enzymelinked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p.1882–1888, 2011.

WELSH, M.D.; CUNNINGHAM, R.T.; CORBETT, D.M.; GIRVIN, R.M.; MCNAIR, J.; SKUCE, R.A.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M.. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Immunology**, v.114, p.101-111, 2005.

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

WILESMITH, J.W.; CLIFTON-HADLEY, R.S. Tuberculosis in cats. [Letter; comment] **Veterinary Record**, v.134, p.359, 1994.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2009**. Disponível em:<
<http://www.oie.int/manual-of-diagnostictests-and-vaccines-for-terrestrialanimals/>>
Acesso em: 23 Dezembro 2012.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 083/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 054/12

Projeto Pesquisa: "Identificação de DNA de *Brucella abortus* e *Mycobacterium bovis* em vísceras de bovinos abatidos em Frigorífico Exportador"

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima-Ribeiro

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 26 de Setembro de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista
Coordenador *Pro tempore* da CEUA/UFU

APÊNDICE

Apêndice 1. Resultado do exame de tuberculinização dos 40 bovinos reagentes ao teste cervical comparativo, realizado no dia 21 de Agosto de 2012 no Município de Perdizes MG. Os resultados são expressos em milímetros (mm), em que A corresponde a PPD aviária e B PPD bovino. A0 e B0 correspondem a medida inicial da dobra da pele. A diferença de cada medida é expressa por ΔA e ΔB e o resultado final é obtido por meio da média final das duas medidas $\Delta B - \Delta A$. O resultado do teste é interpretado de acordo com a tabela do regulamento técnico do PNCEBT.

Amostra	Idade (anos)	A0	A72	ΔA	B0	B72	ΔB	$\Delta B - \Delta A$	Resultado
1	5	6,2	9	2,8	8,2	15,2	7	4,2	POSITIVO
2	5	6	7,5	1,5	8,5	14	5,5	4	POSITIVO
3	9	4,6	5	0,4	7,6	12,2	4,6	4,2	POSITIVO
4	3	5	7,5	2,5	7,5	17,3	9,8	7,3	POSITIVO
5	9	5	7	2	6,7	13,7	7	5	POSITIVO
6	9	4,5	10,2	5,7	7	20	13	7,3	POSITIVO
7	3	4,7	5,5	0,8	7	14,8	7,8	7	POSITIVO
8	12	6,4	7	0,6	8,6	14,3	5,7	5,1	POSITIVO
9	4	5	7	2	8,5	14,5	6	4	POSITIVO
10	3	5	5,7	0,7	9,5	14,7	5,2	4,5	POSITIVO
11	8	6	7	1	7,5	14,5	7	6	POSITIVO
12	5	8,2	13,5	5,3	8,5	19	10,5	5,2	POSITIVO
13	4	4,6	5,7	1,1	7	12,2	5,2	4,1	POSITIVO
14	6	5,7	6,5	0,8	10	15,5	5,5	4,7	POSITIVO
15	14	6,5	10,5	4	9	21	12	8	POSITIVO
16	9	6,5	12	5,5	6,7	21,2	14,5	9	POSITIVO
17	7	7,1	8,1	1	9,5	15,8	6,3	5,3	POSITIVO
18	12	6	8,6	2,6	9	16,2	7,2	4,6	POSITIVO
19	13	8,5	12,3	3,8	8,5	21	12,5	8,7	POSITIVO
20	8	4,5	7	2,5	6,3	21	14,7	12,2	POSITIVO
21	5	6,8	12,5	5,7	8,1	20,4	12,3	6,6	POSITIVO
22	8	4,5	7	2,5	6,3	18,8	12,5	10	POSITIVO
23	5	6	6,5	0,5	7	12,4	5,4	4,9	POSITIVO
24	6	5,3	6,5	1,2	9	18	9	7,8	POSITIVO
25	13	6,5	7	0,5	7,5	12	4,5	4	POSITIVO

26	6	7,6	12	4,4	11	23	12	7,6	POSITIVO
27	4	6	6,5	0,5	9	14	5	4,5	POSITIVO
28	4	4,5	7	2,5	7,3	18	10,7	8,2	POSITIVO
29	5	6,1	8	1,9	7	14	7	5,1	POSITIVO
30	12	5	12	7	7	21	14	7	POSITIVO
31	4	8,5	11	2,5	8,5	18,5	10	7,5	POSITIVO
32	12	9,4	9,8	0,4	9,5	20	10,5	10,1	POSITIVO
33	3	7,7	10,5	2,8	9,1	19	9,9	7,1	POSITIVO
34	6	7	7,5	0,5	8,5	13,5	5	4,5	POSITIVO
35	4	5,6	8,5	2,9	9	18,6	9,6	6,7	POSITIVO
36	8	5,7	8,5	2,8	7,5	14,4	6,9	4,1	POSITIVO
37	3	4,8	7,5	2,7	8,3	15,7	7,4	4,7	POSITIVO
38	12	6,7	10,5	3,8	7,5	17,2	9,7	5,9	POSITIVO
39	6	5,6	6	0,4	8	13	5	4,6	POSITIVO
40	9	7	7,5	0,5	7	15,8	8,8	8,3	POSITIVO