

ALESSA SIQUEIRA DE OLIVEIRA DOS SANTOS

5

10

15 ***Nested-PCR, de *Mycobacterium bovis* EM GRANULOMA TUBERCULÓIDE***
BOVINO INCLUÍDO EM PARAFINA

20

25

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor em Ciência Animal, na Área de
Concentração de Sanidade Animal

30

35

Orientador: Prof. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho
Co-orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho

40

45

ALESSA SIQUEIRA DE OLIVEIRA DOS SANTOS

5

10

***Nested-PCR, de *Mycobacterium bovis* EM GRANULOMA TUBERCULÓIDE
BOVINO INCLUÍDO EM PARAFINA***

15

20

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor em Ciência Animal, na Área de
Concentração de Sanidade Animal

25

Aprovada em 17 de novembro de 2008

30

Banca examinadora

35

Prof. Elmiro Rosendo do Nascimento (Doutor em Patologia Comparativa) - UFF

40

DSc. Adriane Nunes de Souza (Doutora em Ciências) - UENF

Prof. Márcio Manhães Folly (Doutor em Medicina Veterinária) - UENF

45

Prof. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho (Doutor em Anatomia Patológica) - UENF
(Orientador)

5

10

15

Tentar é correr o risco de fracassar.

Mas os riscos devem ser corridos, porque o maior perigo é não arriscar nada.

Há pessoas que não correm nenhum risco, não fazem nada, não têm nada

20

e não são nada. Somente a pessoa que corre riscos é livre!

(Seneca - orador romano)

25

30

35

40

45

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Reservo esta dedicação ao nosso Deus todo poderoso por me permitir a vida; à minha mãe biológica e à de coração, Zerci Siqueira e Virgínia Celvia, por todos os gestos afetuosos; ao meu grande amor e marido companheiro Aldir Ribeiro e ao meu mais novo companheiro e filho Lucas Siqueira por me transmitirem um intenso e verdadeiro amor, o que me torna a cada dia uma pessoa mais feliz e realizada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar o caminho da minha vida me orientando em todos os momentos e por me abençoar com a graça de conceber um filho e formar
5 uma linda família;

Ao meu marido Aldir Ribeiro que sempre apoiou e vibrou pela minha vitória, sou eternamente grata pela compreensão e por todo gesto de zelo, carinho e amor. Nesta união, toda vitória alcançada é mérito do casal e de Deus. A conquista mais
10 recente foi o nascimento do nosso filho Lucas Siqueira nos permitindo formar uma família vitoriosa, maravilhosa e feliz;

Aos meus adoráveis sogros, Lúcia e Alcir, extensão da minha família por serem os grandes incentivadores para as nossas conquistas;
15

Ao querido e amado irmão Alexandre Luiz, meu exemplo de persistência, motivação e vitória;

Ao meu pai, Luiz Celso, que nos últimos anos acompanhou a realização escrita
20 desse trabalho e sempre elogiou a minha dedicação e conquista;

Ao orientador e amigo, Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho pela dedicação em me orientar cientificamente contribuindo para a minha formação e educação e pelas palavras e conselhos de conforto nos momentos em que mais precisei;
25

Ao co-orientador Gonçalo Apolinário de Souza Filho pelos ensinamentos e incentivo na biologia molecular, pelas orientações científicas e pessoais experientes e pela paciência em cada encontro com a minha pessoa tão ansiosa e “faladeira”. Sem
dúvida, se tornou um grande e admirado amigo na minha vida;
30

Às amigas Ana Bárbara e Luciana Lemos e suas respectivas filhas: Carol, Mariana e Letícia, me emociono neste momento, pois foram muito mais que amigas, foram consideráveis irmãs que me deram carinho, amizade sólida e reservaram um lugar

especial para mim em seus corações. E assim, eu também fiz: vocês sempre estarão em meus pensamentos e no meu coração. Amigas, amo vocês!!!

5 Ao grande amigo Luciano Grillo por ter me proporcionado um ambiente de trabalho alegre e de respeito, pelos ensinamentos e orientações em assuntos da profissão e particulares e pelo companheirismo nos momentos alegres e tristes. Valeu Lucvel!!!

Ao amigo André Fernandes pelos fraternos anos de convivência. Vamos sempre cultivar a nossa grande e verdadeira amizade;

10

Ao técnico e amigo Rodrigo Crespo por toda dedicação prestada para a realização deste trabalho sempre com carinho, alegria e muitas risadas. Te adoro!

15 Às técnicas Valéria Marques e Verônica Lima por toda a atenção, paciência e dedicação disponibilizada para os ensinamentos dos procedimentos da técnica de biologia molecular. Neste meio da ciência se constrói verdadeiras amizades. Do fundo do meu coração, muito obrigada amigas!

20 À pesquisadora Adriane Nunes de Souza por ter sido uma pessoa sempre alegre, prestativa e paciente para as orientações científicas;

25 Às amigas Ana Bárbara, Gisa e Drica e ao amigo Steeven pelas orientações científicas nos ajustes de protocolo, pelo conforto nos momentos de angústia e por me proporcionarem um ambiente agradável e alegre na realização deste trabalho no genoma;

Aos profissionais, alunos e amigos do Setor de Morfologia e Anatomia Patológica, que me permitiram a realização deste trabalho em um ambiente agradável, descontraído e alegre. Sentirei muitas saudades de todos vocês. Muito obrigada!

30

Aos alunos, técnicos e professores do LSA que me permitiram um ambiente agradável, divertido e alegre. Sentirei saudades!

Ao professor Geraldo de Amaral Gravina do Laboratório de Engenharia Agrícola do CCTA pela realização da análise estatística;

5 Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, Janice, Allan, Vinícius, Aline e Bia, pois sempre foram dispostos a ajudar e a ensinar;

Aos amigos funcionários da biblioteca, da secretaria do CCTA e da coordenação de pós-graduação que, sempre, com um sorriso e educação, me ajudaram na orientação de tarefas específicas aos setores;

10

A CAPES e FAPERJ pelos recursos financeiros concedidos;

15 A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) e ao Núcleo de Análise Genômica (NAG) por disponibilizar a estrutura e os recursos para a realização deste trabalho;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste ideal.

20

25

30

35

40

RESUMO

SANTOS, Alessa S.O., D.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Novembro de 2008. *Nested-PCR*, de
5 *Mycobacterium bovis* em granuloma tuberculóide bovino incluído em parafina. Professor Orientador: Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho. Professores Conselheiros: Elmiro Rosendo do Nascimento, Adriane Nunes de Souza e Márcio Manhães Folly.

10

A tuberculose bovina resulta em sérios prejuízos à pecuária de leite e corte e riscos à saúde pública. A OMS elegeu a doença, principalmente a determinada pelo *M. bovis*, uma importante zoonose profissional nos grupos dos magarefes, tratadores de animais e médicos veterinários. Este trabalho objetivou avaliar o valor diagnóstico das técnicas de nested-PCR em amostras das lesões da tuberculose bovina incluídas em parafina e a de PCR, a partir de material repicado destas. As amostras provieram de 72 bovinos positivos para o teste de tuberculina e abatidos em matadouros sob Inspeção Estadual, na região do Norte Fluminense. O nested-PCR gerou um produto de 216pb que permitiu identificar o complexo *M. tuberculosis* em
15 54 amostras sendo que 43 eram de lesões representadas por células epitelióides e necrose caseosa e 11 de casos negativos, sem lesões aparentes. Amplificaram-se 30 das 35 amostras positivas na histopatologia/ZN e, ainda, evidenciou sucesso em 24 das 37 amostras negativas por esta técnica. Em todas as amostras de cultura, o método molecular de PCR permitiu amplificar um produto de 343pb e identificou as
25 amostras do complexo *M. tuberculosis*. O método molecular mostrou sensibilidade de 75% para a identificação do complexo *M. tuberculosis* em amostras de tecido parafinado e 100% para as de cultura. Esses resultados indicam que o nested-PCR aumentou a sensibilidade quando associado à histopatologia de rotina e especial e, com isso, pode ser aplicado como uma ferramenta diagnóstica complementar no
30 rastreio de tuberculose em bovinos, em diversos materiais biológicos, principalmente em amostras de tecidos fixados e incluídos em parafina, pois reduz o risco de contágio através da manipulação da amostra e visa aumentar a sensibilidade e especificidade.

35

Palavras-chave: tuberculose bovina; rastreamento; histopatologia; nested-PCR; patologia molecular.

ABSTRACT

SANTOS, Alessa S.O., D.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. November 2008. Nested-PCR essay for the detection of *Mycobacterium bovis* on paraffin-embedded bovine tuberculoid granuloma; Professor Adviser: Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho. Committee Members: Elmiro Rosendo do Nascimento, Adriane Nunes de Souza e Márcio Manhães Folly.

10 Bovine tuberculosis results in serious damage to livestock milk and meat industry and public health hazards. The WHO chose the disease, caused by *M. bovis*, an important zoonosis for professional groups of the magarefes, animal handlers and veterinarians. This study had the objective to evaluate the application of techniques of: nested-PCR in samples of embedded tissues, and the PCR, in samples of culture,
15 for diagnosis of tuberculosis in cattle. A number of 72 samples were examined of tuberculin-positive animals and slaughtered in slaughterhouses during state sanitary inspection in the North part of Rio de Janeiro State. *Nested-PCR* generated a product of 216bp and allowed a specific identification of *M. tuberculosis* complex in 54 samples while 43 had lesions represented by epithelioid cells and caseous
20 necrosis and 11 were negative. Amplified 30 of the 35 positive samples for histopathology / ZN and also showed success in 24 of the 37 negative samples in histopathology / ZN. The molecular method of PCR produced 343bp fragment in all samples of culture and identified the samples belonging to the *M. tuberculosis* complex. The molecular method showed a
25 sensitivity of 75% for identification of the *M. tuberculosis* complex in samples of formalin-fixed paraffin- embedded tissues and 100% for the samples of culture. These results indicate that *nested-PCR* increased sensitivity when associated with routine and special histopathology, which can be applied as a complementary diagnostic tool in screening for tuberculosis in cattle in various biological materials,
30 mainly in samples of formalin-fixed paraffin- embedded tissues because it reduces the risk of contagion through the manipulation of the sample and aims to increase the sensitivity and specificity.

Key-words: bovine tuberculosis; screening; histopathology; *nested-PCR*; molecular
35 pathology.

SUMÁRIO

5	1. INTRODUÇÃO	11
	2. REVISÃO DE LITERATURA	14
	2.1. Bovinocultura	14
	2.2. Doenças zoonóticas	15
	2.3. Tuberculose em animais domésticos	16
10	2.3.1. Etiologia	19
	2.3.2. Epidemiologia.....	20
	2.3.3. Transmissão.....	22
	2.3.4. Patogenia	24
	2.3.5. Diagnóstico.....	25
15	2.3.5.1. Diagnóstico clínico.....	25
	2.3.5.2. Diagnóstico <i>post mortem</i>	25
	2.3.5.3. Diagnóstico histopatológico	27
	2.3.5.4. Diagnóstico imunológico.....	29
	2.3.5.5. Diagnóstico bacteriológico	30
20	2.3.5.6. Diagnóstico molecular.....	31
	2.4. Fatores de risco e controle	35
	3. MATERIAL E MÉTODOS	37
	3.1. Amostras de tecido fixado e incluído em parafina	37
25	3.1.1. Processamento de retirada da parafina e extração do DNA.....	37
	3.2. Amostras de cultura	38
	3.2.1. Extração do DNA	38
	3.3. Desenho dos iniciadores (primer)	39
	3.4. Reação de Cadeia em Polimerase (PCR)	41
30	3.4.1. PCR das amostras de tecido fixado e incluído em parafina.....	41
	3.4.1.1. Purificação dos produtos de PCR em gel de agarose	42
	3.4.2. PCR das amostras de cultura	43
	3.4.2.1. Sequenciamento das amostras de cultura.....	43
	3.4.2.2. Análise e alinhamento das seqüências.....	43
35	4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
	5. CONCLUSÕES	50
	6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose nos bovinos possui distribuição mundial, concentrando-se, principalmente, em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, notadamente, naqueles com criações intensivas de bovinos leiteiros. Esta enfermidade determina prejuízos à pecuária, pois interfere negativamente na capacidade de produção animal e na oferta de alimentos à população e, compromete a saúde da população que consome produtos de origem animal. A doença pode ser introduzida no rebanho, principalmente pela aquisição de animais infectados, podendo propagar-se nos bovinos sadios independente do sexo, raça e idade (SOUZA et al., 1999). Porém, animais adultos são mais suscetíveis devido à maior possibilidade de contágio no decorrer dos anos. Entre as raças, os zebuínos são mais resistentes que os taurinos e bubalinos (ACHA e SZYFRES, 1989; CORRÊA e CORRÊA, 1992).

O organismo responsável por causar a tuberculose bovina, por mais de um século descoberto, é o *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), um bacilo álcool-ácido resistente que, quando corado pela fucsina a quente, não se descora pelo álcool clorídrico (coloração de Ziehl-Neelsen) (TRABULSI, 1999). Pertencem ao reino *Procaryotae*, divisão *Firmicutes*, classe *Thallobacteria*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium* (GOMES, 2002). As espécies causadoras da tuberculose clássica foram agrupadas no “Complexo *M. tuberculosis*”, constituído pelo *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* (WEDLOCK et al., 2002), *M. caprae* e o mais recentemente inserido no complexo, o *M. pinnipeddi* (COUSINS et al., 2003).

Embora a transmissão do *M. bovis* possa ocorrer por várias vias, a forma mais freqüente da doença é pulmonar, pela via aerógena, através da inalação de gotículas contaminadas. A infecção pela via digestiva é possível, através da ingestão de fezes, água, pastagens, leite e fômites contaminados. Logo nos primeiros dias de vida, os bezerros podem se infectar através da ingestão do colostro contaminado ou, até mesmo, por fômites ou muco, pelo hábito da mãe lambar o filhote (PHILLIPS et al., 2003).

Dados do Ministério da Agricultura referentes à prevalência da tuberculose bovina no Brasil, realizados entre 1974 e 1984, apresentaram um coeficiente de 1,82%, representados por 6.491 focos da doença (BUBNIAK, 2000). O rebanho

bovino do Brasil está estimado em mais de 200 milhões de cabeças (EMBRAPA, 2006). No Brasil, dados de 1986 mostraram que o nível de infecção estava entre 0,9-2,9%, com 6,2-26,3% dos rebanhos possuindo animais infectados sem que essas taxas mostrassem tendências de diminuição (KANTOR e RITTACCO, 1994). O
5 impacto negativo da doença na produtividade pecuária mundial acarreta perda anual em torno de três bilhões de dólares (GARNIER et al., 2003), morte dos animais e impossibilidade de atender às exigências sanitárias dos países importadores de bovinos e seus subprodutos (JORGE et al., 2004).

O Ministério da Agricultura instituiu o Programa Nacional de Controle e
10 Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) com o objetivo de reduzir os prejuízos causados por essas zoonoses na saúde humana e animal e de promover a competitividade da pecuária nacional. Para isso, adotou a obrigatoriedade no Serviço de Inspeção Sanitária do envio de lesões sugestivas detectadas no abate a um laboratório credenciado para a confirmação da doença e o
15 rastreamento do foco nas propriedades (MAPA, 2001).

Para o diagnóstico da tuberculose bovina no animal vivo, é aplicado o teste alérgico intradérmico, que pode ser associado às manifestações clínicas, testes sorológicos (Elisa e γ - IFN) e a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR-Polymerase Chain Reaction). No animal morto, a necropsia baseada nas lesões
20 macro e microscópicas é o método mais comum para comprovar a doença (OIE, 2000). As amostras processadas para exames histopatológicos podem ser submetidas aos métodos de colorações de rotina hematoxilina e eosina (HE) e especiais, como: Ziehl-Neelsen (ZN), Kinyoun-Fite e Imuno-histoquímica (método ABC-P, DAKO). É recomendável, o diagnóstico bacteriológico por cultivo do agente
25 a partir de amostras teciduais congeladas, associado ao histopatológico, o que permite a confirmação do diagnóstico. Apesar de o isolamento ser um diagnóstico definitivo, pode requerer mais do que 12 semanas para a confirmação cultural da infecção e a identificação da cepa por métodos bioquímicos (CORNER, 1994). MILLER et al. (2002) demonstraram que a técnica de PCR em tecido fixado em
30 formol associado à cultura bacteriológica para a detecção e identificação das micobacterioses de ruminantes, permitiu um aumento na eficácia do diagnóstico laboratorial. A técnica de PCR utilizada para a detecção de membros do complexo

M. tuberculosis tem permitido resultados satisfatórios nos estudos de vários grupos de pesquisadores (ZANINI et al., 2001).

5 A aplicação da PCR tem sido associada a um diagnóstico rápido de muitas doenças, com especial utilização na detecção direta do *M. bovis* em amostras teciduais de bovinos (KOLK et al., 1992; KOX et al., 1994; LIEBANA et al., 1995). A PCR tem sido usada também em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina para detectar o grupo do *M. tuberculosis* e distingui-lo do *M. avium* (OIE, 2000; COETSIER et al., 2000). O estudo de análise de DNA pode ser mais rápido e seguro do que os métodos bioquímicos para a diferenciação do *M. bovis* de outros
10 membros do complexo *M. tuberculosis* (OIE, 2000).

A tuberculose bovina resulta em grandes perdas econômicas na pecuária de leite e corte e, enquanto zoonose reflete-se em grandes prejuízos na saúde pública. No Estado do Rio de Janeiro, a taxa de infecção da tuberculose humana é de quase cem por grupo de cem mil habitantes (o dobro da média nacional) (Jornal O GLOBO,
15 2007). Esta doença possui distribuição mundial com grande impacto negativo na pecuária nacional, por isso a necessidade do controle e erradicação da doença. Os objetivos deste trabalho foram: aplicar e avaliar a técnica de *nested-PCR* em amostras teciduais incluídas em parafina, confrontar os resultados do *nested-PCR* com as características histológicas e morfometria bacilífera quantitativa, investigar o
20 potencial do diagnóstico molecular, *nested-PCR*, sob o ponto de vista epidemiológico e realizar o seqüenciamento e análise das seqüências obtidas

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bovinocultura

O Brasil possui excelentes condições naturais para a produção agropastoril e ocupa merecido destaque no contexto das nações produtoras de alimentos. O País vem exercendo, há algum tempo, o aprimoramento da produção pecuária. O fato de possuir o maior rebanho bovino do planeta assume significância ímpar em razão, além de sua quantidade, da qualidade genética e das tecnologias empregadas na produção (ALMEIDA et al., 2004).

Segundo a Pesquisa da Produção Pecuária Municipal divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o rebanho bovino brasileiro atingiu 207,2 milhões de animais, o que representou um aumento de 1,3% em relação a 2004 e manteve sua posição de maior rebanho do mundo (IBGE, 2005; EMBRAPA, 2006). O crescimento de 4,58% sobre o ano de 2003 se deve às exportações de carne. Atualmente, o Brasil exporta carne bovina para 140 países, assumindo uma situação de evidência mundial como o maior exportador de carne (IBGE, 2005). A crise da “Vaca Louca” - Encefalopatia Espongiforme Bovina e, mais recente, da “Gripe do Frango” - Influenza aviária contribuiu para que o Brasil assumisse a liderança mundial nas exportações de carne bovina, como já havia conquistado em relação a suínos e aves (ROXO, 2006).

Na pecuária de leite, o Brasil também registrou um crescimento significativo nas últimas três décadas. O País assumiu a sexta posição como maior produtor de leite do mundo e cresce a uma taxa anual de 4%, superando os outros países que ocupam os primeiros lugares (EMBRAPA, 2006).

Apesar dos grandes avanços da pecuária nacional, muitas falhas permanecem em relação ao monitoramento das condições sanitárias do rebanho brasileiro. Adicionalmente, falhas em sistemas de vacinação associadas a métodos de diagnóstico lentos e de baixa sensibilidade, agravam os riscos de disseminação de doenças. Além de ser, hoje, um dos fatores limitantes para a comercialização de carne (ALMEIDA et al., 2004).

2.2. Doenças zoonóticas

As zoonoses são enfermidades comuns ao homem e aos animais que, atualmente, representam uma importante ameaça para a saúde humana e animal em todo o mundo, (Macedo, 1986 *apud* BUBNIAK, 2000).

Entre as doenças transmitidas pela carne e outros produtos de origem animal, destacam-se as seguintes: a tuberculose, a brucelose, o complexo teníase x cisticercose, as toxinfecções alimentares, que são provocadas por bactérias (*Salmonella sp.*, *Yersinia enterocolítica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Clostridium perfringens*), ou suas toxinas, causando uma síndrome gastroentérica; e parasitoses (*Toxoplasma gondii*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*) (MONTEIRO et al., 2004; OLIVAL e SPEXOTO, 2004).

A tuberculose é uma zoonose de distribuição mundial, cuja ocorrência sofre variação por região e país, sendo considerada uma antropozoonose e também uma zooantroponose (BUBNIAK, 2000). Uma importante razão para o interesse na tuberculose bovina é a susceptibilidade do homem à doença pelo mesmo agente etiológico, *Mycobacterium bovis*. Desta forma, a tuberculose intestinal pode estar relacionada à ingestão de leite cru, sendo considerada a principal causa de manifestação da doença não-pulmonar em regiões rurais (GRANGE e YATES, 1994). No mundo todo, a prática de se beber leite cru está associada com o hábito e o modo de vida da população rural e aumenta o risco de infecção, principalmente em crianças (PRITCHARD, 1988). Estima-se que 50 a 60% do leite produzido no Brasil seja comercializado sem qualquer controle sanitário, impondo risco de transmissão de tuberculose, bem como de outras enfermidades, ao homem através do consumo de leite e derivados crus (ROXO, 2006).

Mycobacterium bovis também tem sido isolado de pacientes imunodeprimidos, infectados pelo vírus HIV. A comprovação dessa relação foi observada nos países industrializados diante do grande número de seres humanos infectados pelo vírus HIV e *M. bovis*, constituindo uma significativa causa dos altos coeficientes de morbidade e mortalidade (COSIVI et al., 1998). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1993, no Brasil, suspeitava-se que o *M. bovis* fosse responsável por aproximadamente 4.000 dos 80.000 casos de tuberculose registrados por ano (LEITE et al., 2003). Estimativas indicam que a

adoção de investimentos na infra-estrutura laboratorial da rede pública, possibilitando a realização de isolamento e identificação das espécies de micobactérias, a incidência da tuberculose humana por *M. bovis* poderá atingir um patamar mais elevado (LILENBAUM, 1998).

5 As implicações da tuberculose bovina para a saúde humana e animal em associação com os regulamentos do comércio internacional têm resultado na adoção de programas de erradicação para o controle da doença por todo o mundo (DOHERTY e CASSIDY, 2002).

10 **2.3. Tuberculose em animais domésticos**

A tuberculose bovina é uma enfermidade infectocontagiosa, de caráter zoonótico, causada pelo *Mycobacterium bovis*. A doença é predominantemente subclínica, inicialmente, evoluindo para a cronicidade, com lesões granulomatosas
15 (NEILL et al., 2001).

As doenças transmissíveis que acometem os animais domésticos, responsáveis pela queda de produção reprodutiva, pneumonias, enterites e outros, representam um capítulo de particular importância em medicina veterinária, pois comprometem os índices de produção e produtividade da atividade pecuária
20 (RADOSTITS et al., 2000). A tuberculose bovina provoca importantes efeitos socioeconômicos e em Saúde Pública nos países afetados, com um impacto significativo no comércio internacional de animais vivos e seus produtos (WEDLOCK et al., 2002). A tuberculose bovina, como a humana, volta a assumir grande importância em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento,
25 alcançando coeficientes acima de 1%, acometendo aproximadamente 3,5 milhões de animais só entre Brasil e Argentina (BIANCHINI & RODRIGUES, 2008).

Na agricultura familiar, cada animal doente, além de representar prejuízo econômico pela queda na produtividade, também significa risco para a saúde dos demais animais, e de humanos, em se tratando de zoonoses (HOMEM, 1999;
30 AGUIAR, 2008).

As perdas econômicas são decorrentes da morte dos animais, perda do potencial produtivo, condenação de carcaças com lesão e descréditos das propriedades afetadas (WEDLOCK et al., 2002). Estima-se uma redução econômica

em 10% da produção leiteira e em 20% da produção de carne bovina brasileira (GRANGE e YATES, 1994; FERREIRA e BERNARDI, 1997).

Na América do Sul estimou-se que, possivelmente estivessem infectados 4 milhões de animais, o que representaria perdas econômicas consideráveis devidas à doença nas vacas leiteiras e no gado de corte, e conseqüente redução na produção de carne, leite e derivados lácteos, constituindo um sério fator limitante para o desenvolvimento da indústria de criação de gado, incluindo o mercado internacional de animais e de produtos de origem animal, e uma ameaça para a saúde humana (OPAS, 1992; ABRAHÃO, 1998; ABRAHÃO et al., 2005).

Na Argentina, o atraso na 1ª lactação, a diminuição no número e duração das lactações resultaram no decréscimo de 18% na produção de leite de vacas tuberculosas quando comparados com o rebanho leiteiro sadio (Nader e Husberg, 1988 *apud* KANTOR e RITTACCO, 1994).

No Brasil, a tuberculose bovina está disseminada por todo o território nacional, porém a sua prevalência e distribuição regional, não estão bem caracterizadas (MAPA-PNCEBT, 2001). Estima-se que os animais infectados perdem de 10 a 25% de sua eficiência produtiva, além da perda do prestígio e da credibilidade da propriedade.

Considerando a importância que a pecuária assume na economia nacional, os dados referentes à frequência da tuberculose bovina nos rebanhos brasileiros não permitem uma visão exata sobre a verdadeira extensão do problema (BRANDÃO, 1994; SOUZA et al., 1999; LILENBAUM, 2000).

A tuberculose bovina é também responsável por graves perdas econômicas nas criações de outros animais domésticos de produção, tais como: búfalos, ovinos, aves e suínos, sendo motivo de sérias restrições comerciais e desvalorização (FREITAS et al, 2001; RIBEIRO, 2003).

A infecção nos suínos ocorre principalmente pela via digestiva, pois está intimamente relacionada com o tipo de alimentação. Os suínos podem ser infectados pelos três tipos clássicos do bacilo da tuberculose. A infecção por determinado agente depende da alimentação oferecida e do local onde são criados. A criação de suínos e aves em conjunto, o hábito de coprofagia, alimentação com resíduos provenientes de hospitais e sanatórios etc. são fatores que favorecem a infecção nesta espécie. Para o diagnóstico a tuberculinização é realizada através da prova intradermoauricular, sendo que a tuberculina bovina é inoculada em uma orelha (na

junção com o pescoço) e a aviária na outra. A reação positiva apresenta uma tumefação inflamatória local após 48 horas após a inoculação.

Nos caprinos e ovinos, a doença é muito semelhante à tuberculose bovina. O agente envolvido geralmente é o *M. bovis*, embora o *M. tuberculosis* e *M. avium* já
5 tenha sido isolado (SEVA et al., 2002). O contágio ocorre devido à coabitação desses animais com vacas doentes. As lesões se distinguem dos bovinos, pois os nódulos são caseosos, mas raramente apresentam calcificações. Na tuberculose pulmonar do caprino predomina, com a evolução, a formação de cavernas, e nas serosas, a tuberculose perolada. SEVA et al. (2002) utilizaram um teste de
10 tuberculina intradérmica comparativa para selecionar os animais positivos dos negativos, mas as limitações desse teste são as mesmas das relatadas no teste utilizado para os bovinos (BIANCHINI & RODRIGUES, 2008).

A tuberculose nas aves é causada comumente pelo *M. avium* e a infecção se dá pela ingestão de água e alimentos infectados pelas fezes de aves tuberculosas
15 introduzidas no plantel. A doença se manifesta a partir de um ano de idade com evolução lenta. Devido à redução do apetite, a ave emagrece muito com palidez da crista e das barbelas e, diarreia. O fígado apresenta lesões em 90 a 95% dos casos, sendo que nos casos de ruptura do fígado resulta em morte súbita. As lesões no fígado se caracterizam por tubérculos, como a lesão da tuberculose miliar nos
20 bovinos, mas a calcificação é rara. A prova de tuberculinização é a intradérmica, onde a tuberculina aviária é diluída a 50% e inoculada na espessura da barbela. A reação quando positiva evidencia uma tumefação na barbela dentro de 48-72 horas, desaparecendo em seguida. A tuberculose nas aves pelo *M. tuberculosis* pode ocorrer nos papagaios e nos canários (BIANCHINI & RODRIGUES, 2008).

25 A tuberculose dos búfalos tem características muito semelhantes a dos bovinos. As lesões observadas são associadas principalmente ao *M. bovis*, pois são semelhantes ao da tuberculose bovina, onde a lesão se caracteriza por múltiplos granulomas em diferentes fases de evolução, alguns com necrose central e outros ainda com calcificação distrófica. No Brasil, a doença tem sido percebida nos
30 criatórios e abate, mas a prevalência, extensão do processo infeccioso, localização das lesões, via de infecção e agentes micobacterianos ainda são pouco conhecidos nesta espécie (FREITAS et al., 2001).

2.3.1. Etiologia

As micobactérias são bastonetes fracamente gram-positivos, às vezes, filamentosas, imóveis, sem cápsula nem esporos, amplamente distribuídos na natureza, sendo muitos saprófitas e alguns patogênicos oportunistas (DUNGWORTH, 1991). Pertencem ao reino *Procaryotae*, divisão *Firmicutes*, classe *Thallobacteria*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium* (GOMES, 2000). As diferentes espécies de micobactérias se caracterizam por reter a coloração vermelha da fucsina fenicada e, por isso, denominadas bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Esta expressão significa que estes germes, quando corados pela fucsina, não se deixam descorar por uma mistura de álcool e ácido clorídrico (TRABULSI, 1999). Tal característica se deve à complexidade da sua parede celular, composta por uma espessa camada de lipídeos e ácidos micólicos (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Mycobacterium bovis, organismo responsável por causar a tuberculose bovina, é um agente infeccioso não só para o bovino, mas também para o homem, cão, gato, porco, ovelha, cabra e cavalo (MATTHIAS, 1988). Tal espécie de micobactéria está inserida no complexo *M. tuberculosis*, incluindo ainda o *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* (WEDLOCK et al., 2002), *M. caprae* e o mais recentemente inserido no complexo, o *M. pinnipeddi* (COUSINS et al., 2003).

A demonstração do *M. bovis* em material patológico pode ser conseguida mediante cultura bacteriológica (MATTHIAS, 1988), onde crescem em meios especiais, compostos por gema de ovo e amido, enriquecidos por asparagina e contendo verde malaquita para inibir contaminantes. O meio sólido mais utilizado é o Löwenstein- Jensen (LJ) com piruvato (CORRÊA e CORRÊA, 1992). Ao contrário do *M. tuberculosis*, o *M. bovis* apresenta um crescimento escasso em meios sólidos em um período de 3-4 semanas, sobre os quais formam colônias úmidas, brilhantes, lisas, achatadas, com coloração amarelada ou com uma camada contínua como um véu (MATTHIAS, 1988).

Na etiologia da tuberculose animal, são importantes as espécies *M. bovis*, *M. tuberculosis* e o *M. avium* (CORRÊA e CORRÊA, 1992). Estas espécies ocorrem com mais freqüência em seus respectivos hospedeiros, entretanto, pode ocorrer

infecção cruzada (DUNGWORTH, 1991). As outras espécies de micobactérias causam doenças que podem ser denominadas como micobacterioses ou recebem nomes próprios, como a paratuberculose ou doença de Johne (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

5 Mesmo com as evidências da resistência das micobactérias nas fezes bovinas nos pastos e no esterco dessecado nos estábulos escuros, as mesmas se mostram sensíveis quando submetidas ao calor (pasteurização) e frente à ação da luz solar direta. Resistem por muitas horas ou dias aos desinfetantes comuns, sendo a formalina, o ácido cresolsufônico e soluções cloradas a 3-4% os meios químicos
10 mais ativos contra a bactéria (MATTHIAS, 1988). Genov (1965) *apud* MORRIS et al. (1994) inoculou *M. avium*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* nas fezes, sangue e urina e observou que todos permaneceram viáveis no período máximo de 332 dias a 24°C, quando protegidos da luz solar direta. Segundo Soparcker (1917) *apud* PHILLIPS et al. (2003), o *M. bovis* parece ser mais resistente à luz solar do que o *M. tuberculosis*.

15

2.3.2. Epidemiologia

A tuberculose bovina possui distribuição mundial e determina prejuízos, em especial para os países em desenvolvimento onde a sua prevalência é maior e o
20 conhecimento do problema é limitado (ALMEIDA et al., 2004).

A prevalência da doença nos países é variável de acordo com o sistema de exploração animal. A alta incidência da tuberculose é mais evidente nos rebanhos leiteiros estabelecidos, enquanto, para os rebanhos de corte criados extensivamente, a tuberculose é de menor importância epidemiológica (ACHA e SZYFRES, 1989;
25 SOUZA et al., 1999).

Muitas espécies são suscetíveis ao *M. bovis*, mas poucas atuam como hospedeiros mantenedores da infecção, dentre elas estão os bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*) no mundo inteiro, os búfalos (*Bubalus bubalis* e *Syncerus caffer*), sobretudo na Austrália e na África equatorial, respectivamente. O bisão (*Bison bison*)
30 na América do Norte e os cervos *Odocoileus virginianus* e *Cervus elaphus* na Nova Zelândia e América do Norte. Também na Nova Zelândia, o marsupial *Trichosurus vulpecula* e no Reino Unido e Irlanda, o furão *Meles meles* (MORRIS et al., 1994).

Dados do Ministério da Agricultura referentes à prevalência da tuberculose bovina no Brasil, realizados entre 1974 e 1984, apresentaram um coeficiente de 1,82%, representados por 6.491 focos da doença (BUBNIAK, 2000). E no período de 1989 a 1998, a prevalência média nacional foi de 1,3% de animais infectados (MAPA, 2001).

LANGENEGGER et al. (1981) trabalharam com 24 rebanhos leiteiros da região Sudeste do Brasil, entre os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, e verificaram coeficiente de reatividade de 9,7%. No Sul do Brasil, RICCETTI et al. (1989) diagnosticaram a doença em 60% dos municípios. No estado de São Paulo, SAMARA et al. (1996) testaram 748 bovinos e identificaram coeficientes de prevalência de 6,8%, enquanto SOERENSEN et al. (1992) estudaram um rebanho estabulado com 331 vacas de aptidão leiteira e verificaram 32% de reatividade às provas intradérmicas, confirmando com a necropsia e cultura.

No Rio de Janeiro, LILENBAUM (1998) testou 1632 bovinos de aptidão leiteira em diversas propriedades com histórico sugestivo de tuberculose e verificou que 12,7% de animais foram reativos ao teste intradérmico cervical simples.

No Norte e Noroeste Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, a prevalência de animais abatidos nos estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF) de Carnes, com lesões macroscópicas típicas de tuberculose, no período de dois anos e meio foi de 0,26%, enquanto que nos estabelecimentos sob Inspeção Estadual, a prevalência foi de 0,47% no período de um ano. Os animais procedentes das regiões dos Lagos, Norte Fluminense, Noroeste Fluminense, apresentaram a prevalência de 1,14%, 0,46%, 0,36%, respectivamente, sendo que a região Metropolitana e região Serrana não houve prevalência da doença (FERREIRA, 2005).

Um estudo realizado em 1999 nas regiões do Triângulo Mineiro e Centro Sul no estado Minas Gerais abordou 1600 propriedades e 23000 animais e estimou uma prevalência de 0,8% de animais infectados e 5% das propriedades estudadas, sendo que nas propriedades com exploração de leite com ordenha mecânica, o coeficiente foi de 15% (BAPTISTA et al., 2004).

SCHENK et al. (1982) concluíram que a prevalência (0,2%) encontrada para a tuberculose bovina no estado do Mato Grosso do Sul foi baixa se comparada à taxa estimada (2,62%) para o Brasil. A justificativa desse resultado foi que os animais utilizados nesse estudo eram de corte, normalmente, submetidos à

exploração extensiva. Por outro lado, SALAZAR (2005) relatou a ocorrência de 0,05% quando estudou bovinos sadios ao exame *ante mortem*, mas com lesões sugestivas de tuberculose no exame *post mortem*.

5 A prevalência da tuberculose bovina em estudos realizados a partir da inspeção de carcaças em matadouros-frigoríficos foi de 5,16% (3.561/ 69.057) no Pará (ALFINITO e OLIVEIRA, 1986), 0,64% (47.358 / 7.317.719) no Rio Grande do Sul (ANDRADE et al., 1991), 0,36% (5.334 / 1.495.976) em São Paulo (RICCETTI et al., 1989) 0,17% (267 / 161.437) em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 1986).

10 Com a implementação dos programas de controle de tuberculose bovina, alguns países da América do Sul, como Uruguai, Venezuela e Paraguai, tiveram uma redução na prevalência da doença de 4,5 para 0,01%, de 1963-1984; 3,48 para 0,37%, de 1954-1964 e de 1,40 para 0,24%, de 1981-1990, respectivamente (KANTOR e RITTACCO, 1994).

15 Nos EUA, Canadá e países da Europa a prevalência da doença foi controlada pela preconização das campanhas de erradicação e controle, através do teste de tuberculina e abate dos animais infectados (JONES et al., 1997).

20 Em países que não adotam efetivas medidas de controle e erradicação a taxa de mortalidade em bovinos se apresenta em torno de 8 a 10% e a letalidade natural pode alcançar 50% se a enfermidade se desenvolver, pois os bovinos de corte são abatidos antes do desenvolvimento do quadro crônico da doença (MORRIS et al., 1994)

2.3.3. Transmissão

25 A tuberculose bovina acomete espécies de mamíferos domésticos e silvestres. Algumas espécies silvestres, como texugos do Reino Unido e veados do Norte da Irlanda, representam uma fonte mantenedora da infecção (MORRIS et al., 1994; COSIVI et al., 1998; PHILLIPS et al., 2003), interferindo nos programas de erradicação e controle da tuberculose em rebanhos bovinos (GORMLEY e
30 COLLINS, 2000).

Embora a transmissão do *M. bovis* possa ocorrer por várias vias, a forma mais freqüente da doença é pela via aerógena, através da inalação de gotículas contaminadas. A infecção pela via digestiva é possível, através da ingestão de fezes, água, pastagens, leite e fômites contaminados (PHILLIPS et al., 2003).

Existem vias menos comuns, como a via cutânea, que requer inicialmente uma porta de entrada para a instalação do processo infeccioso. Ou ainda a via genital, pelo coito, onde são produzidas infecções por contato resultando no aparecimento de lesões no pênis, na vulva e na vagina. Na tuberculose uterina, a transmissão congênita, embora rara, pode ocorrer via cordão umbilical (MATTHIAS, 1988; NEILL et al., 2001).

Existem relatos da possível transmissão da tuberculose dos seres humanos para os bovinos. Nesses casos, a infecção é principalmente pela via respiratória, mas existem ocorrências de humanos com tuberculose geniturinária, que infectam os bovinos ao urinarem nos cochos. Uma maior atenção dos médicos e veterinários deve ser requerida em relação à atuação do homem, como importante fonte de infecção (GRANGE e YATES, 1994; GRANGE, 2001).

Em bovinos adultos, 95% dos casos de tuberculose são causados pelo *M. bovis*. Há relatos de raros casos de tuberculose bovina progressiva causada pelo *M. tuberculosis*, causando uma doença que pode regredir ou curar-se espontaneamente. O *M. avium* também tem sido considerado como patogênico para os bovinos, causando a doença progressiva generalizada, com localização nos linfonodos mesentéricos (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Embora incomum, a tuberculose humana causada pelo *M. bovis* é um problema de saúde pública, e quase sempre ocorre pela inalação de aerossóis ou pelo consumo do leite contaminado. Esse problema é minimizado quando o leite é submetido ao processo de pasteurização. Os médicos veterinários e magarefes estão sujeitos à infecção através da inalação de aerossóis gerados durante o manuseio das carcaças contaminadas. O homem quando se contamina ainda jovem, pode apresentar linfadenopatia cervical (escrofulose), lesões intestinais, tuberculose cutânea crônica (lupus vulgaris) e outras formas não-pulmonares (GRANGE e YATES, 1994; COSIVI et al., 1998; GRANGE, 2001).

Na América Latina, estima-se que o *M. bovis* seja o responsável pela ocorrência de 2% dos casos de tuberculose pulmonar e 8% da forma não-pulmonar em humanos, sendo a porcentagem mais alta em regiões de criação intensiva de gado leiteiro (GRANGE, 2001).

2.3.4. Patogenia

Quando a infecção se dá pelo trato respiratório (aerossóis), o pulmão é o órgão primeiramente atingido, assim como os linfonodos regionais. Já quando a
5 infecção é pela via digestiva, a lesão se dá no sítio de entrada, principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos, sendo esta a fonte de maior relevância nos bezerros, os quais se infectam ao mamar (NEILL et al., 2001; POLLOCK, 2002). O conjunto de lesão do local de entrada e do linfonodo regional denomina-se complexo primário.

10 Através das vias linfáticas e hematógenas, os bacilos podem disseminar-se e ocasionar a infecção generalizada, onde as lesões podem se estabelecer no fígado (Figura 1A), rins (Figura 1B), intestinos, serosas (Figura 1D) e outros órgãos (ROXO, 1997; LÓPEZ, 1998). Quando a lesão é maciça, os tubérculos caseosos expandidos podem romper um vaso sangüíneo e os bacilos alcançarem a
15 circulação, estabelecendo a disseminação hematógena. O curso da doença, depois de generalizada, é rápido e denominado como tuberculose miliar (Figura 1A), devido ao grande número de tubérculos do tamanho de sementes de milho que se desenvolvem em muitos tecidos e órgãos (DUNGWORTH, 1991; LÓPEZ, 1998), sendo rara no útero (Figura 1C), conforme MATTHIAS (1988) e LILENBAUM (1998).

20 A resposta imune bovina ao *M. bovis* parece ser complexa e dinâmica durante a infecção e envolve uma série de eventos celulares. A resposta mediada por células é dominante, com pouca ou nenhuma detecção de anticorpos, com exceção de lesões disseminadas e extensas vistas em animais anérgicos. Esta resposta é iniciada após o reconhecimento por um linfócito do tipo T de um antígeno
25 micobacteriano processado e associado ao complexo maior de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* - MHC) de células apresentadoras, como os macrófagos. Todo este conjunto de eventos desencadeia a liberação de citocinas, gama interferon (IFN- γ) e interleucina (IL), que são cruciais na ativação e atração dos macrófagos ao foco infeccioso. No estágio inicial, a resposta imunológica deverá
30 destruir ou inibir o microrganismo, mas posteriormente, podem ocorrer reações de hipersensibilidade do tipo retardada que tendem à formação de granulomas e necrose caseosa tecidual, resultando em redução funcional do órgão afetado (NEILL et al., 2001; WEDLOCK et al., 2002).

Nos focos de infecção, há acúmulo de linfócitos e macrófagos, que se modulam em células epitelióides e gigantócitos de Langhans, formadas pela fusão dos macrófagos. Inicialmente, as lesões consistem de pequenos tubérculos caracterizados como formações nodulares firmes, de cor branca a amarelada, constituídas de células epitelióides e gigantes de Langhans, rodeadas por uma camada de linfócitos, de células plasmáticas e de monócitos. Com a evolução da lesão, o granuloma tuberculoso desenvolve uma fibroplasia periférica e necrose caseosa central, na qual podem ser observadas áreas de mineralizações por precipitações de sais de cálcio. A necrose é resultado da hipersensibilidade mediada por células e é de caráter caseoso. A calcificação é característica de algumas espécies animais, não sendo observada na tuberculose aviária (DUNGWORTH, 1991; JONES et al., 1997; LÓPEZ, 1998; NEILL et al., 2001).

Conforme NEILL et al. (2001), para uma melhor compreensão da completa patogênese da tuberculose bovina é importante relacionar as fontes de contaminação, o início da infecção e as respostas imunológica e patológica.

2.4. Diagnóstico

2.4.1. Diagnóstico clínico

20

Na fase inicial da doença, a clínica não é de expressão para o diagnóstico, pois o animal embora infectado e com lesões localizadas, muitas vezes não traz evidência clínica, apresentando-se aparentemente sadio. O exame clínico se baseia na auscultação, percussão, termometria e na palpação de glândulas mamárias e linfonodos superficiais, onde se avalia a linfadenomegalia e a sensibilidade à dor. No momento do manejo dos animais, também se pode avaliar os sinais de dispnéia, intenso cansaço, tosse seca improdutiva e produção de secreção nasal (ROXO, 1997).

2.4.2. Diagnóstico *post mortem*

30

O diagnóstico anatomopatológico ou *post mortem* da tuberculose bovina, a partir da necropsia de casos clínicos e da inspeção sanitária de carnes em matadouros-frigoríficos, segue com a detecção de lesões típicas macro (Figura 1) e

microscópicas (Figura 2), aceito como diagnóstico conclusivo em áreas enzoóticas. Afora essa condição epidemiológica, a necropsia deve ser seguida do isolamento bacteriológico para o diagnóstico definitivo (CORRÊA e CORRÊA, 1992; CORNER, 1994; SEVA et al., 2002).

5 A inspeção sanitária de carnes em bovinos, que é um ato necroscópico, corresponde a um exame meticoloso de pelo menos 6 pares de linfonodos entre os da cabeça, torácicos, mesentéricos e da carcaça, bem como dos pulmões, fígado, baço, rim, úbere e órgãos genitais, podendo identificar até 95% dos animais com lesões macroscópicas. Esse procedimento é empregado, muitas vezes, em animais
10 reagentes à tuberculina, permitindo uma avaliação criteriosa das lesões macroscópicas dos tecidos e a colheita asséptica de tecidos intactos para exames mais detalhados no laboratório (CORNER, 1994). SANTOS, (2004) demonstrou que dentre os animais reativos para o teste de tuberculina, 61,8% apresentaram lesões macroscópicas típicas, próximos do coeficiente de 52% detectado por CORNER et
15 al. (1994). Para CORNER et al. (1994), esta proporção poderia aumentar significativamente com o emprego de um exame anatomopatológico mais detalhado, razão pela qual os animais reativos para o teste de tuberculina sem lesões visíveis não podem ser caracterizados como falso-positivos ou reatores sem lesões visíveis, considerando que o método de inspeção *post mortem* aplicado e os locais
20 anatômicos examinados interferem na sensibilidade do exame macroscópico.

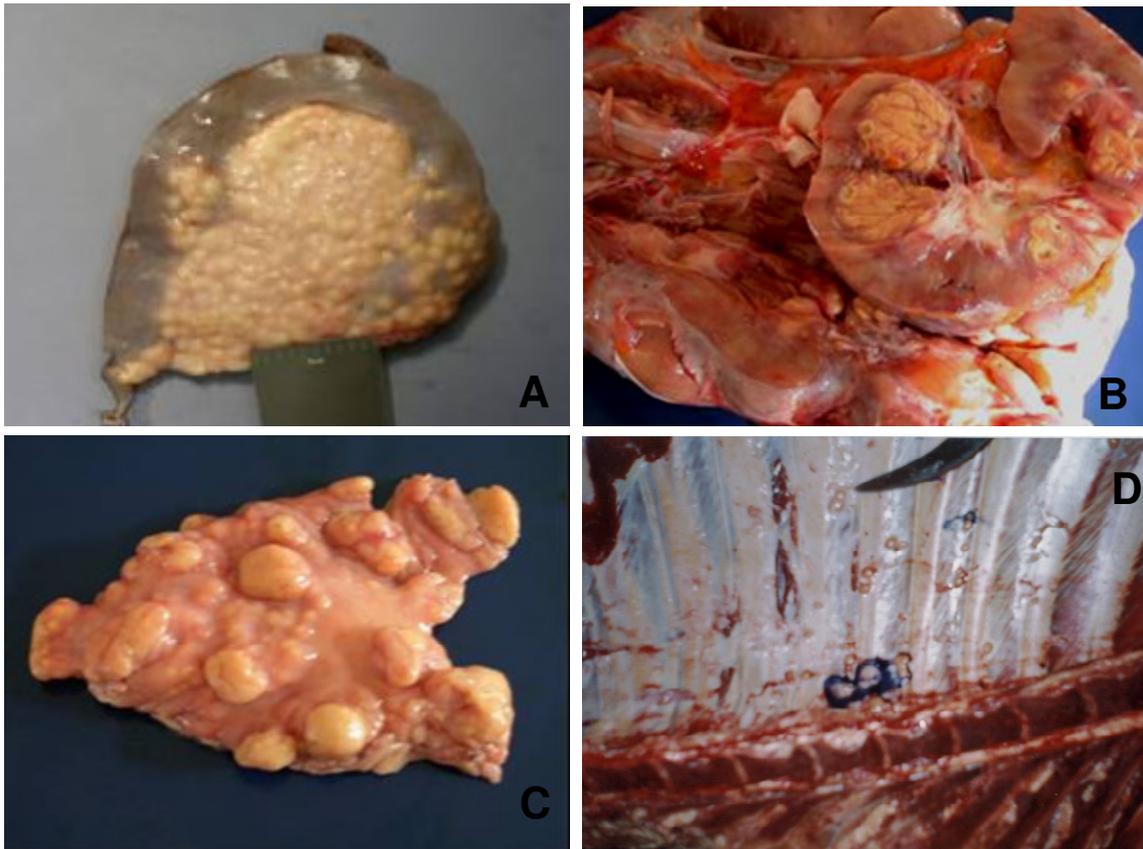


Figura 1: Tuberculose bovina. A) Fígado - granulomas múltiplos e pequenos. Hepatite tuberculosa miliar. B) Rim - superfície de corte com granuloma com caseose densa na medular. Nefrite tuberculosa. C) Útero - múltiplos tubérculos (granuloma) no endométrio. Endometrite tuberculosa. D) Pleura parietal - pequenos granulomas recobertos por serosa. Pleurite tuberculosa perlácea.

Fonte: SANTOS, 2004.

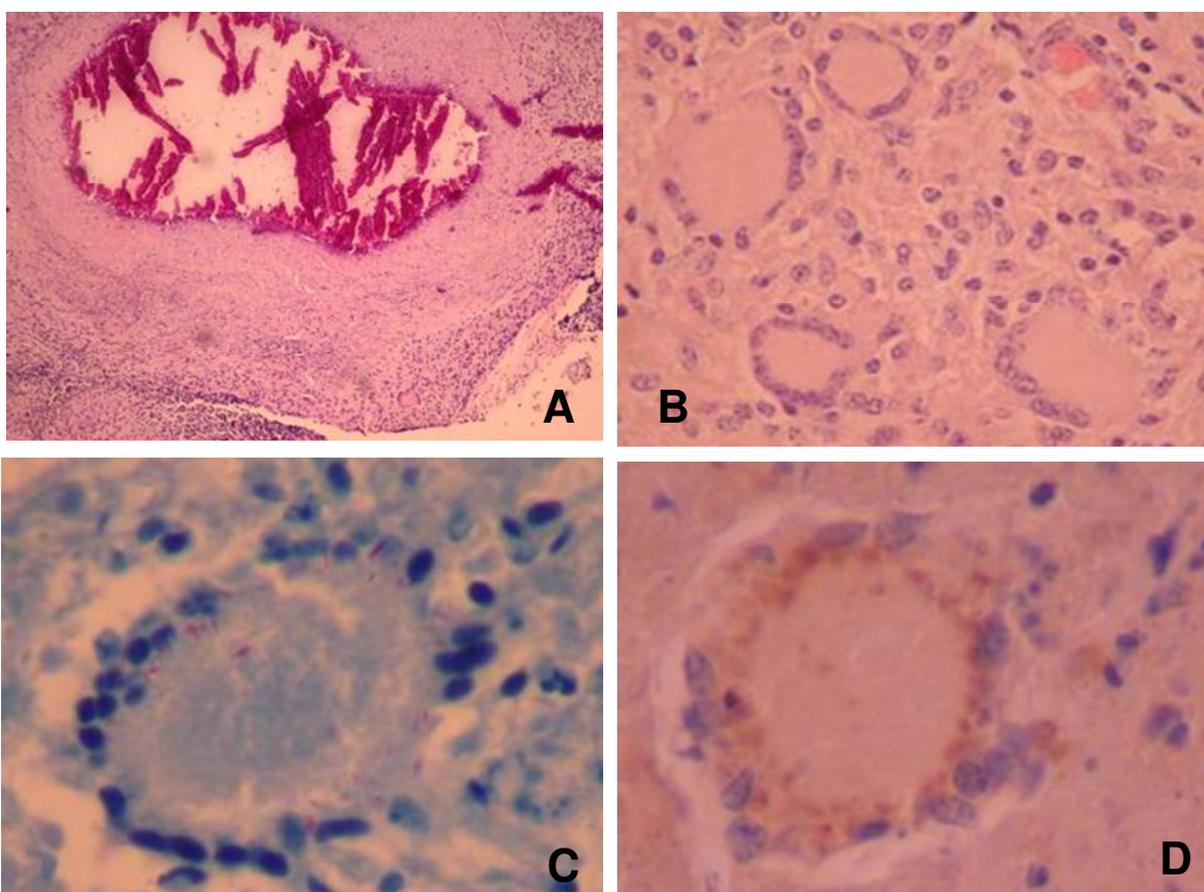
2.4.3. Diagnóstico histopatológico

Este método de diagnóstico pode ser aplicado em animais vivos ou no *post mortem*. As amostras de tecidos preparados para a histopatologia podem ser submetidas à clássica coloração de HE, que permite a observação do granuloma, lesão típica da tuberculose (Figura 2A e 2B), e à coloração especial de ZN, que evidencia os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (SANTOS, 2004), os quais incluem as micobactérias e os microrganismos do gênero *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium*. O diagnóstico é feito, se o tecido apresentar o conjunto de lesões histológicas características de um granuloma, bem como o microrganismo (OIE, 2000). A técnica de ZN pode revelar bacilos corados em vermelho em pequeno número nos processos causados pelos agentes *M. bovis* (Figura 2C) ou *M. tuberculosis* e, em grande número, naqueles relacionados com *M. avium* (MILLER et

al., 1995; SANTOS, 2004). MATTHIAS (1998) descreveu que a técnica de ZN pode ser considerada a mais adequada para demonstrar tintorialmente as bactérias tuberculosas. A histopatologia também oferece resultados satisfatórios a coloração de fluorescência e a técnica de imuno-histoquímica (Figura 2D) (SANTOS, 2004). A

5 imuno-histoquímica é uma combinação de técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas que possibilita a detecção de antígenos teciduais *in situ*, por meio da utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras (GIMENO, 1995). Esta técnica permite a avaliação da relação entre a presença de antígenos específicos nos tecidos com as lesões por eles provocadas, com rapidez e precisão nos

10 diagnósticos, favorecendo a durabilidade do material corado e a realização de estudos retrospectivos (SILVA e NOGUEIRA, 2002).



15 Figura 2: Tuberculose bovina. A) Granuloma evidenciando área de mineralização. Linfadenite tuberculosa. 100X, HE. B) Células gigantes de Langhans imersas na zona de células epitelióides. Linfadenite tuberculosa. 400X, HE. C) Escassos bacilos fucsinófilos na periferia de gigantócito de Langhans. 1000X, ZN. D) Imunomarcção de *M. bovis* na periferia de gigantócito de Langhans. 1000X, IHQ. Fonte: SANTOS, 2004.

2.4.4. Diagnóstico imunológico

O método-padrão de diagnóstico imunológico para o estudo da tuberculose bovina é o teste de tuberculina (OIE, 2000), este se baseia na resposta do animal à
5 injeção intradérmica de extrato de micobactérias (tuberculina) descrita como uma
resposta alérgica de hipersensibilidade do tipo tardia do tipo IV. Este teste foi
preconizado por Robert em 1890 e, a partir daí tem sido amplamente empregado no
diagnóstico indireto da tuberculose em animais vivos com a capacidade de revelar
infecções incipientes, com três a oito semanas pós-contato com o *M. bovis*.
10 Atualmente, existem dois tipos de testes em uso. O teste intradérmico simples, que
consiste na injeção intradérmica de 0,1 ml de purified protein derivative (PPD)
bovino, que corresponde ao extrato antigênico de proteínas purificadas derivado de
cepas AN5 ou Vallee do *M.bovis*, na região do pescoço (teste cervical simples -
TCS) ou na prega ano-caudal (teste da prega caudal - TCP) do animal. E o teste
15 intradérmico comparado, que consiste na injeção intradérmica simultânea de 0,1 ml
da tuberculina bovina e 0,1 ml da aviária (derivada das cepas D4ER ou TB56 do *M.*
avium) no mesmo lado do pescoço, com uma distância de 15 cm entre as
aplicações. O último teste, denominado teste cervical comparativo (TCC), é utilizado
para diferenciar animais infectados com *M. bovis* daqueles sensibilizados devido à
20 exposição a outras micobactérias, ou seja, reação cruzada. Caso seja verificado um
aumento igual ou superior de 4mm após subtrair a medida do local inoculado com
PPD aviário da medida do local inoculado com PPD bovino indica que o resultado é
positivo (MONAGHAN et al., 1994; WEDLOCK et al., 2002). Tais testes avaliam
respostas de hipersensibilidade retardada, 72 horas após uma injeção intradérmica
25 de tuberculina ou PPD. A intensidade da reação independe do grau das lesões
tuberculosas e é determinada pela espessura sofrida pela pele devido ao infiltrado
de células inflamatórias mononucleares e ao edemaciamento, que será medida com
um cutímetro antes e depois da injeção intradérmica da tuberculina. Podem ser
obtidos resultados falso-negativos nas infecções recentes (30-50 dias); nos casos de
30 animais anérgicos decorrentes do estágio avançado da doença e do acometimento
generalizado (tuberculose miliar); no período entre testes de PPD de 42 a 60 dias;
durante quatro a seis semanas pós-parto (imunossupressão transitória); em
situações de desnutrição; e no uso inescrupuloso e consciente de certas drogas; e

ainda por fatores relacionados ao teste PPD, como validade do produto, variações na leitura e interpretação do teste. Reações falso-positivas ou duvidosas podem aparecer em bovinos que foram sensibilizados por outras micobactérias como *M. paratuberculosis*, *M. avium*, tuberculose cutânea e micobactérias atípicas, e em animais tuberculinizados. Neste caso, é necessária a realização minuciosa da inspeção *post-mortem* (MONAGHAN et al., 1994; ROXO, 1997).

A sensibilidade do teste refere-se à habilidade para identificar animais doentes, enquanto a especificidade refere-se à identificação de animais não-doentes. Estima-se que a sensibilidade do teste de tuberculina varia de 68-95%, enquanto a especificidade é estimada ser de 96-99% (MONAGHAN et al., 1994).

O teste do gama interferon (IFN- γ) baseia-se na titulação *in vitro* de gama-interferon, em amostras heparinizadas de sangue total de animais suspeitos ou infectados, produzido por linfócitos sensibilizados durante 16-24 horas do período de incubação com o antígeno específico - PPD bovino. Este teste imunológico é um ensaio de imunoabsorção enzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA) através do qual se avalia a resposta imune mediada por células, desenvolvida pelo organismo do animal em resposta à infecção micobacteriana. O IFN- γ produzido pelos linfócitos T do animal infectado é detectado através do teste de ELISA de captura, utilizando anticorpos monoclonais anti- IFN- γ (OIE, 2000). Segundo DOMINGO et al. (1995), na Espanha, e LILENBAUM et al. (1999), no Brasil, este teste se mostrou mais sensível e mais rápido do que o teste intradérmico simples, quando testado em rebanhos leiteiros. Como se trata de um teste *in vitro* tem a vantagem de não interferir no estado imune do animal, podendo ser repetido no mesmo animal em qualquer momento (MADRUGA et al., 2001; WOOD e JONES, 2001).

2.4.5. Diagnóstico bacteriológico

Este método de diagnóstico direto permite o isolamento do *Mycobacterium bovis* e é considerado método “padrão-ouro”. O estudo bacteriológico envolve procedimentos e materiais, tais como, meios de cultura, descontaminação e condições de incubação, os quais influenciam no sucesso do isolamento. Uma vez

isolado o agente, testes adicionais como a técnica de análise de DNA e anticorpos monoclonais podem ser aplicados para confirmar sua identidade (CORNER, 1994; OIE, 2000). Apesar de o isolamento ser um diagnóstico definitivo, pode requerer mais do que 12 semanas para a confirmação cultural da infecção e a identificação da cepa por métodos bioquímicos (CORNER, 1994).

A cultura em meios de Löwenstein-Jensen e Stonebrink à base de ovos e piruvato favorece o crescimento de bactérias a partir de 10 bactérias/ml de espécime, mas requer cuidados de colheita e remessa, a fim de manter a viabilidade do agente para crescer nos meios de cultura (KANTOR, 1988). Meios de cultura à base de ágar enriquecidos com soro ou sangue, como exemplo o *Middlebrook* modificado ou 7H11 e o meio tuberculose ágar sangue ou B83, também são indicativos para o cultivo. A seleção de um descontaminante e sua concentração para o processo de descontaminação também interfere na viabilidade das micobactérias, por isso é importante conhecer os efeitos adversos que a maioria dos reagentes tem sobre o *M. bovis* (CORNER, 1994).

A ausência de micobactérias em amostras de animais tuberculina positivos com lesões típicas ou sugestivas pode estar associada ao baixo número encontrado nas lesões no momento da coleta das amostras ou à dificuldade de isolamento de cepas de *M. bovis* (PINTO et al., 2002).

Um animal positivo para o teste de tuberculina pode não apresentar lesões macroscópicas evidentes no *post-mortem* (OIE, 2000). Neste caso, o exame bacteriológico tem sido apontado como a sinalização mais segura da presença de micobactérias em animais com tuberculose e outras micobacterioses (CORNER, 1994; PINTO et al., 2002). Portanto, é recomendada a utilização simultânea de técnicas histológicas e culturais no estudo de lesões granulomatosas similares à tuberculose (ANDRADE et al., 1991).

2.4.6. Diagnóstico molecular

Desde 1950, com a descoberta da estrutura do DNA, surgiu uma nova ciência, a biologia molecular, que se revelou uma ferramenta útil no diagnóstico de

doenças infecciosas, através da identificação de uma seqüência gênica específica de um agente causador de doença.

5 Kary Mullis, em 1983, desenvolveu uma técnica que permitia a amplificação de uma seqüência do material genético de qualquer organismo, a partir de quantidades ínfimas, e que foi denominada de PCR ou reação de polimerização em cadeia.

10 A técnica de PCR se baseia na síntese enzimática orientada por oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers*. Estes *primers* funcionam como sondas quando hibridizam com a seqüência alvo de DNA da amostra e fornecem um sítio específico para que a enzima termoestável DNA-polimerase promova a síntese e incorporação de nucleotídeos, alongando o DNA. Este processo de amplificação *in vitro* da seqüência alvo de DNA acontece inúmeras vezes e em poucas horas através das etapas de desnaturação térmica e separação da fita de DNA, de anelamento dos *primers* nos sítios específicos da fita de DNA isolada e de extensão
15 dos *primers* com auxílio dos nucleotídeos e da enzima DNA-polimerase presentes na reação (OIE, 2000).

A sensibilidade da reação de PCR pode ser influenciada por fatores externos e internos à reação. O desenho dos *primers* e a escolha do método de extração do DNA têm importância relevante para o sucesso da reação no diagnóstico da
20 tuberculose (SAKAMOTO et al., 1999). Nos ensaios moleculares, o desenvolvimento e a padronização de um método apropriado para a extração de um pequeno número de organismos de lesões teciduais e, a liberação do DNA presente nestes organismos são pré-requisitos que refletem na qualidade do DNA e, conseqüentemente na sensibilidade da amplificação por PCR, principalmente para a
25 detecção de *M. bovis* em amostras paucibacilares (COLLINS et al., 1994; WARDS et al., 1995). Entre os fatores internos destacam-se: temperatura de anelamento, que pode influenciar na especificidade da reação, a concentração de sal do tampão e a de magnésio, que quando muito elevada pode inibir a atividade da polimerase e, conseqüentemente a quantidade do produto amplificado (KLAUSTER et al., 1998;
30 SAKAMOTO et al., 1999; RORING et al., 2000; ZANINI et al., 2001).

No diagnóstico da tuberculose bovina, o método de PCR e outras técnicas moleculares vêm sendo empregados para a detecção e identificação dos agentes do complexo *M. tuberculosis* em amostras de colônias isoladas, de leite, de tecidos frescos, e de tecidos fixados em formol e embebidos em parafina (ZANINI et al.,

2001; LEITE et al., 2003). Uma das alternativas para aumentar a sensibilidade da reação de PCR no diagnóstico molecular da tuberculose é o emprego da reação de nested-PCR, que consiste na re-amplificação, com *primers* internos, de um fragmento amplificado em uma primeira reação (MOLINA e TOBO, 2004).

5 Atualmente, muitos pesquisadores têm utilizado a técnica de PCR para a detecção do DNA de micobactérias em diferentes amostras.

Rodriguez et al. (1995) descreveram o emprego dos pares de *primers* JB-21 e JB-22, como específicos para discriminar a espécie *M. bovis*, mas com a ampliação da amostragem observou-se que muitas vezes não discriminavam com clareza *M.*
10 *bovis* e também amplificavam pelo menos 25% de isolados de *M. tuberculosis*.

Bascuñana e Belák (1996) utilizaram o método baseado no nested-PCR para a rápida identificação das espécies de *M. bovis* e *M. avium intracellulare* em tecido fixado e parafinado. Para todas as espécies de micobactérias testadas foram obtidos produtos específicos de 424pb de um gene que codifica um antígeno de superfície
15 de micobactéria de 65-KDa. O produto amplificado foi discriminado através de endonucleases de restrição em gel de agarose. Em 16,6% das amostras testadas com uma molécula mímica usada como controle interno não houve amplificação do alvo específico, indicando a presença de inibidores ou um erro dentro da reação.

Coetsier et al. (2000) descreveram o emprego do método de diagnóstico
20 baseado no “duplex PCR” para discriminar complexo de micobactérias tuberculosas de não tuberculosas. A dupla amplificação das seqüências us-p34 e f57 gerou um padrão de amplificação distinta, o que permitiu o diagnóstico diferencial de tuberculose, paratuberculose e infecções causadas por outros membros do complexo *M. avium*. O mesmo par de *primer*, myc3 e myc1, gerou produto de
25 amplificação de 178pb na seqüência us-p34 para o *M. tuberculosis* e *M. bovis* enquanto que para o *M. avium* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis* o produto foi de 257pb.

Miller et al. (2002), utilizaram *primers* IS6110 para detecção do complexo
30 *Mycobacterium tuberculosis* e, 16S rRNA e IS900 para detecção do *M. avium* através da técnica de PCR em seções de blocos parafinados de animais com suspeitas de lesões microscópicas sem o isolamento bacteriano e mostraram 58 tecidos positivos para a infecção por micobactérias de 102 ruminantes estudados, sendo 41 pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, possivelmente o *M. bovis* e 17 ao *M. avium* (11 subespécie *M. avium paratuberculosis*). Os resultados deste estudo

mostraram que a identificação pela técnica de PCR é mais sensível que a cultura, no entanto, o método não mostrou 100% de sensibilidade em tecidos de animais com cultura positiva.

Loeschke et al. (2005) descreveram o uso do nested-PCR em tecidos fixados e embebidos em parafina, para a detecção de micobactérias. Enquanto que, Vitale et al. (1998) aplicaram a mesma técnica em “swabs” nasais, aspirados de linfonodos e leite de bovinos. A seqüência alvo para a PCR foi a IS6110, pois é uma seqüência de inserção específica para organismos do complexo *M. tuberculosis*. Este último trabalho ressaltou a importância da associação da técnica de PCR com o teste aprovado oficialmente, o teste de tuberculina, especialmente em reações duvidosas, animais anérgicos ou nos casos de reatividade cruzada. E ainda destacou a aplicação da PCR em estudos epidemiológicos para estimar a prevalência da tuberculose bovina em áreas endêmicas onde a doença não foi erradicada. Os estudos de Miller et al. (1997) mostraram que a técnica de PCR baseada na seqüência IS6110 forneceu o diagnóstico rápido de tuberculose em bovinos e veados quando aplicada em seções de tecidos parafinados com lesões características e organismos álcool-ácido resistentes.

Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) e outros métodos moleculares têm sido utilizados para identificação de seqüências gênicas do complexo *M. tuberculosis* e para estudos epidemiológicos da tuberculose bovina e humana (VAN EMBDEN et al., 1993; GUTIÉRREZ et al., 1995; ARANAZ et al., 1998; KAMERBEEK et al., 1997; ZANINI et al., 2001). Diante das limitações quanto à sensibilidade e especificidade do teste da tuberculina e o longo período para a confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos de rotina, tem sido mais evidente o interesse laboratorial e científico pelos métodos moleculares no diagnóstico da doença em animais (RORING et al., 2000; ZANINI et al., 2001).

Estudos realizados no Mato Grosso do Sul, mostraram resultados satisfatórios na identificação do *M. bovis* em isolados a partir de amostras teciduais, utilizando métodos moleculares como a PCR associado à análise padrão com enzima de restrição (PRA-restriction enzyme pattern analysis) (ARAÚJO et al., 2005).

No Estado de Minas Gerais, a aplicação da técnica de PCR em biopsias de linfonodos de bovinos associado ao Spolygotyping e RFLP para a identificação do *M. bovis*, mostrou que a PCR tem maior eficiência quando comparada a cultura e

permitiu agrupar as amostras isoladas em cinco diferentes genótipos (ZANINI et al., 2001).

A *nested-PCR*, reação em cadeia da polimerase usada para amplificação de uma seqüência interna, oferece vantagem por minimizar o número de resultados falso-negativos quando se trata de amostra biológica com pouco material genético.

2.5. Fatores de risco e controle da doença

As decisões de manejo sanitário a serem implantadas pelos técnicos devem ser baseadas na observação dos fatores de risco. Os fatores que estão relacionados com a introdução da doença em rebanhos livres são: a aquisição de animais infectados sem prévio conhecimento da origem dos animais, do histórico dos testes de diagnósticos e sem a realização da quarentena; a proximidade a rebanhos infectados que compartilham o mesmo pasto; sombreamento, umidade e baixas temperaturas favorecem a sobrevivência do agente no ambiente e, conseqüente possibilidade de contaminação de animais susceptíveis. Os principais fatores que influenciam na transmissão da doença dentro do rebanho incluem as medidas gerais de higiene, como limpeza e desinfecção das instalações; densidade populacional (animal/hectare) e tipo de exploração leiteira, ambos influenciam na transmissão e persistência da tuberculose no rebanho, pois favorecem um maior contato entre os animais suscetíveis e infectados .

Um programa de saúde animal consiste no planejamento de atividades veterinárias regularmente aplicadas e do bom manejo do rebanho para a manutenção da saúde animal e produtividade em níveis ótimos (RADOSTITS & BLOOD, 1986). O controle visa reduzir a freqüência de ocorrência de uma doença já presente na população, enquanto que a erradicação busca eliminar totalmente a doença (CÔRTEZ, 1993). O controle da saúde dos animais, além de garantir uma produção compatível com suas características zootécnicas, propicia uma fonte de alimento confiável (HOMEM, 1999; AGUIAR, 2008).

A prevenção através da vacinação contra tuberculose bovina ainda não foi preconizada em nenhum programa de controle, mas são freqüentes as pesquisas realizadas por entidades internacionais que visam desenvolver um antígeno capaz de permitir a imunidade nos animais não interferindo nos testes de diagnósticos

(COLLINS, 1994; COSIVE et al., 1998; POLLOCK et al., 2001) . A vacina Bacille Calmette-Guérin (BCG) ou vacina contra tuberculose é obtida através da bactéria *Mycobacterium bovis*, em estado atenuado. A vacina é administrada pela via intradérmica a partir do nascimento e, pessoas de qualquer idade podem ser
5 vacinadas (FUNASA, 2001). O laboratório de referências da OMS em Copenhague classificou a Moreau-Rio como a estirpe de maior virulência residual. Também a maior proteção foi obtida pela vacina brasileira junto com somente mais duas (Rio-Paris-Madras) de um grupo de 11.

O tratamento de animais tuberculosos não é recomendado pelo Ministério da
10 Agricultura, Pecuária e Abastecimento e também não por países que têm programas de controle, pois não é possível através do tratamento, principalmente com a droga isoniazida, eliminar todos os animais portadores do bacilo, o que favorece a manutenção da fonte de infecção e disseminação da doença no rebanho (ROXO, 1997; LAGE et al., 1998).

15 A tuberculose bovina é uma das doenças de notificação obrigatória para a OIE (Organização Internacional de Epizootias), pois apresenta importância socioeconômica, na saúde pública e afeta o comércio internacional. Com isso, para o controle e erradicação da doença, em 2001, o MAPA instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) e o
20 regulamento técnico do PNCEBT foi aprovado em 2004 através de uma Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária. Este programa visa à redução da prevalência e incidência de ambas as doenças, bem como a certificação dos estabelecimentos de criação e suas respectivas medidas sanitárias, principalmente, na bovinocultura e bubalinocultura com o intuito de evitar prejuízos à saúde pública
25 (BRASIL, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de tecidos fixados e incluídos em parafina

Foram utilizados blocos de parafina com tecidos fixados em formol tamponado neutro a 10%, provenientes de 72 bovinos positivos para o teste de tuberculina abatidos em matadouros sob Inspeção Estadual na Região do Norte Fluminense. As amostras teciduais foram colhidas de acordo com a evidência de lesões macroscópicas na inspeção e, quando não existia lesão evidente à macroscopia, priorizaram-se amostras teciduais dos pulmões e seus linfonodos satélites (retrofaríngeos, mediastínicos e traqueobrônquicos). As amostras parafinadas foram previamente cortadas a seções de 5 μ m e analisadas por métodos histopatológicos de rotina de HE e, especial de ZN para a avaliação da condição de paucibacilar, pluribacilar ou abacilar. Para isso, adotou-se a análise microscópica de 10 diferentes campos focalizando, quando da existência de lesão granulomatosa, as áreas de infiltrado de células epitelióides, as células gigantes de Langhans e necrose caseosa.

3.1.1. Processamento de retirada da parafina e extração do DNA

As amostras foram processadas conforme o protocolo ajustado descrito por Coetsier et al. (2000).

Os blocos foram limpos com gaze umedecida com etanol a 100%. Foram obtidas 10 seções de 2 μ m de cada bloco parafinado com auxílio de navalhas histológicas novas para cada bloco. Os cortes foram transferidos para microtubos de 1,5mL devidamente identificados. Para o processo de retirada da parafina, os cortes foram submetidos, por duas vezes, ao banho de 1mL de xilol por 30 minutos a 65°C, centrifugados a 11289.6g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi retirado o excesso de xilol dos microtubos com seqüências de banhos com 1mL de etanol a 100% e 95%, ambos por 1 minuto à temperatura ambiente (\cong 27°C). Para a reidratação, o material foi submetido a dois banhos de 1mL de etanol a 70°C e três banhos com água ultrapura, alternando com a centrifugação a 11289.6g por 5 minutos entre cada banho.

A partir do material hidratado foi realizada a digestão das proteínas e a extração do DNA utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega, conforme o protocolo ajustado do fabricante. Para isso, foi adicionado no microtubo contendo o material biológico, 200µL de solução de lise celular (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega), em seguida, o microtubo foi bem homogeneizado no vórtex e incubado a 65°C por 60 minutos. Para a digestão das proteínas, a amostra foi incubada em 1µL de proteinase K (100 mg/mL) “overnight” a 60°C. Na etapa seguinte, o material foi tratado com 0,75µL de RNase, homogeneizado por inversão e incubado por 15 minutos a 37°C. Em temperatura ambiente, foi adicionado ao microtubo contendo o lisado celular, 100 µL de solução de precipitação de proteínas (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega), homogeneizado no vórtex em alta rotação por 30 segundos e centrifugado a 11289.6g por 3 minutos. No próximo passo, o sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5mL contendo 600µL de isopropanol e homogeneizado por inversão. O microtubo foi submetido à centrifugação de 11289.6g por 1 minuto, seguido do descarte do sobrenadante, adição de 50µL de solução de hidratação de DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega) e incubação por 1 hora a 65°C. Por fim, as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

Esta etapa foi realizada no Núcleo de Análise Genômica e no Setor de Morfologia e Anatomia Patológica do Laboratório de Sanidade Animal (LSA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

3.2. Amostras de cultura

Os isolados, a partir de tecidos bovinos foram obtidos de colônias com morfologia típica de micobactérias com o crescimento em meio sólido Löwenstein-Jensen (LJ), à base de ovo, com piruvato, após um período de 2-3 meses. Foi utilizado também um isolado a partir de lesão renal de um cão. As amostras biológicas foram isoladas no Laboratório de Micobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro no Centro de Ciências da Saúde (UFRJ/CCS).

3.2.1. Extração do DNA

A extração do DNA bacteriano foi baseada no protocolo modificado do método “boiling and freezing” (COATES et al., 1991; MILLER et al., 1997; MILLER et al., 2002). Uma alçada da amostra da bactéria foi depositada em um tubo com bolas de

vidro seguida por agitação no “vortex” por 15 segundos. Foi adicionado 500ul do tampão T.E. no tubo e homogeneizado. O volume de 300ul desta solução foi dispensado em um microtubo, o qual foi submetido, por 3 vezes alternadas, à temperatura de 100 °C por 10 minutos e ao resfriamento no gelo por 10 minutos. O microtubo foi centrifugado a 7840g por 5 minutos e o sobrenadante (DNA extraído) foi armazenado a - 20 °C.

3.3. Desenho dos iniciadores (*primer*)

Esta etapa e as que se seguem foram realizadas no Núcleo de análise genômica da UENF.

Os *primers* foram previamente desenhados para amplificar regiões no gene *us-p34* correspondentes ao genoma do *M. bovis*. As seqüências de *primers* (Myc 1, Myc 4 e Myc 5), gene de sua localização e tamanho do produto amplificado estão apresentados na tabela 1 (COETSIER et al., 2000).

Tabela 1. Seqüências de *primers*, gene alvo e tamanho do produto da 1ª reação de amplificação

<i>Primers</i>	Seqüência de <i>primers</i>	Gene alvo	Produto da 1ª amplificação
Myc 1	5'-GAG TAG GTC ATG GCT CCT CC	Gene <i>us-p34</i>	343 pb
Myc 5	5'-CGG CAG CGA AGC GTC ACC CGC		

Tabela 2. Seqüências de *primers*, gene alvo e tamanho do produto da 2ª reação de amplificação

<i>Primers</i>	Seqüência de <i>primers</i>	Gene alvo	Produto da 2ª amplificação (nested-PCR)
Myc 1	5'-GAG TAG GTC ATG GCT CCT CC	Gene <i>us-p34</i>	216 pb
Myc 4	5'-ATG CCG CGG TCG CTG GTG AA		

1ª amplificação



2ª amplificação



Figura 3: Esquema representativo do nested-PCR para a amplificação de um fragmento de 216bp.

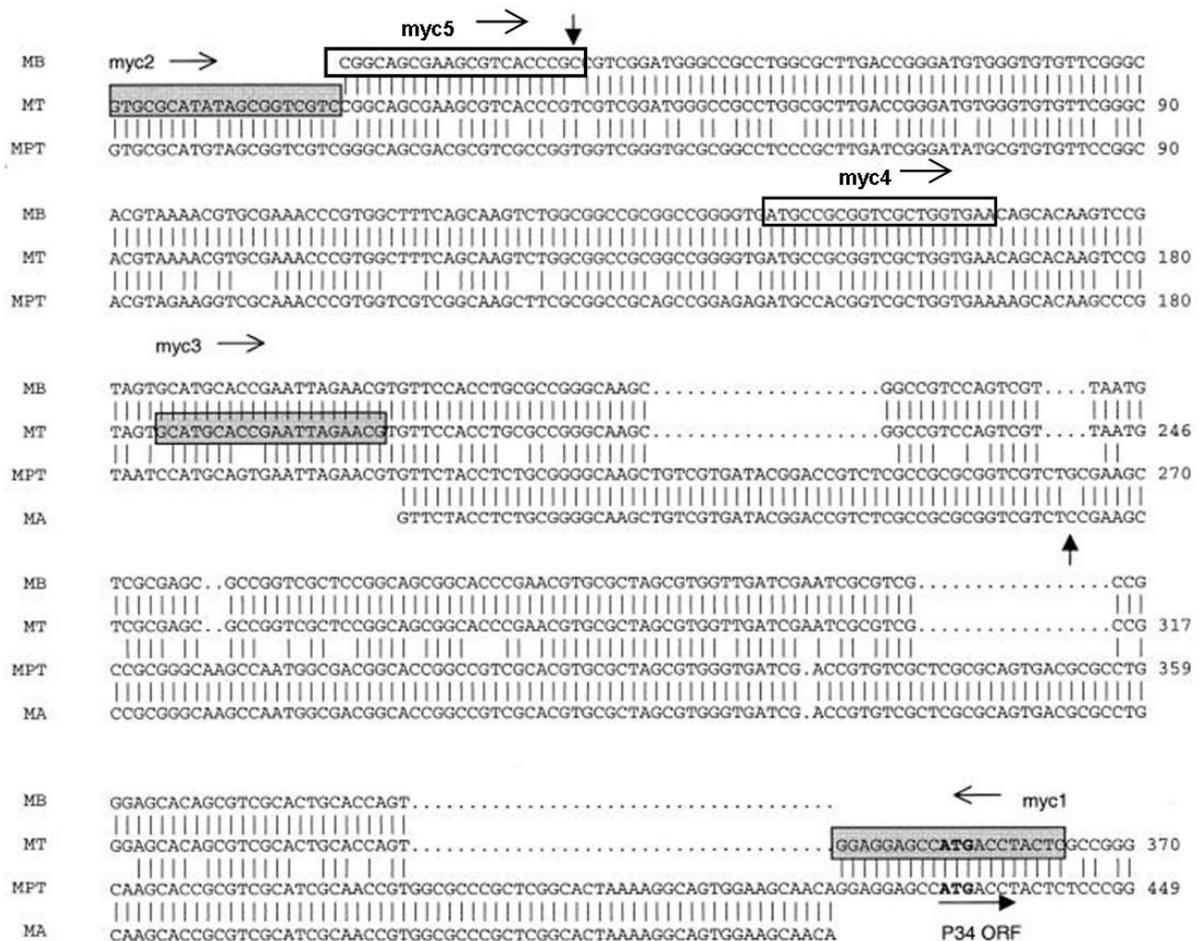


Figura 4: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos genes us-p34 de *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. Fonte: COETSIER et al., 2000 - modificado.

3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.4.1. PCR das amostras de tecido fixado e incluído em parafina

A amplificação da seqüência us-p34 foi realizada através de um nested-PCR. Na primeira reação de PCR foram usados os *primers* Myc 1 e Myc 5, e na segunda
5 reação, os *primers* Myc 1 e Myc 4.

Na primeira amplificação, foi adicionado 1µL de cada amostra de DNA extraído em uma reação de PCR com um volume final de 25µL contendo 20pmol de cada iniciador Myc 1 e Myc 5, 0,2mM de cada dNTP (10mM), 0,5U de DNA *taq* polimerase, tampão 10X de reação da enzima *taq* polimerase (75mM Tris-HCl, 20
10 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8.8), 1,5 mM de MgCl₂ (25 mM) e água ultrapura (Kit Fermentas life sciences). Previamente foi realizada uma reação de gradiente de temperatura para analisar a melhor temperatura de anelamento dos iniciadores. A primeira reação foi realizada nas seguintes condições de temperatura/tempo: desnaturação a 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação como se segue: desnaturação a 94 °C
15 por 30 segundos, anelamento a 40,6° C por um minuto e extensão do DNA a 72 °C por um minuto e 30 segundos. Em seguida, procede-se uma extensão final a 72 °C por sete minutos.

Na segunda amplificação (nested-PCR), foi adicionado 0,5µL do produto da primeira amplificação em uma reação de PCR com um volume final de 25µL,
20 contendo 18,2µL de água ultrapura, 1µL de cada iniciador Myc 1 e Myc 4 (20 pMoles), 0,5µL de DNTp Mix (10 mM), 0,1µL de *taq* polimerase recombinante (0,5U), 2,5µL de tampão de reação da enzima *taq* polimerase 10x (NH₄)₂SO₄ e 2µL de MgCl₂ (25mM). Esta amplificação foi realizada no mesmo termociclador nas seguintes condições de temperatura/tempo: desnaturação a 94 °C por cinco minutos,
25 40 ciclos de amplificação como se segue: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 51,6 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos, seguidos de uma extensão final a 72 °C por sete minutos.

Os produtos da primeira amplificação foram diluídos em 1:10, 1:100 e 1:1000, em seguida, cada diluição foi submetida à segunda amplificação.

30 Nos casos com lesões histopatológicas sugestivas, mas com amplificação negativa, foi repetido o mesmo procedimento de extração do DNA e amplificação.

As reações foram realizadas no termociclador PTC 100™ (Programmable Thermal Controller-MJ Research, Inc.).

A cada ensaio de amplificação foi incluído um controle positivo (amostra de DNA bacteriano proveniente de cultura - *Mycobacterium tuberculosis* - H37Rv) e um
5 controle negativo (contendo somente água ultrapura e a solução da reação de PCR).

Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,4 % preparado com TAE 1X, corado com brometo de etídio e, visualizado e fotografado por trans-iluminação ultravioleta no aparelho EAGLE EYE™ II - STRATAGENE. Foi utilizado 9µL do produto amplificado com 1µL do
10 tampão de amostra 10X. O tamanho do produto amplificado foi determinado por um marcador de peso molecular de 1000 pb (Fermentas Life Sciences).

3.4.1.1. Purificação dos produtos de PCR em gel de agarose

15 O DNA amplificado foi extraído a partir do gel de agarose TAE 1X com o uso do Kit BIOCLEAN para purificação de bandas de DNA (BIOTOOLS) seguindo os passos:

1. A banda contendo o DNA amplificado foi recortada do gel, depositada dentro de um microtubo 1,5mL onde foi adicionado 1mL da solução de AgarMelt;
- 20 2. Para dissolver o gel, o microtubo foi submetido à temperatura de 65°C por 2 minutos em banho-maria;
3. Ao microtubo, foi adicionado 5µL de sílica BC, homogeneizado suavemente por inversão e incubado em t °C ambiente por 10 minutos, agitando a cada 2 minutos;
4. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 11289.6g por 5 minutos e o
25 sobrenadante foi descartado;
5. Foi adicionado o volume de 300µL da solução de “cold wash” para decantação da sílica (“pellet”), seguido da centrifugação a 11289.6g por 10 minutos e descarte do sobrenadante. Esse passo foi repetido por duas vezes;
6. Foi adicionado 25µL de água ultrapura aquecida, incubado a 65°C por 3 minutos e
30 centrifugado a 11289.6g por 10 minutos;

7. O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e centrifugado a 11289.6g por 10 minutos.

3.4.2. PCR das amostras de cultura

5 Para as amostras de cultura foi realizada somente a primeira reação de amplificação com os *primers* myc1 e myc5, utilizando a mesma metodologia do item 3.6.

3.4.2.1. Seqüenciamento das amostras de cultura

10 As amostras de cultura amplificadas na 1ª reação de PCR foram submetidas à reação de seqüenciamento com o Kit BigDye Terminator v. 3.1. (PE Applied Biosystems). A reação foi realizada nas seguintes condições de temperatura/tempo: desnaturação a 96 °C por 1 minuto, 25 ciclos de amplificação (desnaturação a 96 °C
15 por 15 segundos, anelamento a 40,6 °C por 15 segundos, extensão a 60 °C por 4 minutos) no PTC 100™ (Programmable Thermal Controller-MJ Research, Inc.). Os *primers* utilizados na reação de seqüenciamento foram os mesmos para a PCR. A etapa seguinte compreendeu o processo de precipitação com isopropanol.

20 O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático capilar ABI 3130 (Applied Biosystems).

3.4.2.2. Análise e alinhamento das seqüências

25 As seqüências geradas foram montadas através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998). As seqüências foram analisadas através da ferramenta BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

30

35

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 evidenciou que 49 amostras analisadas por recursos histopatológicos mostraram lesões granulomatosas microscópicas representada por áreas de necrose caseosa central com freqüente deposição de material calcário, rodeada por um infiltrado inflamatório de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, células epitelióides e células gigantes de Langhans, e uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso na periferia, caracterizando um granuloma (SANTOS, 2004). Enquanto que, 23 foram negativas para lesões típicas granulomatosas quando analisadas pela HE. Para a coloração especial de ZN, 35 evidenciaram BAAR, porém com padrão paucibacilar, onde a contagem nos dez campos previamente selecionados não totalizou mais que 10 BAAR. O método de diagnóstico molecular através do nested-PCR quando comparado com o padrão de lesão histopatológico, mostrou 54 amostras positivas quando 43 revelaram lesões representadas por células epitelióides e necrose caseosa, achados típicos de um granuloma, e 11 amostras foram negativas. E das 18 amostras negativas pela técnica molecular, 6 evidenciaram células epitelióides e necrose caseosa através da microscopia e 12 foram negativas para tal. Esses resultados demonstraram que a técnica de nested-PCR em tecido fixado em formol em combinação com as técnicas histológicas aumentaram a eficiência dos diagnósticos laboratoriais na detecção e identificação das doenças de ruminantes causadas por micobactérias (MILLER et al., 2002). A tabela evidencia que a aplicação da técnica de PCR em tecido fixado em formol pode resultar em infecções por micobactérias positivas quando a histopatologia falha e vice-versa, considerando esta possibilidade, é coerente que os laboratórios de diagnósticos para doenças causadas por micobactérias utilizem técnicas complementares como a histopatologia de rotina e especial e a cultura para maximizar a eficiência dos resultados. No tratamento estatístico pelo teste de Q-quadrado (SAEG, 2007), as técnicas utilizadas não são independentes, o que permite considerar que a técnica de PCR em tecido parafinado é um método de diagnóstico complementar às técnicas histológicas.

O resultado da PCR a partir de amostras histológicas é influenciado pelo tempo de fixação, tempo de estoque dos blocos parafinados, método de extração do DNA e o comprimento da seqüência-alvo de DNA (GREER et al., 1994). Estudos concluíram que o método de PCR não deve substituir a cultura até que melhores técnicas de

extração sejam desenvolvidas para pequenos números de micobactérias, situação que freqüentemente ocorre em tecidos de bovinos tuberculosos (WARDS et al., 1995).

5 Tabela 3: Relação entre os métodos de diagnóstico através da PCR e da histopatologia de rotina (HE) e especial (ZN).

Resultados PCR	Métodos de diagnósticos				Total
	Células Epitelióides Necrose Caseosa		Ziehl-Neelsen		
	+	-	+	-	
Positivo	43	11	30	24	54
Negativo	6	12	5	13	18
Total	49	23	35	37	72

10 O método nested-PCR, baseado nas seqüências da região us-p34 foi aplicado para discriminar o complexo de micobactérias tuberculosas. Este método que emprega uma segunda etapa de amplificação com iniciadores internos aos utilizados na primeira etapa visou aumentar a sensibilidade e especificidade (Figura 3). Os primers utilizados permitiram uma amplificação de um fragmento de 216pb nas micobactérias tuberculosas (Figura 4), conforme observado na seqüência us-p34

15 descrita no trabalho de Coetsier et al. (2000). O método de PCR confrontado com a histopatologia/HE demonstrou êxito em 75% do total das amostras testadas sendo que aproximadamente 60% apresentaram resultado positivo em ambos os métodos e 20% foi positiva apenas pela PCR. O método molecular foi positivo em 30 de 35 (85,7%) amostras positivas para histopatologia/ZN e ainda evidenciou sucesso em

20 24 (64,9%) amostras negativas na histopatologia/ZN. O nested-PCR evidenciou uma sensibilidade de 75% para a identificação do complexo *M. tuberculosis* sendo equivalente a taxa de 71% (LIEBANA et al., 1995) e inferior a de 91% (WARDS et al., 1995) e a de 88% (VITALE et al., 1998) em estudos realizados com tecidos frescos. A sensibilidade depende do sistema de extração, da amostra biológica e do

25 tipo de lesão. A sensibilidade variou de 61,11% para amostras sem lesões visíveis a 80,64% para amostras com lesões crônicas, com uma média de 73,87% (PARRA et

al., 2008), de acordo com os achados do presente trabalho em tecido fixado e parafinado. O diagnóstico molecular de micobactéria é considerado favorável particularmente se houver suspeita clínica e de lesões histológicas sem a demonstração de bacilos álcool-ácido resistentes no tecido fixado e incluído em parafina (GUPTA et al., 2003).

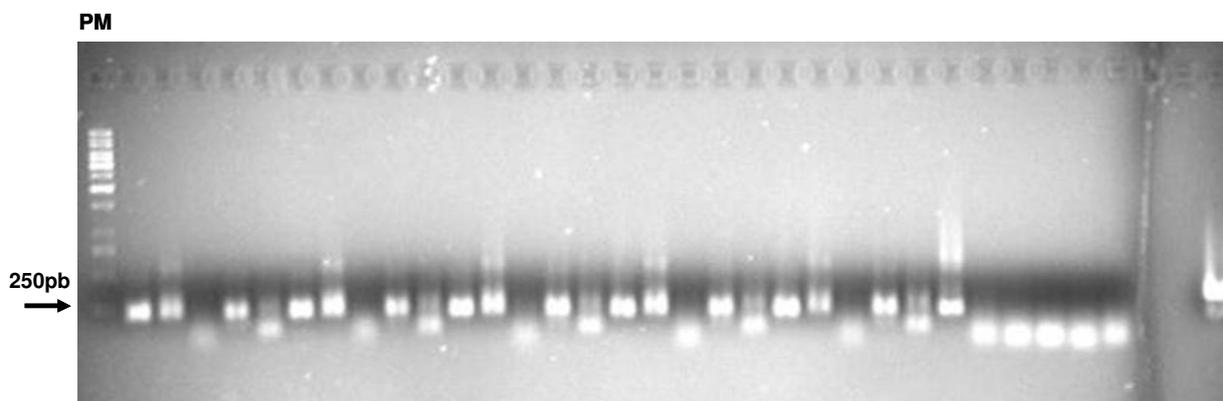


Figura 5: Análise da dupla amplificação com detecção do fragmento de 216pb pela eletroforese em gel de agarose a 1,4%. Linha 1: ladder de 1 Kb, como marcador de peso molecular (PM); linha 2 a 31: amostras testadas de DNA extraído de tecidos fixados e incluídos em parafina. A seta indica a direção da amplificação de 216pb, aproximadamente; linha 33: controle negativo; linha 34: controle positivo.

Considerando a dificuldade na extração do DNA em amostras bovinas decorrente do padrão paucibacilar e da intensa fibrose e calcificação na lesão que dificultam o acesso ao DNA, este trabalho priorizou seguir resultados com metodologias para melhorar a sensibilidade da PCR. Visando o aumento e a pureza do DNA extraído conforme observado por Loeschke et al. (2005), foram utilizadas seções finas (2 μ m) e digestão com proteinase K “overnight”. Conforme o experimento feito por Whittington et al. (1999), a diluição do DNA extraído permitiu aumentar a intensidade do produto de PCR. Tanto a diluição do DNA extraído como a do DNA amplificado é um procedimento importante quando se trata de tecido fixado e parafinado, pois reduz inibidores da reação e DNA não-alvo. Neste trabalho, para algumas amostras testadas, a diluição de 1:10 e 1:100 da 1^a para a 2^a amplificação evidenciou produto de PCR antes não visualizado quando utilizado sem diluição. Outra metodologia adotada para a redução de inibidores é a purificação do DNA (KOLK et al., 1992). A purificação do DNA com sílica permitiu um resultado satisfatório (Figura 7). A presença de inibidores e impurezas em solução de DNA a partir de tecidos fixados e parafinados é um problema bem conhecido que freqüentemente interfere na PCR,

leva a resultados falso-negativos e torna um obstáculo para a adoção universal desta técnica (KOLK et al., 1992; BASCUÑANA & BELÁK, 1996). A fragmentação do DNA e a rigidez da parede celular da micobactéria também são obstáculos para a detecção do DNA em tecidos embebidos em parafina (GOLDMANN & VOLLMER, 2003).

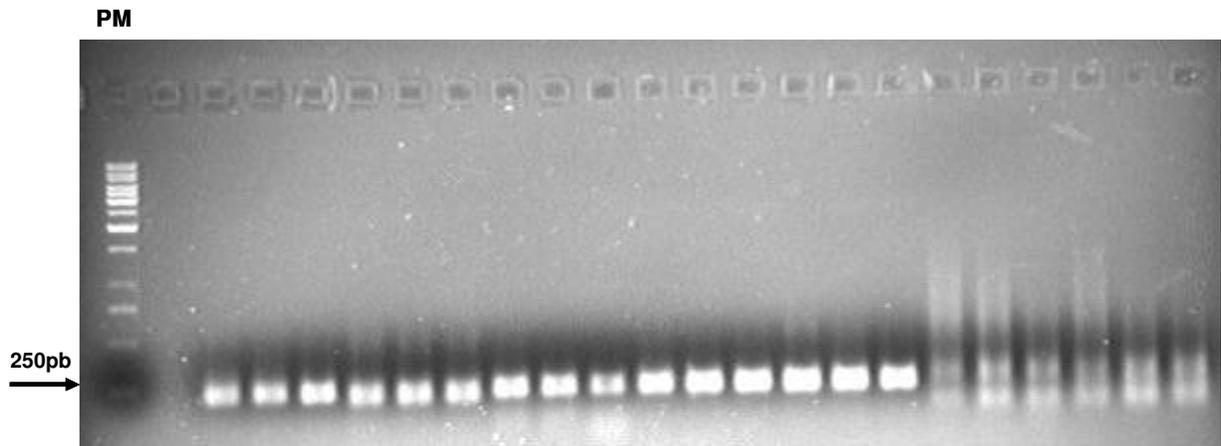


Figura 7: Resultado da purificação do DNA amplificado em gel de agarose. Amplificação do fragmento de 216pb pela eletroforese em gel de agarose a 1,4%. Linha 1: ladder de 1 Kb, como marcador de peso molecular (PM); linha 3 a 17: amostras amplificadas e purificadas de DNA extraído de tecidos fixados e incluídos em parafina; linhas 18 a 23: amostras amplificadas e purificadas com restos de reação.

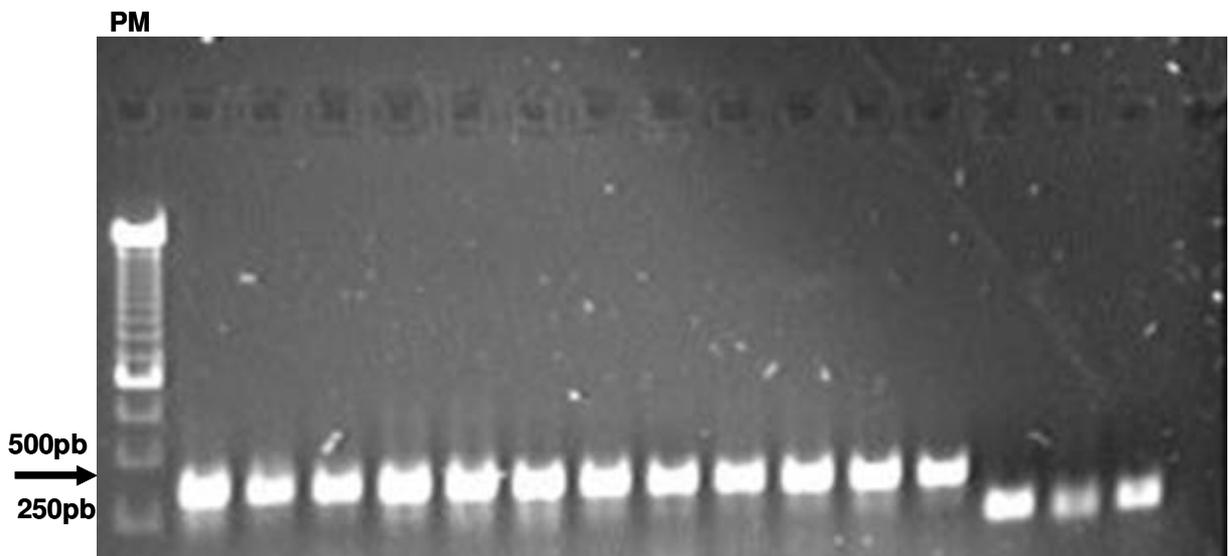


Figura 8: Análise da PCR com detecção do fragmento de 343pb pela eletroforese em gel de agarose a 1,4%. Coluna 1: ladder de 1 Kb, como marcador de peso molecular (PM); colunas 2 a 13: amostras positivas de DNA extraído de cultura de micobactérias; colunas 14 e 15: amostras de isolamento de colônias provenientes de lesão renal de um cão em diferentes

diluições; coluna 16: amostra de controle positivo de *M. tuberculosis* H37Rv; coluna 17: controle negativo. A seta indica a direção da amplificação de 343pb.

Todas as 14 (100%) amostras de isolamentos de colônias testadas demonstraram
5 amplificação na fotodocumentação (Figura 8), sensibilidade também relatada por
Zanini et al. (2001) em amostras isoladas. As amostras das colunas de 2 a 13
evidenciaram a amplificação de fragmentos de 343pb, confirmando pertencer ao
complexo *M. tuberculosis* quando analisado na seqüência us-p34 descrita no
trabalho de Coetsier et al. (2000). A amostra em diferentes diluições das colunas 14
10 e 15, comprovadas por provas bioquímicas serem *M. tuberculosis* e o controle
positivo de *M. tuberculosis* H37Rv revelaram amplificação de fragmentos de
tamanho inferior a 343pb. Isso pode ser devido à única transição entre os
nucleotídeos na posição 41 de C para T (Figura 2) entre *M. bovis* e *M. tuberculosis*,
mas não é possível comprovar através da fotodocumentação em gel de agarose, se
15 faz necessário técnicas moleculares mais sensíveis. Esses resultados revelaram que
o DNA a partir de cultura é mais disponível do que o DNA extraído de tecidos
fixados. Liebana et al. (1995) relatam que existem limitações da técnica de PCR
quando utilizada para a detecção direta de *M. bovis* em amostras paucibacilar e a
cultura tem sensibilidade superior para a detecção direta. No entanto, a técnica de
20 PCR foi mais suficientemente sensível para detectar *M. bovis* quando comparado
com amostras que falharam no crescimento da cultura (LIEBANA et al., 1995;
ZANINI et al., 2001). A PCR mostrou 28,5 vezes mais eficiente quando comparado
com a cultura e com a microscopia direta (ROMERO et al., 1999). O sucesso do
PCR depende da disponibilidade do DNA, livre de contaminações que prejudiquem
25 no processo de amplificação (KOLK et al., 1992).

As seqüências obtidas através da amplificação das amostras de cultura
foram analisadas através da ferramenta BLASTn contra a base de dados do NCBI
(National Center for Biotechnology Information, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
As seqüências mostraram identificação máxima, 99% de similaridade com as
30 seguintes seqüências já depositadas no banco de dados e identificadas com os
acessos que se segue:

Tabela 4: Relação de seqüências obtidas contra a base de dados do NCBI que mostraram identificação com as seqüências analisadas na ferramenta BLASTn.

Seqüências	Organismo relacionado	<i>Query Coverage</i>	Valor E	Identidade
AM408590	Mycobacterium bovis BCG Pasteur 1173P2	95%	5e-166	99%
CP000717	Mycobacterium tuberculosis F11	95%	2e-164	99%
CP000611	Mycobacterium tuberculosis H37Ra	95%	2e-164	99%
AE000516	Mycobacterium tuberculosis CDC1551	95%	2e-164	99%
BX842575	Mycobacterium tuberculosis H37Rv	95%	2e-164	99%
BX248337	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97	95%	2e-164	99%

5

10

15

20

5. CONCLUSÕES

- 5 Os *primers* desenhados e utilizados para o nested-PCR demonstraram ser específicos para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e permitiram a detecção de *M. bovis* em amostras biológicas de bovinos com a doença quando associado com as características histológicas da lesão.
- 10 O nested-PCR pode ser aplicado em tecidos fixados em solução de formalina e parafinados como uma ferramenta diagnóstica complementar à histopatologia no rastreio de tuberculose em bovinos.

Diante da sensibilidade e eficiência nos resultados da técnica de nested-PCR, esta
15 pode ser valiosa no auxílio à inspeção sanitária em matadouros para a condenação de animais sacrificados com suspeita de tuberculose bovina.

A patologia molecular associada à histopatologia permitiu incluir o agente etiológico
20 identificado responsável pela enzootia no complexo *M. tuberculosis* mais notadamente o *M. bovis*.

25

30

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 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.
- 10 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 de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of
Veterinary Science**, v.10, n.2, p.1-17, 2005.
- 15 ACHA, P.N., SZYFRES, B. (1989) Zoonoses and Communicable Diseases Common
to Man and Animals: Pan American Health Organization. 2 ed. Washington: Scientific
Publication, 503, 963p.
- 20 AGUIAR, M de. **A sanidade animal e as zoonoses em sistemas de agricultura
familiar: um breve comentário.** Disponível em:
<http://www.infobibos.com/Artigos/2007_4/sanidade/index.htm>. Acesso em: 26 mar.
2008.
- 25 ALFINITO, J.W. & OLIVEIRA, F.R. Estudo Epidemiológico da Tuberculose Bovina na
Ilha de Marajó. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 20.,
1986, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Sociedade Matogrossense de Medicina Veterinária,
1986. p.216-217.
- 30 ALMEIDA, R.F.C.; SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R. (2004) Brucelose e Tuberculose
Bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico. Brasília: Embrapa Informação
Tecnológica, 94p.
- 35 ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P.V. Estudo histológico e isolamento
de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do
Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.11, p.81-86, 1991.
- 40 ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; MATEOS, A., DOMINGUEZ, L.; COUSINS, D.
Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a
comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. **Vet.
Microbiol.**, v.61, p.311-324, 1998.
- 40 ARAÚJO, C.P.; LEITE, C.Q.F.; PRINCE, K.A.; JORGE, K.S.G.; OSÓRIO, A.L.A.R.
Mycobacterium bovis identification by a molecular method from post-mortem
inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem. Inst.
Oswaldo Cruz**, v.100, p.749-752, 2005.

- BAPTISTA, F.; MOREIRA, E.C.; SANTOS, W.L.M. et al. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p. 577-580, 2004.
- 5 BASCUÑANA, C.R. & BELÁK, K. Detection and identification of Mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by Nested-PCR and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2351-2355, 1996.
- 10 BIANCHINI, W. & RODRIGUES, E. Tuberculose em animais domésticos. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=113>>. Acesso em: 19 mar. 2008.
- BRANDÃO, S.C.C. Leite: legislação, responsabilidade e saúde pública. **Balde Branco**, v.360, p.68-71, 1994.
- 15 BUBNIAK, F. **Diagnóstico Epidemiológico da Tuberculose na Espécie Bovina no Estado de Santa Catarina**. Monografia em Medicina Veterinária - Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina - RS, 2000.
- 20 COETSIER, C.C.; VANNUFFEL, PASCAL.; BLONDEEL, NATHALIE.; DENEFF, J.F.; COCITO, C.; GALA, J.L. Duplex PCR for Differential Identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues from Cattle. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.3048-3054, 2000.
- 25 COLLINS, D.M.; RADFORD, A.J.; LISLE, G.W.; BILLMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Vet. Microbiol.**, v.40, p.83-94, 1994.
- CORNER, L. Post mortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.53-63, 1994.
- 30 CORRÊA, W. M. & CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2. ed. São Paulo: MEDSI, 1992, 843p.
- 35 CÔRTEZ, J.D. (Ed.) **Epidemiologia: conceitos e princípios principais**. São Paulo: Varela, 1993, 227p.
- 40 COSIVI, O.; GRANGE, J.M.; DABORN, C.J.; RAVIGLIONE., M.C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R.A.; HUCHZERMAYER, H.F.A.K.; KANTOR, I.; MESLIN, F.X. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. **Emerging Infections Diseases**, v.4(1), p.1-15, 1998.
- 45 COUSINS, V.D.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol.**, v.53, p.1305-1314, 2003.
- DOHERTY, M.L. & CASSIDY, J.P. New Perspectives on Bovine Tuberculosis. **The Veterinary Journal**. v.163, p.109-110, 2002.

- 5 DOMINGO, M.; LIEBANA, E.; VILAFRANCA, M.; ARANAZ, A.; VIDAL, D.; PRATIS, N.; MATEOS, A.; CASAL, J.; DOMINGUEZ, L. A field evaluation of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test in dairy cattle in Spain. **Second International Mycobacterium bovis Conference**, 82p,1995.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Produção Animal. Disponível em: http://www21.sede.embrapa.br/linhas_de_acao/alimentos/prod_animal/index_html/mostra_documento>. Acesso em 15 mar.2006.
- 10 FERREIRA NETO, J.S. & BERNARDI, F.O. O Controle da Tuberculose Bovina. **Higiene Alimentar**, v.11, p.9-13, 1997.
- 15 FERREIRA, P.S. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos na região Norte e Noroeste Fluminense - RJ. Monografia em Medicina Veterinária - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, 2005.
- 20 FREITAS, J.A.; GUERRA, J.L.; PANETTA, J.C. Características da tuberculose em búfalos abatidos para o consumo: aspectos patológicos e identificação de micobactérias. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, v.38, p.170-176, 2001.
- FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Manual de normas de vacinação**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.
- 25 GARNIER, T.; EIGLMEIER, K.; CAMUS, J.C. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **PNAS**, v.100, p.7877-7882, 2003.
- 30 GOMES, M.J.P. **Uma análise da Paratuberculose Bovina no Rio Grande do Sul**. Tese de Doutorado em Clínica de Grandes Animais - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2002.
- GOLDMANN, T. & VOLLMER. PCR-based diagnosis of mycobacteria: Use and pitfalls of formalin-fixed, paraffin embedded specimens. **E.J.Pathol.** 2003. (in press)
- 35 GORMLEY, E. & COLLINS, J.D. The development of wildlife control strategies for eradication of tuberculosis in cattle in Ireland. **Tubercle and lung disease**, v.80, p.229-236, 2000.
- 40 GRANGE, J.M. & YATES, M.D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.137-151, 1994.
- GRANGE, J.M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**, v.81(1/2), p.71-77, 2001.
- 45 GREER, C.E.; WHEELER, C.M.; MANOS, M.M. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. **PCR Meth. Applic.**, v.3, p.113-122, 1994.

- 5 GUPTA, R.S.; HILLEMANN, D.; KUBICA, T.; ZISSEL, G.; MÜLLER-QUERNHEIM, J.; GALLE, J.; VOLLMER, E.; GOLDMANN, T. Hope-fixation enables improved PCR-based detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded tissues. *Pathology Research and Practice*, v.199, p.619-623, 2003.
- 10 GUTIÉRREZ, M.; SAMPER, S.; GAVIGNAN, J.A.; GARCIA MARIN, J.F.; MARTIN, C. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, p.2953-2956, 1995.
- 15 HOMEM, V.S.F. **Brucelose, leptospirose e tuberculose em Uruará, PA, município da amazônia oriental. Estudo da população humana e animal.** 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 1999.
- 20 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 dez. 2008.
- 25 JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N.W. **Veterinary pathology: Diseases caused by bacteria.** 6.ed. Baltimore, USA: Williams and Wilkins, 1997, 1392p.
- 30 JORGE, K.S.G.; ALMEIDA, R.F.C.; SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; OSÓRIO, A.L.A. Tuberculose bovina: epidemiologia e controle. In: ALMEIDA, R.F.C.; SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R. **Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 45-59.
- 35 KAMERBEEK, J.; SCHOULS, L.; KOLK, A.; VAN AGTERVELD, M.; VAN SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; VAN EMBDEN, J.D.A. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.907-914, 1997.
- 40 KANTOR, I.N. & RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin América and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.*, v.40, p.5-14, 1994.
- 45 KLASTER, P.R.; KUIJPER, S.; VAN INGEN, C.W.; KOLK, A.H.J. Stabilized, freeze-dried PCR mix for detection of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p.1798-1800, 1998.
- 50 KOLK, A.H.J.; SCHUITEMA, A.R.J.; KUIJPER, S.; VAN LEEUWEN, J.; HERMANS, P.W.M.; VAN EMBDEN, J.D.A.; HARTSKEERL, A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, p.2567-2575, 1992.
- KOX, L.F.F.; RHIENTHONG, D.; MIRANDA, A.M.; UDOMSANTISUK, N.; ELLIS, K.; VAN LEEUWEN, J.; VAN HEUSDEN, S.; KUIJPER, S.; KOLK, A.H.J. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.672-678, 1994.

- LAGE, A.P.; LOBATO, F.C.F.; MOTA, P.M.P.C.; GONÇALVES, V.S.P. **Atualização em Tuberculose Bovina**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998, 65p.
- 5 LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, C.H.; MOTA, P.M.P.C.; LEITE, R.C. Reações inespecíficas no diagnóstico alérgico da tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.1, p.145-149, 1981.
- 10 LEITE, C.Q.F.; ANNO, I.S.; LEITE, S.R.A.; ROXO, E.; MORLOCK, G.P.; COOKSEY, R.C. Isolation and identification of Mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 319-323, Apr. 2003.
- 15 LIEBANA, E.; ARANA, A., MATEOS, A.; VILAFRANCA, M.; GOMEZ-MAMPASO, E.; TERCERO, J.C.; ALEMANY, J.; SUAREZ, G.; DOMINGO, M.; DOMINGUEZ, L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.33-36, 1995.
- 20 LILENBAUM, W. **Estudo comparativo a campo de novos métodos de diagnóstico da tuberculose bovina**. 86p. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Instituto de Microbiologia, Rio de Janeiro - RJ, 1998.
- 25 LILENBAUM, W. Atualização em Tuberculose Bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22(4), p.145-151, 2000.
- 30 LOESCHKE, S.; GOLDMANN, T.; VOLLMER, E. Improved detection of mycobacterial DNA by PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using thin sections. **Pathology - Research and Practice**, v.201, p.37-40, 2005.
- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001, 360 p.
- 35 MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Departamento de Defesa Animal. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose** (PNCEBT). [S.l.], 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 15 mar. 2006.
- 40 MATTHIAS, D. Infecções por Micobactérias. In: BEER, J. (ed.) **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 1988. p. 261-289.
- 45 MILLER, J.; JENNY, A.; RHYAN, J.; SAARI, D.; SUAREZ, D. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. **J.Vet.Diagn.Invest.**, v.9, p.244-249, 1997.
- 50 MILLER, J.M.; JENNY, A.L.; PAYEUR, J.B. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.15-23, 2002.

- MOLINA, A.L. & TOBO, P.R. Biologia molecular. Uso das técnicas de biologia molecular para o diagnóstico. **Einstein**, v.2, p.139, 2004.
- 5 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.
- MONTEIRO, L.L.; SANTOS, L.A.G.; TEODORO, V.A.M.; GUIMARÃES, K.R., PINTO, P.S.A.; BEVILACQUA, P.D. Aplicação de imunoenaios no diagnóstico de doenças veiculadas por produtos de origem animal. **Higiene Alimentar**, v.18 (123), p.23-29, 2004.
- 10 MORRIS, R.S.; PFEIFFER, D.U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, v.40, p.153-177, 1994.
- 15 NEILL, S.D.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis**, v.81 (1/2), p.79-86, 2001.
- OIE. **Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines** [S.l.], 2000; Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00050.htm>. Acesso em 15. mar.2007.
- 20 OPAS - ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Reunión internacional para la erradicación de la tuberculosis bovina en Iãs Américas. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana** (Ed. Espanhola), v.113, p.357-360, 1992.
- 25 OLIVAL, A.A. & SPEXOTO, A.A. Leite informal no Brasil: aspectos sanitários e educativos. **Higiene Alimentar**, v.18 (119), p.12-17, 2004.
- 30 OLIVEIRA, P.R.; COELHO, H.E.; REIS, D.O. et al. 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.
- PARRA, A.; GARCÍA, N.; GARCÍA, A.; LACOMBE, A.; MORENO, F.; FREIRE, F.; HERMOSO DE MENDOZA, J. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.315-324, 2008.
- 35 PHILLIPS, C.J.C.; FOSTER, C.R.W.; MORRIS, P.A.; TEVERSON, R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. **Research in Veterinary Science**, v.74, p.1-15, 2003.
- 40 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. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.3, p.10-15, 2002.
- 45 PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **J.Comp.Pathol.**, v.99, p.357-399, 1988.

- POLLOCK, J.M.; McNAIR, J.; WELSH, M.D.; GIRVIN, R.M.; KENNEDY, H.E.; MACKIE, D.P.; NEILL, S.D. Immune responses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v.81, p.103-107, 2001.
- 5
- RADOSTITS, O.M. & BLOOD, D.C. (Ed.) **Manual de controle da saúde e produção dos animais**. São Paulo: Editora Manole, 1986, 530p.
- 10
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary Medicine**, 9° ed. W.B. Saunders, 2000, 1877p.
- RIBEIRO, A.C.C.L. **Diagnóstico da tuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. Dissertação (Doutorado em Ciências Agrárias) - Escola de veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 2003.
- 15
- RICCETTI, R.V.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; CORTES, J.A. Investigação epidemiológica sobre as zoonoses de maior constatação em matadouros. II. Bovinos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo**, v.26, p.61-68, 1989.
- 20
- ROMERO, R.E.; GARZON, D.L.; MEJIA, G.A.; MONROY, W.; PATARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. **Can J Vet Res.**, v.63, p.101-106, 1999.
- 25
- RORING, S.; HUGHES, M.S.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.227-236, 2000.
- 30
- ROXO, E. **Situação atual da Tuberculose Bovina no Brasil** [S.l.]: Instituto Biológico. Disponível em: <<http://www.spmv.org.br/conpavet2004>>. Acesso em: 20 fev.2006.
- 35
- SAEG (2007) Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas, ver. 9.1, FUNARBE, UFV.
- 40
- SAKAMOTO, S.M.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, M.A.S.; ROXO, E.; RICHTZENHAIN, L.J.; VASCONCELLOS, S.A.; FERREIRA NETO, J.S. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.66, n.2, p.44-58, 1999.
- 45
- SALAZAR, F.H.P. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, 2005.
- SAMARA, S.I.; BUZINARO, M.G.; OLIVEIRA, M.A.C. Diagnóstico da situação sanitária do gado leiteiro em Pitangueiras-SP: I. Tuberculose. **ARS Veterinária**, v.12, p.132-136, 1996.

- 5 SANTOS, A.S.O. **Lesões, isolamento e expressão imuno-histoquímica do *Mycobacterium bovis* no granuloma da tuberculose em bovinos do Norte Fluminense**. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, Rio de Janeiro, 2004.
- 10 SCHENK, M.A.M. & SCHENK, J.A.P. (1982) Prevalência de Tuberculose, Cisticercose e Hidatidose em Bovinos Abatidos nos Matadouros-Frigoríficos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (1974/1979); <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicações/cot/COT11.html> em 02/09/03, página mantida pela INFORMS.
- 15 SEVA, J.; MENCHÉN, V.; NAVARRO, J.A.; PALLARÉS, F.J. Caprine tuberculosis eradication program: an immunohistochemical study. **Small Ruminant Research.**, v.46, p.107-114, 2002.
- SILVA, F.L. & NOGUEIRA, R.H.G. Imunoistoquímica em Patologia Veterinária. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v.38, p.44-53, 2002.
- 20 SOERENSEN, B.; ALMEIDA FILHO, O.M.; SCHILLER, W.R.; VIEIRA, V. Controle e erradicação da tuberculose bovina. Estudo experimental no Estado de São Paulo, Brasil. **UNIMAR Ciências**, v.1, p.14-18, 1992.
- 25 SOUZA, A.V.; SOUZA, C.F.A.; SOUZA, R.M.; RIBEIRO, R.M.P.; OLIVEIRA, A.L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene Alimentar**, v.13 (59), p.22-27, 1999.
- 30 VAN EMBDEN, J.D.A.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T.; DALE, J.W.; EISENACH, K.D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.W.M.; MARTIN, C.; MCADAM, R.; SHINNICK, T.M.; SMALL, P.M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J. Clin. Microbiol.** v.31, p.406-409, 1993.
- 35 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, and nasal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.1050-1055, 1998.
- 40 WARDS, B.J.; COLLINS, D.M.; de LISLE, G.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v.43, p.227-240, 1995.
- 45 WEDLOCK, D.N.; SKINNER, M.A.; LISLE, G. W.; BUDDLE, B. M. Control of *Mycobacterium bovis* infections and risk to human populations. **Microbes and Infection**, v.4, p.471-480, 2002.
- WHITTINGTON, R.J.; REDDAKLIFF, L.; MARSH, I.; SAUNDERS, V. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. **Aust. Vet. J.**, v.77, p.392-397, 1999.

WOOD, P.R. & JONES, S.L. Bovigam: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v.81, p.147-155, 2001.

- 5 ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, R.L.; FIORAVANTI, R.L.; ROXO, E. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction Identification in Bovine Lymphnode Biopsies and Genotyping in Isolates from Southeast Brazil by Spolypotyping and Restriction Fragment Length Polymorphism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p.1-5, 2001.