

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE FOCOS DE TUBERCULOSE BOVINA A
PARTIR DA VIGILÂNCIA EM MATADOUROS-FRIGORÍFICOS
SOB SERVIÇO DE INSPEÇÃO ESTADUAL NA BAHIA**

Márcio Santos Batista

Cruz das Almas – Bahia
2016

IDENTIFICAÇÃO DE FOCOS DE TUBERCULOSE BOVINA A PARTIR DA VIGILÂNCIA EM MATADOUROS-FRIGORÍFICOS SOB SERVIÇO DE INSPEÇÃO ESTADUAL NA BAHIA

Márcio Santos Batista
Medicina Veterinária
Universidade Federal da Bahia, 1994

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação do curso de Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Defesa Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira
Coorientadora: Dra. Luciana Niedersberg de Ávila

Cruz das Almas – Bahia
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

B333i

Batista, Márcio Santos.

Identificação de focos de tuberculose bovina a partir da vigilância em matadouros-frigoríficos sob serviço de inspeção estadual na Bahia / Márcio Santos Batista._ Cruz das Almas, BA, 2016.
67f.; il.

Orientador: Robson Bahia Cerqueira.

Coorientadora: Luciana Niedersberg de Ávila.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Bovinos – Doenças. 2.Bovinos – Tuberculose em animais. 3.Frigoríficos – Inspeção de carnes – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE FOCOS DE TUBERCULOSE BOVINA A PARTIR
DA VIGILÂNCIA EM MATADOUROS-FRIGORÍFICOS SOB SERVIÇO
DE INSPEÇÃO ESTADUAL NA BAHIA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Márcio Santos Batista

Aprovada em: 10 de junho de 2016

Dra. Luciana Niedersberg de Ávila
Agência Estadual de Defesa Agropecuária - ADAB
Coorientadora

Dr. Maurício Costa Alves da Silva
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Examinador Externo

Dra. Isabella de Matos Mendes da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinadora Interna

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais Antonio Batista e Tereza Emília (*in memoriam*) por terem sempre valorizado e priorizado os nossos estudos.

AGRADECIMENTOS

À Diretoria da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia – ADAB pela oportunidade da realização desse projeto em Defesa Agropecuária.

Ao Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira pela orientação e à Colega Dra. Luciana Niedersberg de Ávila pela coorientação desse projeto de pesquisa.

Aos colegas da ADAB que participaram direta ou indiretamente na realização desse projeto.

Aos Colaboradores do laboratório de micobacteriologia do LACEN-BA - Erivelton Oliveira, Elane, Zilda, Márcia, Helenilda, Zileide e Sílvio - pelas orientações, acolhimento e incentivo durante o cultivo das amostras.

Aos professores e colegas do mestrado profissional pelo apoio nessa jornada para a conclusão desse projeto.

EPÍGRAFE

“Chegará o dia em que todo homem conhecerá o íntimo dos animais. Nesse dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a própria humanidade”.

(Leonardo da Vinci)

IDENTIFICAÇÃO DE FOCOS DE TUBERCULOSE BOVINA A PARTIR DA VIGILÂNCIA EM MATADOUROS-FRIGORÍFICOS SOB SERVIÇO DE INSPEÇÃO ESTADUAL NA BAHIA

RESUMO: A tuberculose bovina (BTB) é uma doença crônica e zoonótica, que apresenta formação de granulomas nodulares e tem relevante impacto econômico e na saúde pública. Na Bahia, com a evolução do programa de controle e erradicação dessa enfermidade se faz necessário ampliar a vigilância na busca por animais infectados e seus rebanhos de origem. O objetivo deste trabalho foi identificar propriedades foco de BTB através do cultivo do *Mycobacterium bovis* de lesões sugestivas em bovinos inspecionados no estado da Bahia. De janeiro de 2014 a março de 2015 foram colhidas amostras de bovinos abatidos em 10 matadouros-frigoríficos, das regiões centro-norte e nordeste da Bahia e acondicionadas em solução saturada de borato de sódio até o cultivo no laboratório. Fragmentos das amostras foram descontaminados pelo método de Petroff modificado, cultivados no meio sólido Stonebrink-Leslie e Lowenstein Jensen por um período máximo de 90 dias a 37°C e os isolados foram identificados utilizando-se do teste MPT64, ácido p-nitrobenzóico e diagnóstico molecular. Dos fragmentos cultivados, 18% (7/38) foram positivos, representando cinco animais infectados e identificados em 100% (5/5) como *Mycobacterium bovis* pela técnica de reação em cadeia da polimerase. Esse resultado confere 17% de positividade dos 30 animais com lesões presuntivas de BTB, selecionados de um universo de 562.910 bovinos inspecionados. Os animais amostrados originaram de 21 municípios, entre os quais foram identificadas as propriedades foco em Amargosa, Jeremoabo, Pedro Alexandre, Serrinha e Terra Nova. A vigilância em matadouro-frigorífico resultou na identificação de propriedades foco da tuberculose bovina a partir do cultivo e identificação molecular das lesões macroscópicas sugestivas da enfermidade.

Palavras chave: Diagnóstico bacteriológico; PCR; Tuberculose; Vigilância epidemiológica

IDENTIFICATION OF BOVINE TUBERCULOSIS OUTBREAKS FROM SURVEILLANCE IN SLAUGHTERHOUSES UNDER STATE INSPECTION SERVICE IN BAHIA

ABSTRACT: Bovine tuberculosis (BTB) is a chronic, zoonotic disease, which presents nodular granulomas formation and has a significant economic and public health impact. In Bahia, with the evolution of the control and eradication program of the disease it is necessary to extend the surveillance in the search for infected animals and their herds of origin. The objective of this study was to identify focus properties of BTB by *Mycobacterium bovis* cultivation of suggestive lesions in cattle inspected in the state of Bahia. From January 2014 to March 2015 slaughtered cattle samples were collected in 10 slaughterhouses in north-central and northeast regions of Bahia, and placed in a saturated solution of sodium borate to the cultivation in the laboratory. Fragments of the samples were decontaminated by Petroff method modified, cultivated in solid medium Stonebrink-Leslie and Lowenstein Jensen for a maximum period of 90 days at 37 ° C, the isolates were identified using the MPT64 test, p-nitrobenzoic acid and molecular diagnosis. From cultured fragments, 18% (7/38) were positive, representing five infected animals and identified by molecular biology in 100% (5/5) as *M. bovis* by polymerase chain reaction technique. This result gives 17% positive from 30 animals with presumptive injury BTB, selected from a universe of 562,910 inspected cattle. The animals sampled originated from 21 municipalities among which were identified the focus properties in Amargosa, Jeremoabo, Pedro Alexandre, Serrinha and Terra Nova. The slaughterhouse surveillance resulted in the identification of focus properties of bovine tuberculosis from the cultivation and molecular identification of macroscopic lesions suggestive of the disease.

Key - words: Bacteriological diagnosis; Epidemiological surveillance; PCR; Tuberculosis

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Classificação da patogenicidade das espécies de micobactérias	16

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Classificação dos países para a tuberculose bovina no ano de 2015	18
FIGURA 2 Ciclo de transmissão da tuberculose bovina	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAB:	Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia
BAAR:	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BTB:	Tuberculose Bovina
DNA:	Ácido Desoxirribonucléico
GTA:	Guia de Trânsito Animal
HIV:	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPC:	Cloreto Hexadecilpiridínio
IFN- γ :	Interferon Gama
LACEN-BA:	Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz
LADESA:	Laboratório de Sanidade Animal
MAPA:	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>M. avium</i> :	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>M. bovis</i> :	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. tuberculosis</i> :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MNT:	Micobactérias não Tuberculosas
MTC:	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
μ m:	Micrômetro
OIE:	Organização Mundial de Saúde Animal
pb:	Pares de Bases
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PNB:	Ácido para-nitrobenzóico
PNCEBT:	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
PPD:	Derivado Proteico Purificado
RIISPOA:	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIE:	Serviço de Inspeção Estadual
TCC:	Teste Cervical Comparativo
TCS:	Teste Cervical Simples
UFC:	Unidade Formadora de Colônia
UNB:	Universidade de Brasília
USP:	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 AGENTE ETIOLÓGICO	16
3.2 EPIDEMIOLOGIA	17
3.3 IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA	19
3.4 IMPACTO ECONÔMICO	21
3.5 TRANSMISSÃO	22
3.6 RESPOSTA IMUNE, PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	24
3.7 DIAGNÓSTICO	25
3.7.1 Diagnóstico Clínico	25
3.7.2 Diagnóstico Alérgico Cutâneo ou de Campo	25
3.7.3 Diagnóstico Anatomopatológico	27
3.7.4 Diagnóstico Bacteriológico	28
3.7.5 Diagnóstico Molecular	29
3.7.6 Diagnóstico Sorológico	31
3.8 MEDIDAS DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO	32
REFERÊNCIAS	35
ARTIGO 1	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
ANEXOS	61
ANEXO 1 - Municípios do circuito pecuário 3	61
ANEXO 2 - Municípios do circuito pecuário 4	64
ANEXO 3 - Guia de trânsito animal	66
ANEXO 4 - Requisição para isolamento e identificação de <i>M. bovis</i>	67

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (BTB) é uma doença zoonótica bacteriana crônica causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) que afeta, principalmente bovinos e bubalinos, além de outros mamíferos domésticos e silvestres. É caracterizada pela formação progressiva de granulomas nodulares ou tubérculos em órgãos ou tecidos como, por exemplo, pulmão, linfonodos, fígado, entre outros (OIE, 2014).

Na saúde pública, essa enfermidade representa um importante problema para os seres humanos podendo ser transmitida, principalmente, por inalação de aerossóis ou ingestão de leite não pasteurizado (ROXO, 2008). Os impactos econômicos pela ocorrência da tuberculose bovina estão representados, por exemplo, pelas perdas em decorrência da morte de animais, diminuição do ganho de peso e da produção leiteira, condenação de carcaças no matadouro-frigorífico e descarte de animais de alto valor zootécnico (RUGGIERO et al., 2007; MARQUES et al., 2008).

Rotineiramente o diagnóstico da BTB é realizado por métodos de tuberculinização preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e definido pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Esse método indireto é representado pelo teste cervical simples; o teste da prega ano-caudal; e o teste cervical comparativo, que é a prova confirmatória, por ser mais específica quando comparado aos testes simples. Os métodos diretos identificam o agente etiológico em material biológico determinando o diagnóstico definitivo da doença (BRASIL, 2006). A cultura possibilita a multiplicação e o isolamento pelo processo de semeadura em meios de cultura específicos (BRASIL, 2008).

Na Bahia, no período de outubro de 2008 a novembro de 2010, foi realizado o estudo da prevalência e fatores de risco da tuberculose bovina, o qual foi desenvolvido pela Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), em parceria com o MAPA, Universidade de Brasília (UNB) e Universidade de São Paulo (USP), utilizando-se de métodos de tuberculinização. A prevalência de rebanhos bovinos foi de 1,6% (com intervalo de 0,3-2,9%, a depender da região) e a

prevalência de bovinos de 0,21% (com intervalo de 0,02-0,66%). Estes resultados são úteis para conhecer o impacto da tuberculose bovina no estado da Bahia e, assim, desenhar e implantar efetivas medidas de controle da doença (COSTA et al., 2012; ÁVILA, et al. 2013).

Com a evolução das etapas do programa de controle e erradicação e a baixa prevalência dessa enfermidade, a inserção da vigilância em matadouros-frigoríficos e produtos de origem animal assume papel importante na investigação de foco bacteriológico a partir do cultivo de *M. bovis* em lesões sugestivas de tuberculose de bovinos abatidos. Dessa forma, o serviço oficial de defesa participa com o fortalecimento da troca de informações entre o serviço de defesa animal e o serviço de inspeção, visto que este tem papel importante na proteção da saúde da população e, também, na vigilância epidemiológica da doença (BRASIL, 2006).

Em decorrência dos inúmeros prejuízos de caráter socioeconômico causados pela BTB é de extrema importância a sua investigação para minimizar os seus efeitos deletérios. O presente estudo objetivou identificar propriedades foco de tuberculose bovina a partir da vigilância em matadouros-frigoríficos sob Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e do isolamento e identificação molecular de *M. bovis* de lesões sugestivas da enfermidade observadas na inspeção *post mortem* de bovinos abatidos nesses estabelecimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar focos de tuberculose através do cultivo de *Mycobacterium bovis* de lesões sugestivas de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos inspecionados das regiões centro-norte e nordeste do estado da Bahia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença de *Mycobacterium bovis* em fragmentos de lesões sugestivas de tuberculose, por métodos bacteriológico e molecular, em bovinos abatidos.
- Rastrear propriedades foco da tuberculose bovina a partir dos documentos sanitários dos bovinos infectados.
- Contribuir com o órgão oficial de defesa sanitária animal na identificação de propriedades foco da tuberculose bovina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Os principais agentes etiológicos da tuberculose nos mamíferos são as espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*, as quais são causadores da tuberculose humana, da tuberculose bovina e da tuberculose humana na África, respectivamente (ACHA; SZYFRES, 2001). O agente *Mycobacterium bovis* pertence à família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* e faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) junto com *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo de Calmitte e Guérin), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* (patogênico para ratazana), *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii* (adaptado às focas e leões marinhos) e *Mycobacterium caprae* (adaptado aos caprinos) (SPOSITTO et al., 2014). As micobactérias podem ser classificadas como patogênicas, potencialmente patogênicas e raramente patogênicas (Tabela 1).

Tabela 1 Classificação da patogenicidade das espécies de micobactérias

Patogênicas				
<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>
<i>M. caprae</i>				
Potencialmente patogênicas				
<i>M. avium</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. avium subsp paratuberculosis</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i>
Raramente patogênicas				
<i>M. agri</i>	<i>M. cooki</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. alchiense</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. homossenze</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. shimoidei</i>	<i>M. gilvum</i>
<i>M. chubuense</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>
<i>M. confluentis</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. sphagni</i>	

Fonte: BRASIL, 2008

De um modo geral, as micobactérias são caracterizadas como bacilo de tamanho 0,5 a 7,0 μm , não formam esporos, imóveis, não produzem toxinas, são intracelulares, aeróbios ou microaerófilos e apresentam parede celular rica em ácido micólico que confere a álcool-ácido resistência. Quanto ao cultivo, a espécie *M. bovis* cresce melhor em meio a base de ovo e enriquecido com piruvato de sódio como, por exemplo, o Stonebrink-Leslie; necessita de 3 a 4 semanas de incubação numa faixa de temperatura entre 34-38°C, com ponto ótimo de crescimento a 37°C, até a visualização das colônias; e apresenta inibição na presença do glicerol. É sensível a isoniazida e resistente a pirazinamida, não reduz a niacina (BRASIL, 2008; GORMLEY et al., 2014). Corner et al. (2012) observaram que a espécie *M. bovis*, assim como os outros membros do MTC, apresentam multiplicação mais lenta quando comparado com o padrão geral das micobactérias e requerem longo tempo de incubação, principalmente no primeiro isolamento.

A espécie *M. bovis* apresenta diferentes espoligotipos identificados em diversos estudos. Costa et al. (2010) identificaram após análise de pulmões e linfonodos mediastínicos de 43 carcaças de bovinos os espoligotpos SB1055 (mais frequente), SB0268 e SB0120, os quais estão presentes no Brasil e em outras partes do mundo. Em estudo semelhante, Alzamora Filho et al. (2014) analisaram 180 lesões sugestivas de BTB provenientes de matadouros-frigoríficos inspecionados e constataram a presença dos espoligotipos SB0121, SB295, SB1055, SB1145, SB1648 e SB140 em 14 isolados.

3.2 EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose bovina apresenta distribuição mundial com variação por região e país. (ACHA; SZYFRES, 2001). É mais prevalente em grande parte da África, em regiões da Ásia e das Américas, constituindo séria ameaça para a saúde humana e animal. Muitos países têm sido capazes de reduzir ou limitar a incidência da doença por meio de testes e sacrifício ou destruição dos animais infectados. A redução da sua ocorrência na população bovina já é observada em muitos países desenvolvidos, mas focos de infecção nos animais silvestres ainda estão presentes no Canadá, Reino Unido, Estados Unidos e Nova Zelândia (OIE, 2014). A figura 1 representa o

status sanitário conferido pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) no ano de 2015 para os diversos países revelando a ocorrência da BTB.

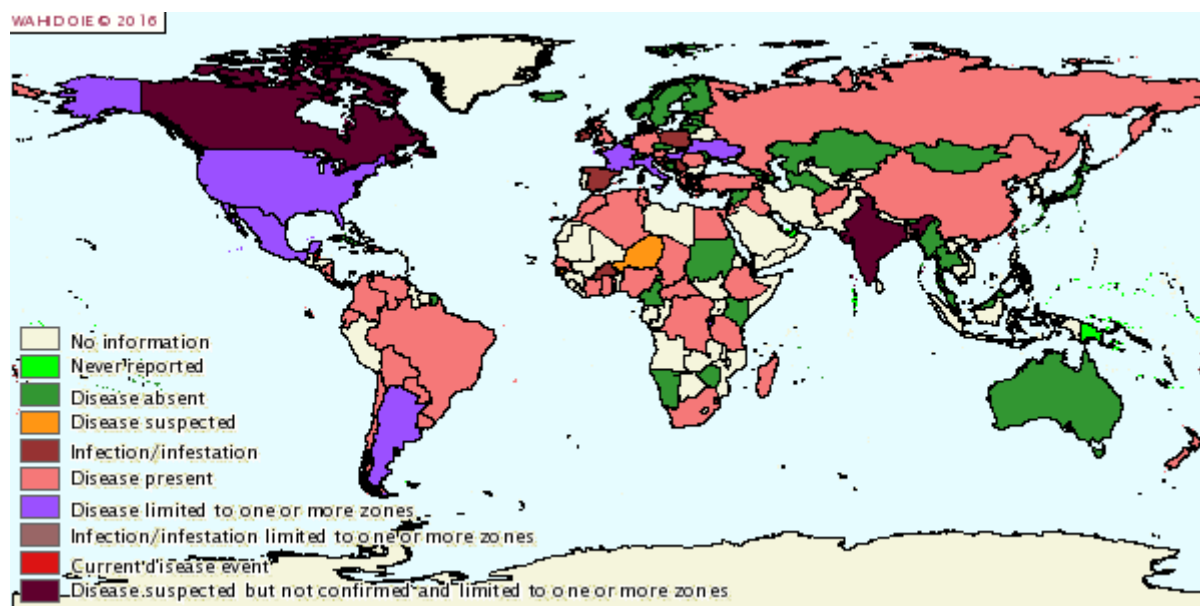


Figura 1 Classificação dos países para a tuberculose bovina no ano de 2015
Fonte: OIE, 2016

A Austrália constitui um exemplo de sucesso na erradicação da BTB. Gee (1986) relatou que o programa de erradicação da tuberculose bovina se iniciou em 1970 com o uso sistemático do teste de tuberculinização dos rebanhos e a inspeção de carcaças nos matadouros. Em 1997, após 27 anos de campanha nacional de erradicação, inclusive com o apoio da indústria, foi declarada oficialmente livre e sem reservatórios silvestres para a enfermidade (MORE et al., 2015).

No Brasil, os inquéritos epidemiológicos oficiais da BTB indicam prevalências diversificadas. A prevalência de rebanhos bovinos na Bahia foi de 1,6% (com intervalo de 0,3-2,9% a depender da região) e a prevalência de bovinos de 0,21% (com intervalo de 0,02-0,66%) no último estudo de 2008 a 2010 no qual foram identificadas as explorações leiteira e mista, bem como os rebanhos com mais de 18 fêmeas com faixa etária igual ou superior a 24 meses, como fatores de risco para a BTB (COSTA et al., 2012; ÁVILA et al., 2013). No Paraná, Silva (2012) identificou uma prevalência de 2,15% para propriedades positivas e 0,42% para animais positivos. Belchior et al. (2016), em Minas Gerais, encontraram a prevalência de 5% para rebanhos positivos e 0,8% animais positivos. Em estudo no Mato Grosso,

Nespoli (2012) estimou uma prevalência de 1,3% e 0,123% para rebanhos e animais positivos, respectivamente. Veloso (2014), em Santa Catarina, estimou uma prevalência de 0,5% para propriedades e 0,06% animais positivos. De um modo geral, esses estudos consideraram a produção leiteira com rebanhos maiores e tecnificação da produção como fatores de risco da BTB. Nesse cenário, o estado do Mato Grosso, em projeto pioneiro, criou o Plano de Vigilância para Erradicação da Tuberculose Bovina incluindo ações de controle do trânsito, saneamento obrigatório da propriedade foco e pagamento de indenizações (MATO GROSSO, 2014).

Embora o bovino seja considerado o hospedeiro principal de *M. bovis*, a enfermidade tem sido descrita em outras espécies domésticas e selvagens, as quais constituem uma fonte contínua para que ocorra a reinfecção do gado. Krajewska et al. (2014) identificaram *M. bovis* em javali selvagem (*Sus scrofa*) na Polônia com o mesmo espoligotipo dos observados em bisões em estudos anteriores, sugerindo a possibilidade de transmissão entre essas espécies e, até mesmo, entre outras espécies do ecossistema.

De acordo com Anaelom et al. (2010), em muitas partes do mundo, texugos, gambás, javalis, veados e outras espécies selvagens representam um reservatório do agente, dessa forma, a movimentação desses animais dissemina a doença para os animais domésticos. Livingstone et al. (2015) citaram o marsupial (*Trichosurus vulpecula*) como o responsável pela manutenção da BTB na vida selvagem na Nova Zelândia. Com o intuito de avaliar a sensibilidade da vigilância da BTB na vida selvagem na França, Rivière et al. (2016) avaliaram três formas de vigilância: 1) animais caçados; 2) animais encontrados mortos ou moribundos; 3) a vigilância ativa para javali e texugo; e verificaram que a vigilância ativa e a passiva, rastreando carcaças, foram as formas mais prováveis de se encontrar animal infectado.

3.3 IMPACTO NA SAÚDE PÚBLICA

O potencial zoonótico de *M. bovis* tem causado preocupações no âmbito da saúde pública, pois os seres humanos podem ser infectados pela exposição direta aos animais ou indiretamente pelo consumo de produtos de origem animal

contaminados. Esse agente tem sido isolado e identificado nos seres humanos em muitos países, apresenta as mesmas características clínicas de *M. tuberculosis* (tuberculose típica) e a incidência de tuberculose pulmonar é mais alta em pessoas que lidam diretamente com os animais infectados, como os trabalhadores de propriedades rurais e de matadouros-frigoríficos e médicos veterinários (caráter de doença ocupacional) quando comparada aos urbanos (OIE, 2014).

De acordo com Thoen et al. (2006), o consumo do leite não pasteurizado é a causa mais comum da tuberculose humana extra pulmonar por *M. bovis*. Contudo, com a prática da fervura do leite e o aumento da pasteurização do leite no mundo, a rota digestiva de infecção se tornou menos importante. Entretanto, em estudo com 25 trabalhadores de um estabelecimento de gado leiteiro no Iraque, Barak (2012) identificou 36% de positividade nos trabalhadores examinados. Hassanain et al. (2009) estudaram a BTB em uma fazenda de gado leiteiro e identificaram 30,5% dos animais e 40% dos trabalhadores rurais infectados com o teste tuberculínico simples, além do leite contaminado, que representou uma importante fonte de infecção e risco para a saúde dos seres humanos e outros animais.

Belchior et al. (2016) realizaram um estudo da prevalência e fatores de risco da BTB e observaram que a maioria dos agricultores utilizava leite cru na produção de queijo caseiro, comportamento que coloca em risco os consumidores locais e seus familiares, aliado à prática de abate de vacas de descarte sem inspeção sanitária. Uduak (2015) corrobora o risco do consumo do leite cru e sugere o fornecimento da assistência técnica e educacional para a promoção do controle da tuberculose, além de destacar que a infecção por via aérea se faz presente na indústria de carne e entre trabalhadores de matadouros-frigoríficos.

Para reduzir o risco associado ao consumo de leite e carne contaminada, Anaelom et al. (2010) observaram a necessidade de regras específicas para impedir a entrada de animais infectados na cadeia de alimentos, com exames de inspeção criteriosos *ante mortem* e *post mortem*, além disso reforçaram a necessidade do uso de medidas de proteção individual para minimizar a exposição daqueles em contato direto com os animais e, também, de priorizar os programas de vigilância da doença em animais e humanos. Desde os anos 1990 e 2000 as principais causas do *M.*

bovis em humanos nos países industrializados eram em decorrência da re-emergência da infecção trazida por imigrantes de regiões prevalentes da BTB; da ocorrência da infecção em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV); de mamíferos domésticos e selvagens infectados que transmitiam para os humanos; e da infecção por via aérea dos tratadores de animais e dos trabalhadores da indústria de carne (THOEN et al., 2006).

3.4 IMPACTO ECONÔMICO

A espécie *M. bovis* tem recebido atenção especial na pecuária devido ao impacto econômico acarretado pela enfermidade nos rebanhos (PÉREZ-LAGO et al., 2014). Nesse contexto, os prejuízos pela ocorrência da tuberculose bovina estão representados, por exemplo, pelas perdas diretas e indiretas em decorrência da morte de animais, queda no ganho de peso, diminuição da produção leiteira, condenação de carcaças no matadouro-frigorífico e descarte de animais de alto valor zootécnico. Além disso, estima-se uma perda em torno de 10 a 25% da eficiência produtiva nos animais infectados, bem como uma redução na credibilidade da propriedade com a evidenciação do foco da enfermidade (BRASIL, 2006; RUGGIERO et al., 2007; MARQUES et al., 2008).

No matadouro-frigorífico, a condenação total da carcaça com tuberculose ocorre quando: 1) no exame *ante mortem* o animal estiver febril; 2) a tuberculose for acompanhada de anemia ou caquexia; 3) forem constatadas alterações tuberculosas nos músculos, nos tecidos intramusculares, nos ossos (vértebras) ou nas articulações ou nos gânglios linfáticos que drenam a linfa dessas partes; 4) ocorrerem lesões caseosas concomitantemente em órgãos torácicos e abdominais, com alteração de suas serosas; 5) houver lesões miliares de parênquimas ou serosas; 6) as lesões forem múltiplas, agudas e ativamente progressivas; 7) existir tuberculose generalizada (BRASIL, 1997).

Em estudos realizados na África, Habarugira et al. (2014) avaliaram a perda econômica em matadouro-frigorífico após o abate de 16.753 bovinos e concluíram que a BTB é uma importante causa de condenação de carne, indicando a

implementação de vigilância e medidas de controle da enfermidade. Kwaghe et al. (2015) estudaram o abate de 2.495 bovinos que além das perdas diretas da carcaça do animal pela BTB observaram as questões do comércio internacional, segurança alimentar e importância socioeconômica da doença.

Em estudo de Buhr et al. (2009), a BTB apresentou impactos econômicos importantes na pecuária de corte de Minnesota, além das perdas de bovinos pela doença e dos custos com os trabalhos de controle e erradicação da enfermidade; na indústria da carne, em decorrência de atividades como castração de novilhas e registros, as perdas foram estimadas em US\$ 15.848.00 por ano; e alterações de preços e redução de demanda pela restrição de comércio interestadual e preocupação com disseminação da doença.

Rivière et al. (2014) descreveram que a BTB acarreta grandes perdas econômicas no setor pecuário na União Européia, com custos para a indústria da carne e para o governo, restrições de movimentação e abate de grande número de animais. Aliado a isso está a restrição ao comércio internacional de produtos provenientes de propriedades com registro de foco da enfermidade ou carcaças com lesão tuberculosa de qualquer natureza.

3.5 TRANSMISSÃO

A tuberculose é transmitida entre os bovinos principalmente por via aerógena, pela inalação de gotículas infectadas oriundas de tosse ou secreção nasal, ou por ingestão de água e alimento contaminado (ACHA; SZYFRES, 2001; THOEN et al., 2009). Existe risco individual para pessoas em contato direto com animais com possibilidade de estarem infectados como os veterinários, magarefes e inspetores de matadouros, patologistas em necropsias, produtores e trabalhadores rurais (ANAELOM et al., 2010).

Indiretamente a enfermidade pode ser transmitida pela ingestão de leite não pasteurizado e de carne de animais infectados (THOEN et al., 2006). A inspeção dos produtos de origem animal para o consumo humano, a pasteurização ou

esterilização de leite e seus derivados funcionam como estratégias de controle da transmissão de *M. bovis* para a população humana. Uduak (2015) corrobora apontando sobre a necessidade da pasteurização do leite e sugere a orientação para os moradores da zona rural da importância da fervura do leite quando for precária a infraestrutura para pasteurização. Pérez-Lago et al. (2014) observaram que o homem representa o último hospedeiro para infecção por *M. bovis*; a transmissão entre humanos é rara, exceto para pessoas imunodeprimidas expostas (Figura 2).

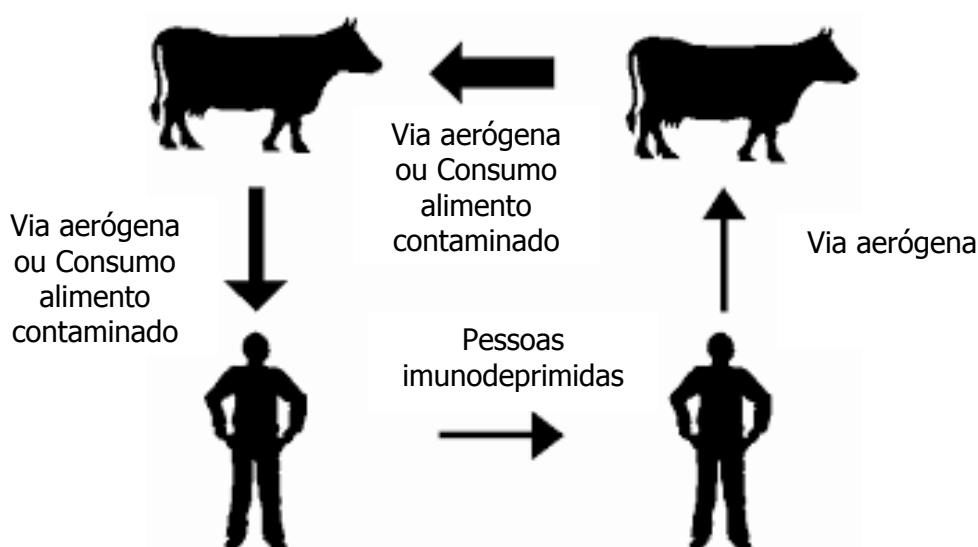


Figura 2 Ciclo de transmissão da tuberculose bovina

De acordo com Skuce et al. (2012) existem fatores de risco de transmissão da tuberculose bovina entre os rebanhos, tais como: o histórico de incidência da doença; a movimentação de animais; a ocorrência da doença em propriedades próximas; o tamanho e o tipo dos rebanhos; o tipo de instalação; a aquisição de animais sem controle; e o fornecimento de alimento no interior de instalações. Devido à cronicidade, um animal pode disseminar a doença para outros rebanhos antes da manifestação dos sintomas. Assim, a movimentação dos animais infectados sem diagnóstico e o contato com animais selvagens infectados são formas importantes de disseminação da enfermidade (OIE, 2014).

3.6 RESPOSTA IMUNE, PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A grande maioria das infecções por *M. bovis* ocorre pela via respiratória (90%), pela inalação de aerossóis contaminados por esse agente, causando a tuberculose pulmonar que é a forma clínica mais comum (ACHA; SZYFRES, 2001). Nos alvéolos, os bacilos são capturados e fagocitados pelos macrófagos após a estimulação da resposta imune inespecífica do organismo e seu destino depende da virulência do microrganismo, da carga infectante e da resistência do hospedeiro.

Com a parada da multiplicação bacilar ocorre uma reação de hipersensibilidade retardada estimulada pelo sistema imune que acarreta a destruição tecidual do próprio hospedeiro, pela necrose de caseificação, na tentativa de conter o crescimento bacteriano. Esse processo leva à formação de granuloma com área de necrose de caseificação e propagação do bacilo para o linfonodo satélite onde se forma novo granuloma intitulado de complexo primário (MURAKAMI et al., 2009).

Domingo et al. (2014) ratificaram que a BTB se manifesta como um processo inflamatório caseo-necrosante granulomatoso crônico com mineralização, conhecido como tubérculo que mede cerca de 2-20 milímetros e que afeta principalmente os pulmões e seus linfonodos, além de vários outros órgãos, dependendo da porta de entrada. A partir desse estágio as lesões podem regredir, estabilizar ou progredir. A disseminação da doença pode se apresentar de forma miliar quando acontece de forma abrupta e maciça, com entrada de um grande número de bacilos na circulação; ou protraída, a forma mais comum, quando a disseminação se dá por via linfática ou sanguínea, acometendo os pulmões, linfonodos, fígado, baço, úbere, ossos, rins, sistema nervoso central, disseminando-se por quase todos os tecidos (OLIVEIRA et al. 2012).

A BTB é uma doença debilitante e crônica, os sintomas podem levar meses ou anos para surgir, mas eventualmente pode ser aguda e de progressão rápida, bem como permanecer adormecida e se tornar ativa após período de estresse ou na velhice. As infecções recentes são, com frequência, assintomáticas. Em estágios avançados os sintomas habituais são emagrecimento progressivo, febre flutuante, fraqueza,

inapetência, tosse seca intermitente, dispnéia, constipação ou diarreia, aumento de gânglios linfáticos (ACHA; SZYFRES, 2001; OIE, 2014).

3.7 DIAGNÓSTICO

3.7.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico possui valor relativo, pois devido o caráter crônico da doença, na fase inicial o animal pode estar aparentemente sadio, sendo mais preciso com o avanço da enfermidade e evidenciação dos sintomas com a evolução do quadro clínico. Assim, com o avanço da idade do animal, mais oportunidades existirão para que sejam expostos à infecção (ACHA; SZYFRES, 2001). O exame físico possibilita o diagnóstico *in vivo*, porém apresenta como desvantagem o caráter crônico, com surgimento dos sintomas em estágio avançado da doença (RUGGIERO et al., 2007). Ramos et al. (2015) observaram que em países com programa de erradicação da BTB, os animais infectados são identificados mais cedo e, dessa forma, as infecções sintomáticas se tornam menos comuns.

3.7.2 Diagnóstico Alérgico Cutâneo ou de Campo

O teste tuberculínico intra-dérmico é tradicionalmente utilizado para determinar a prevalência de infecção de tuberculose em animais e seres humanos (HASSANAIN et al., 2009). Tem sido descrito como um método eficiente de diagnóstico em animais vivos e tem sido importante em programas de erradicação como teste diagnóstico a campo. De acordo com os padrões internacionais e adotado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), o teste cervical simples (TCS) é a prova de rotina em gado de leite devido a sua sensibilidade; o teste da prega ano-caudal é prova de triagem exclusiva para gado de corte; e o teste cervical comparativo (TCC) é a prova confirmatória para os animais reagentes ao teste da prega ano-caudal ou ao teste cervical simples, para distinguir entre a tuberculose e infecção por outra micobactéria como de *M. avium* (BRASIL, 2006).

O tipo de tuberculina mais utilizado é o derivado proteico purificado (PPD) bovino (*M. bovis*) e o PPD aviário (*M. avium*), um extrato antigênico obtido a partir de cultura de micobactérias inativadas termicamente. A comparação entre esses dois antígenos permite diminuir o problema de especificidade nos testes (PALMER; WATERS, 2006). O teste de tuberculinização é realizado somente por médico veterinário habilitado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com equipamentos e insumos específicos, em animais com idade igual ou superior a 6 semanas. No teste tuberculínico ocorre uma reação de hipersensibilidade tardia tipo IV, mediada por resposta celular e com baixa produção de anticorpos, em animais previamente expostos (sensibilizados) ao agente da tuberculose com formação de edema no local da aplicação da tuberculina (RUGGIERO et al., 2007). Tizard (2002) complementou que a reação inflamatória provocada pela inoculação da tuberculina é imunologicamente específica e resultam da interação entre o antígeno injetado, células apresentadoras de antígeno e células T.

De la Rua-Domenech et al. (2006) apresentaram vantagens e razões para a sua utilização, tais como: baixo custo, alta disponibilidade, longa história de uso e a falta de métodos alternativos para a detecção da BTB e ressaltaram limitações no teste, como dificuldades na administração e interpretação dos resultados, necessidade de uma segunda visita 72 horas após a inoculação da tuberculina para a leitura do resultado e baixo grau de padronização. Aliado a isso, Schiller et al. (2010) ressaltaram que a tuberculinização é um bom teste de rastreio primário, mas um teste insuficiente para identificar individualmente animais infectados. Com relação ao TCS, Tizard (2002) observou que testes falso-negativos podem ocorrer em situações tais como: animais com tuberculose avançada (anergia); animais com infecção recente; fêmeas paridas de 4 a 6 semanas; vacas idosas; e animais recém-testados entre 1 a 10 semanas.

O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) descreveu que os animais levados ao abate, para controle de provas de tuberculinização, são sacrificados em separado, no fim da matança, pois é proibida a matança em conjunto com animais que no ato da inspeção *ante mortem* seja suspeito da tuberculose e outras zoonoses (BRASIL, 1997).

3.7.3 Diagnóstico Anatomopatológico

O diagnóstico anatomopatológico ou exame macroscópico pode ser realizado durante a necropsia do animal ou na linha de inspeção, no exame *post mortem* dos animais abatidos em matadouro-frigorífico. Na rotina, na linha de inspeção, é realizada a observação dos caracteres organolépticos e físicos do sangue por ocasião da sangria e durante o exame de todos os órgãos; o exame de cabeça, músculos mastigadores, língua, glândulas salivares e gânglios linfáticos correspondentes; o exame da cavidade abdominal, órgãos e gânglios linfáticos correspondentes; o exame da cavidade torácica, órgãos e gânglios linfáticos correspondentes; e o exame geral da carcaça, serosas e gânglios linfáticos cavitários, infra-musculares, superficiais e profundos acessíveis, além da avaliação das condições de nutrição e engorda do animal (BRASIL, 1997).

Entretanto, esse tipo de diagnóstico apresenta certa dificuldade pela semelhança entre os processos inflamatórios corriqueiramente encontrados na linha de inspeção daqueles sugestivos da tuberculose, mesmo porque o granuloma não é uma alteração patognomônica, apesar de ser uma lesão clássica; alguns granulomas não tuberculosos podem não ser distinguíveis macroscopicamente de granulomas tuberculosos. Também, nessa forma de diagnóstico podem ocorrer erros, resultando em prejuízos econômicos e sanitários, podendo comprometer a vigilância epidemiológica da tuberculose bovina (FURLANETTO et al., 2012).

Na necropsia, os tubérculos são mais frequentemente vistos nos linfonodos bronquiais, mediastínicos e retrofaringeos. Macroscopicamente um granuloma tuberculoso tem um aspecto amarelado, uma consistência caseosa ou calcificada e, às vezes, um aspecto purulento (OIE, 2014). Em trabalho realizado por Lopes Filho (2010), as lesões sugestivas de tuberculose em bovinos foram observadas principalmente no aparelho respiratório com 53,1%, na carcaça com 20,2%, na cavidade abdominal com 16,5%, na cabeça ou língua com 8,3% e na mama com 2,0%. O isolamento da micobactéria *M. bovis* foi observado com maior frequência nos linfonodos pulmonares, mediastínicos e no parênquima pulmonar. França et al. (2013), observando também lesões sugestivas nos linfonodos, caracterizadas como nodulares, hemorrágicas ou não, de tamanhos e formas variadas, contendo exudato

purulento, caseoso ou calcificado, verificaram que a prevalência de animais com tais lesões ao exame anatomopatológico foi de 0,12%, acometendo principalmente os linfonodos pré-escapulares (51,5%), os traqueobronquiais (19,2%) e os isquiáticos (11,1%).

3.7.4 Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico definitivo da tuberculose é realizado a partir do isolamento e identificação do agente por métodos bacteriológicos. A cultura representa o exame laboratorial de referência (padrão-ouro) para isolamento do agente a partir das seguintes etapas: a descontaminação por agentes químicos para homogeneizar a amostra clínica e eliminar outros microrganismos; a semeadura em meio de cultura específico que permite o contato das micobactérias com as substâncias nutritivas; a incubação em estufa bacteriológica que fornece a temperatura adequada para a multiplicação das micobactérias; e a leitura dos tubos semeados e registro dos resultados, verificando a presença de colônias e ou de contaminação (BRASIL, 2008).

Corner et al. (2012) relataram que devido a dificuldade de isolar *M. bovis* de amostras clínicas, para serem processadas, devem passar por um processo de descontaminação, onde são eliminadas bactérias contaminantes menos exigentes para a multiplicação para favorecer o desenvolvimento das micobactérias e uso de meios específicos que inibem outros organismos. Assim, o isolamento primário de amostras de tecidos bovino pode ser influenciado pela duração da incubação, pelo descontaminante e meio de cultura utilizados e pelo número de bacilos viáveis nas amostras. Gormley et al. (2014) também descreveram o isolamento do *M. bovis* como o padrão-ouro para a definição da infecção, entretanto para o bom desempenho do diagnóstico deve-se atentar para a forma de colheita da amostra, do seu armazenamento e os procedimentos empregados na execução da técnica; por exemplo, para a cultura bacteriológica, observar o tecido com lesão visível como necrose caseosa em linfonodos e órgãos lesionados como o pulmão, fígado ou baço.

O método de Petroff é tradicionalmente utilizado no processo de descontaminação, com o hidróxido de sódio a 4%, para o isolamento de *M. bovis* de fragmentos de tecido bovino, por ser um descontaminante eficiente e relativamente barato. Outro método que pode ser uma alternativa para o método de Petroff é o Cloreto Hexadecilpiridínio a 1,5% (HPC), pela sua eficiência na descontaminação e reduzida toxidez para o bacilo (AMBRÓSIO et al., 2008). Na sequência, para a inoculação das amostras descontaminadas, os meios sólidos mais indicados são à base de ovo como o Stonebrink-Leslie e o Lowenstein Jensen com piruvato, o qual é o nutriente energético que favorece a multiplicação de *M. bovis*. O tempo prolongado de incubação (30 a 90 dias) devido ao crescimento lento de *M. bovis* em meios artificiais e a necessidade de grande quantidade de bacilos viáveis são pontos negativos da técnica. Entretanto, mesmo com lesões muitas vezes paucibacilar, a presença de organismos álcool-ácido resistentes podem não ser detectada microscopicamente, mas a micobactéria *M. bovis* ainda pode ser isolada no cultivo (OIE, 2014). Fráguas et al. (2008) relataram como desvantagem do método, o tempo de realização e a necessidade de laboratório especializado, além da limitação ao diagnóstico *post mortem* devido a dificuldade de colheita de amostras viáveis com o animal vivo.

De acordo com o PNCEBT é necessária a análise bacteriológica completa nas diferentes situações: 1) para a confirmação da infecção tuberculosa em bovinos de um país ou região onde não foi comprovada anteriormente; 2) no estudo de animais positivos ao teste tuberculínico, com ou sem lesões macroscópicas, de uma propriedade livre de tuberculose; 3) na pesquisa de micobactérias em lesões sugestivas de tuberculose, encontradas durante a inspeção sanitária *post mortem* de animais provenientes de unidades de criação monitoradas para tuberculose; 4) na pesquisa de micobactérias em amostras de leite e de outros produtos de origem animal; 5) nas necropsias de animais com reações inespecíficas, nos quais são encontradas lesões sugestivas de tuberculose (BRASIL, 2006).

3.7.5 Diagnóstico Molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR), como um método molecular, é uma alternativa para a classificação e identificação das micobactérias do MTC (MURAKAMI et al., 2009). A identificação dos membros do complexo é importante principalmente para a saúde pública e epidemiológica devido a possibilidade de impacto terapêutico em decorrência da resistência as drogas, como, por exemplo, a pirazinamida por *M. bovis* e *M. canettii* (PÉREZ-LAGO et al., 2014). Warren et al. (2006) descreveram a técnica de diferenciação do MTC pela amplificação por PCR de regiões genômicas, beneficiando, por exemplo, pacientes adultos e pediátricos com o HIV e imunossuprimidos.

De acordo com Ruggiero et al. (2007), estudos demonstraram que essa técnica pode detectar *M. bovis* em amostras clínicas (lesões sugestivas) e isolados de cultivo, mas tem alguns fatores desfavoráveis como o custo (*kits* comerciais), a complexidade, a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) de amostras paucibacilares, a escolha de *primers* (oligonucleotídeos) adequados, que restringem a utilização da PCR na rotina laboratorial para o diagnóstico da tuberculose, e comprometem o sucesso do método. Também, a descrição do genoma de *M. tuberculosis* e *M. bovis* ampliou a alternativa de diagnóstico, permitindo a escolha de *primers* adequados. Furlanetto et al. (2012b) demonstraram a mesma sensibilidade e especificidade entre a PCR *multiplex* e a bacteriologia (100%) na identificação do *M. bovis* de lesões colhidas em bovinos abatidos no estado do Mato Grosso e sugeriram a utilização da técnica PCR *multiplex* na vigilância em matadouros-frigoríficos pela sua rapidez na execução quando se compara à técnica bacteriológica. Sposito et al. (2014) diferenciaram *M. bovis* do complexo *M. tuberculosis* pela PCR *multiplex*, propondo uma ferramenta útil na diferenciação de outras micobactérias.

Schiller et al. (2010) relataram que a genotipagem de isolados bacterianos ou produtos de PCR tem se tornado cada vez mais uma ferramenta padrão na vigilância epidemiológica para o controle e a erradicação de doença e redução da sua prevalência. Assim, distinguir estirpes de *M. bovis* de uma base molecular fornece soluções importantes para as fontes de infecção e identificação de práticas ou ambientes que podem ajudar a propagação e manutenção da tuberculose animal. Também, as rotas de transmissão entre os bovinos e os animais selvagens podem

ser identificadas por tipagem de estirpes, assim como os meios de transmissão de BTB entre rebanhos tornam-se evidentes pelos movimentos dos animais.

Na Bahia, poucos estudos retratam a utilização da biologia molecular no diagnóstico da BTB. Costa et al. (2010) utilizaram a técnica de *spoligotyping* para identificar o polimorfismo entre isolados de *M. bovis*, onde foi encontrado o espoligotipo SB1055 como de maior frequência. Da mesma forma, em estudo com isolados de *M. bovis* de animais abatidos em matadouro-frigorífico, Alzamora Filho et al. (2014) utilizaram a técnica de tipificação molecular pelo *spoligotyping* para a identificação dos diferentes espoligotipos circulantes, contribuindo para a compreensão da epidemiologia do agente. Santos (2014) aplicou uma PCR *multiplex* para detectar e identificar micobactérias diretamente de lesões bovinas suspeitas originadas de matadouro-frigorífico sob serviço de inspeção estadual e comprovou que o método é eficaz e tem a vantagem de apresentar resultado em 48 horas.

3.7.6 Diagnóstico Sorológico

O teste de interferon gama (IFN- γ) tem por objetivo detectar a produção desta citocina pelas células T em decorrência da resposta imunitária à infecção das micobactérias. Nos bovinos não infectados não há a produção dessa citocina, indicando a negatividade à tuberculose bovina (RAMOS et al., 2015). É um teste complementar à tuberculinização na identificação de animais infectados, visto que o ensaio de IFN- γ busca selecionar aqueles animais de maior poder infeccioso para os demais bovinos (GORMLEY et al., 2006).

Schiller et al. (2010) descreveram como vantagens do ensaio de IFN- γ , o aumento da sensibilidade, a possibilidade de uma repetição do teste mais rápida, pois a técnica é *in vitro* e não há a necessidade de dessensibilização, nem a necessidade de uma segunda visita à propriedade, e os procedimentos do teste e a interpretação são mais objetivos em comparação ao teste tuberculínico. Como limitações relacionaram uma especificidade reduzida, altas exigências logísticas (teste em 24 h após a coleta de sangue), uma maior probabilidade de resposta não específica em animais jovens devido a atividade das células e os seus custos elevados.

De acordo com Palmer e Waters (2006), o uso dos antígenos ESAT-6 e CFP-10 pode aumentar a especificidade do teste de IFN- γ , além de serem indutores de IFN- γ importantes originados de micobactérias tuberculosas e, também, serem ausentes de muitas micobactérias não tuberculosas (MNT) e da estirpe do *M. bovis* Bacille Calmette Guerin (BCG). Em estudo em nível de campo na Austrália, esse teste demonstrou uma sensibilidade de 93,6% e uma especificidade de 96,3%. Eirin et al. (2015) realizaram a identificação e avaliação de novos antígenos para o IFN- γ e observaram um melhor desempenho do PPD bovino e o ESAT-6 juntos quando comparado aos antígenos testados. Isso reflete a experiência descrita por Gormley et al. (2006), onde relataram como parte do programa de erradicação da BTB na Irlanda o uso do teste da tuberculina comparada com sucesso na triagem dos animais no campo e a aplicação do teste de IFN- γ para suprir a limitação do teste alérgico na detecção daqueles animais não identificados em rebanhos cronicamente infectados.

3.8 MEDIDAS DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO

A BTB deve ser controlada devido às perdas econômicas geradas e o risco da infecção para os seres humanos. O controle se baseia no bloqueio de pontos críticos da cadeia de transmissão da enfermidade. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) no País visando reduzir a prevalência e a incidência de novos focos da enfermidade e criar um número significativo de propriedades certificadas livres de brucelose e tuberculose animal. Essa certificação é de adesão voluntária e exige a realização do saneamento da propriedade com o sacrifício dos animais reagentes positivos em condição especial no matadouro-frigorífico ou destruído na propriedade de criação.

Para a execução das ações, várias medidas foram necessárias, tais como: capacitar médicos veterinários do setor privado e laboratórios; padronizar métodos de diagnósticos; melhorar a integração do serviço de defesa sanitária animal com o serviço de inspeção de produtos de origem animal pelo seu trabalho na proteção do consumidor e na vigilância epidemiológica a partir da troca de informações entre

esses dois serviços. O controle do trânsito também tem participação importante nesse processo, principalmente na exigência de exames negativos para o trânsito interestadual de animais para a reprodução, bem como para a participação em eventos agropecuários e outras aglomerações de animais (BRASIL, 2006).

Furlanetto et al. (2012b) corroboraram com a implantação de sistema de vigilância com a integração dos serviços de inspeção e de defesa sanitária animal oficiais, em regiões de baixa prevalência, para a identificação de focos da doença. Assim, a identificação da BTB durante a inspeção de rotina no abate de bovinos é relevante para a vigilância e para o controle dessa enfermidade nos rebanhos, inclusive em países oficialmente livres da infecção onde essa ação é utilizada para manter o *status* oficial (DOMINGO et al., 2014).

O trabalho dos programas de controle e erradicação da BTB resulta na redução da incidência e morte humanas pela tuberculose bovina. A inspeção do gado abatido, a vigilância em propriedades rurais, o exame dos animais com remoção dos infectados, e o controle da movimentação dos animais tem tido sucesso na redução e eliminação da doença (OIE, 2014). Para tanto, o seu bom desempenho depende do uso de diagnóstico eficiente e confiável para a identificação dos animais infectados e, posterior, saneamento do foco. Gormley et al. (2014) indicaram a cultura e identificação presuntiva de estirpes de *M. bovis*, para monitorar e controlar a incidência da BTB, como possibilidade de manutenção de um programa sanitário eficiente.

Em países desenvolvidos, os programas de erradicação têm reduzido de forma significativa à prevalência dessa enfermidade, embora os reservatórios silvestres dificultem a erradicação (THOEN et al., 2006). O teste regular para a triagem dos animais e a eliminação obrigatória dos infectados, aliado à pasteurização do leite, tem permitido alcançar um maior controle e erradicação da BTB (UDUAK, 2015). O diagnóstico *post mortem* da BTB pela vigilância em matadouro-frigorífico a partir da detecção de lesões sugestivas durante a inspeção de rotina no abate comercial é usado como método eficiente de vigilância da BTB em países livres ou não, com posterior investigação no rebanho de origem da presença da doença (SCHILLER et al., 2010).

Segundo Miller e Sweeney (2013), estudos tem mostrado que o *M. bovis* poderá ser controlado enquanto estiver restrito à pecuária, sendo quase impossível a sua erradicação após a disseminação para hospedeiros de vida livre. Também, identificaram quatro fatores de risco associados com estabelecimento desse agente em espécies selvagens na América do Norte: contato de gado infectado com a fauna selvagem; suplementação alimentar de animais selvagens; vigilância deficiente dos animais selvagens em risco e o não reconhecimento de emergência para as espécies selvagens como hospedeiros. Rivière et al. (2014) concordaram que espécies selvagens, em especial os hospedeiros de manutenção, representam um grande entrave na erradicação de BTB no gado pela potencialidade contínua de reinfecção. A identificação e controle desses hospedeiros selvagens são fatores determinantes para a eficácia das medidas de controle. Schiller et al. (2010) indicaram as limitações de testes de diagnóstico em rebanhos maiores e o aumento dos movimentos de animais e comércio como fatores adicionais que contribuem para a persistência da BTB, e também, os reservatórios de vida selvagem e o comércio como os maiores fatores de reinfecção e disseminação da enfermidade no rebanho em países livres e não livres.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales**. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, p. 266-283, 2001.

ALZAMORA FILHO, F.; VASCONCELLOS, S. E. G.; GOMES, H. M.; CAVALCANTE, M. P.; SUFFYS, P. N.; COSTA, J. N. Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 103-108, fev., 2014.

AMBROSIO, S. R.; OLIVEIRA, E. M. de D.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA NETO, J. S.; AMAKU, M. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 241-244, 2008.

ANAELOM, N. J.; IKECHUKWU, O. J.; SUNDAY, E. W.; NNAEMEKA, U. C. Zoonotic tuberculosis: A review of epidemiology, clinical presentation, prevention and control. **Journal of Public Health and Epidemiology**, v. 2, n. 6, p. 118-124, sep., 2010.

ÁVILA, L. N.; PEREZ, A. M.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; GONÇALVES, V. S. P. Análise de detecção de cluster na caracterização espaço-temporal da tuberculose bovina no Estado da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1313-1318, nov., 2013.

BARAK, S. S. S. The incidence of bovine tuberculosis and its public health hazards in a dairy cattle station in Iraq. **Journal of Veterinary Science**, Al-Anbar, v. 5, n. 2, 2012.

BELCHIOR, A. P. C.; LOPES, L. B.; GONÇALVES, V. S. P.; LEITE, R. C. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, p. 373-378, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 1997.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Brasília-DF, 436p, 2008.

BUHR, B.; McKEEVER, K.; ADACHI, K. Economic Impact of Bovine Tuberculosis on Minnesota's Cattle and Beef Sector. **Michigan Bovine Tuberculosis Bibliography and Database**. 2009. Disponível em: <<http://digitalcommons.unl.edu/michbovinetb/20>>. Acesso em: 16 jan. 2016.

CORNER, L. A. L.; GORMLEY, E.; PFEIFFER, D. U. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 162–171, 2012.

COSTA, A. C. F.; SILVA, N. S.; ROCHA, V. C. M.; RODRIGUEZ, C. A. R.; ESTRELA-LIMA, A.; MOREIRA, E. L. T.; MADRUGA, C.; ARRUDA, S. M.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA, M. C. A.; OLIVEIRA, E. M. de D. Tipificação genética, através da técnica de *spoligotyping*, de isolados de *Mycobacterium bovis* em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 233-237, abr./jun., 2010.

COSTA, L. B. **A tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia**. 2012. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A. T.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; CHRISTIANSEN, K. H.; CLIFTON-HADLEY, R. S.. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 190–210, 2006.

DOMINGO, M.; VIDAL, E.; MARCO, A. Pathology of bovine tuberculosis. **Research in Veterinary Science**, v. 9, p. 520-529, 2014.

EIRIN, M. E.; MACIAS, A.; MAGNANO, G.; MORSELLA, C.; MENDEZ, L.; BLANCO, F. C.; BIANCO, M. V.; SEVERINA, W.; ALITO, A.; PANDO, M. de los A.; SINGH, M.; SPALLEK, R.; PAOLICCHI, F. A.; BIGI, F.; CATALDI, A. A. Identification and evaluation of new *Mycobacterium bovis* antigens in the in vitro interferon gamma release assay for bovine tuberculosis diagnosis. **Tuberculosis**, v. 95, p. 795-801, 2015.

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

FRANÇA, L. R. da; CRUZ, J. F. da; NEVES, V. B. F.; CERQUEIRA, R. B. Prevalência e histopatologia de lesões sugestivas de tuberculose em carcaça de bovinos abatidos no Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 14, n. 4, p. 721-733 out./dez., 2013.

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

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

GEE, R. W. Bovine tuberculosis eradication in Australia. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 5, n. 3, p. 789-794, 1986.

GORMLEY, E.; CORNER, L. A. L.; COSTELLO, E.; RODRIGUEZ-CAMPOS, S. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. **Research in Veterinary Science**, v. 97, p. 30-43, 2014.

GORMLEY, E.; DOYLE, M. B.; FITZSIMONS, T.; MCGILL, K.; COLLINS, J. D. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam1) assay. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 171-179, 2006.

HABARUGIRA, G.; RUKELIBUGA, J.; NANYINGI, M. O.; MUSHONGA, B. Bovine tuberculosis in Rwanda: Prevalence and economic impact evaluation by meat inspection at Société des Abattoirs de Nyabugogo- Nyabugogo Abattoir, Kigali'. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 85, n. 1, p. 1-5, 2014.

HASSANAIN, N. A.; HASSANAIN, M. A.; SOLIMAN, Y. A.; GHAZY, A. A.; GHAZYI, Y. A. Bovine tuberculosis in a dairy cattle farm as a threat to public health. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 8, p. 446-450, aug., 2009.

KRAJEWSKA, M.; LIPIEC, M.; ZABOST, A.; AUGUSTYNOWICZ-KOPEC', E.; SZULOWSKI, K. Bovine Tuberculosis in a Wild Boar (*Sus scrofa*) in Poland. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 4, p. 1001-1002, 2014.

KWAGHE, A. V.; AMEH, A. J.; AMBALI, A. G.; KUDI, A. C.; KACHALLA, M. G. Prevalence and Economic Losses from Bovine Tuberculosis in Maiduguri, Borno State, Nigeria. **International Journal of Life Sciences**, v. 4, n. 4, p. 283-287, 2015.

LIVINGSTONE, P. G.; Hancox, N.; Nugent, G.; Mackereth, G.; SA HUTCHINGS, S. A. Development of the New Zealand strategy for local eradication of tuberculosis from wildlife and livestock. **New Zealand Veterinary Journal**, V. 63, (Supplement 1), p. 98-107, 2015.

LOPES FILHO, P. B. **Perfil epidemiológico da tuberculose bovina no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, 2004 a 2008**. 2010, 41p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Medicina Veterinária. Belo Horizonte - MG, 2010.

MARQUES, M. E. de O.; MAIA JUNIOR, J. F.; ZAPPA, V. Controle da Tuberculose Bovina. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n. 10, jan., 2008.

MATO GROSSO, **Lei nº 10.149 de 11 de julho de 2014**. Dispõe sobre as ações de vigilância para erradicação da tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso. Diário oficial do Estado do Mato Grosso, Cuiabá: 11 jul 2014.

MILLER, R. S.; SWEENEY, S. J. *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) infection in North American wildlife: current status and opportunities for mitigation of risks of further infection in wildlife populations. **Epidemiology and Infection**, v. 141, p. 1357-1370, 2013.

MORE, S. J.; RADUNZ, B.; GLANVILLE, R. J. Lessons learned during the successful eradication of bovine tuberculosis from Australia. **Veterinary Record**, v. 177, n. 9, p. 224-232, 2015.

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

NÉSPOLI, J. M. B. **Situação epidemiológica da tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso**. 2012. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

OIE. Bovine tuberculosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2014.

OLIVEIRA, L. E. D. de; NONATO, I. dos A.; NASCIMENTO, G. A. M. do; NASCIMENTO, A. A. T. do; SERRANO, M. T. L.; CARVALHO, G. D. Tuberculose bovina retraída: Relato de caso. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 5, n. 10, p. 397-405, 2012.

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

PÉREZ-LAGO, L.; NAVARRO, Y.; GARCÍA-DE-VIDEIRA, D. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 97, p. 94-100, 2014.

RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A.; DELLAGOSTINA, O. A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. **Brazilian Journal Biology**, v. 75, n. 4, p. 830-837, 2015.

RIVIÈRE, J.; CARABIN, K.; STRAT, Le Y.; HENDRIKX, P.; DUFOUR, B. Bovine tuberculosis surveillance in cattle and free-ranging wildlife in EU Member States in 2013: A survey-based review. **Veterinary Microbiology**, v. 173, p. 323–331, 2014.

RIVIÈRE, J.; LE STRAT, Y.; Barbara Dufour, Pascal Hendrikx. Sensitivity of Bovine Tuberculosis Surveillance in Wildlife in France: A Scenario Tree Approach. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141884>>. Acesso em: 08 fev. 2016.

ROXO, E. **Tuberculose humana e animal**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://infobibos.com/Artigos/2008_1/tuberculose/index.htm>. Acesso em: 04 set. 2015.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose Bovina: Alternativas para o diagnóstico. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 74, n. 1, p. 55-65, jan./mar., 2007.

SANTOS, E. S. V. dos. **Aplicação de uma mpcr para detecção e identificação de micobactérias diretamente de lesões bovinas suspeitas de tuberculose provenientes de matadouro-frigorífico sob inspeção estadual no estado da**

Bahia, 2014, 131p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, 2014.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H. M.; PALMER, M. V.; HARRIS, B. N.; ORLOSKI, K. A.; BUDDLE, B. M.; THACKER, T. C.; LYASHCHENKO, K. P.; WATERS, W. R. Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 205–220, 2010.

SILVA, M. C. P. **Epidemiologia e fatores de risco da tuberculose bovina no Paraná**, 2012, 82p. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 2012.

SKUCE, R. A.; ALLEN, A. R.; MCDOWELL, S. W. J. Herd-Level Risk Factors for Bovine Tuberculosis: A Literature Review. **Veterinary Medicine International**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

SPOSITTO, F. L. E.; CAMPANERUT, P. A. Z.; GHIRALDI, L. D.; LEITE, C. Q. F.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; SIQUEIRA, V. L. D.; CARDOSO, R. F. Multiplex-PCR for differentiation of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 841-843, 2014.

THOEN, C. O.; LOBUE, A.; ENARSON, D. A.; KANEENE, J. B.; KANTOR, I. N. de. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. **Veterinária Italiana**, v. 45, n. 1, p. 135-181, 2009.

THOEN, C.; LOBUE, P.; KANTOR, I. de. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 339–345, 2006.

TIZARD, I. R. Hipersensibilidade do tipo IV: Hipersensibilidade Retardada. In:_____. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Ed. Roca, 2002. p. 384-392.

UDUAK, A. A Review on Bovine Tuberculosis. **Journal of Veterinary Advances**, v. 5, n. 3, p. 841-847, 2015.

VELOSO, F. P. **Prevalência e fatores de risco da tuberculose bovina no Estado de Santa Catarina**. 2014. 31p. Dissertação (mestrado em saúde animal), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília-DF. 2014.

WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M. C.; CHEGE, G. K.; VICTOR, T. C.; HOAL, E. G.; VAN HELDEN, P. D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 10, n. 7, p. 818-822, 2006.

ARTIGO 1

Este trabalho gerou o artigo científico com título “***Identification of bovine tuberculosis outbreaks from surveillance in inspected slaughterhouses in Bahia, Brazil***”

Submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira
PVB-4797

**Identificação de focos de tuberculose bovina a partir da vigilância em
matadouros-frigoríficos inspecionados na Bahia, Brasil¹**

Márcio Santos Batista^{2*}, Erivelton O. Sousa³, Vitor S.P. Gonçalves⁴, Andrés Perez⁵,
Antonio Francisco S. Filho⁶; José Soares F. Neto⁶, Luciana N. de Ávila² e Robson B.
Cerqueira⁷

ABSTRACT.- Batista, M.S., Sousa, E.O., Gonçalves, V.P., Perez, A., Souza Filho, A.F., Ferreira Neto, J.S., Ávila, L.N & Cerqueira, R.B. 2016. [**Identification of bovine tuberculosis outbreaks from surveillance in inspected slaughterhouses in Bahia, Brazil.**] Identificação de focos de tuberculose bovina a partir da vigilância em matadouros frigoríficos inspecionados na Bahia, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, Avenida Adhemar de Barros, 967, Ondina, Salvador, BA 40170-110, Brazil. E-mail: marcio.batista@adab.ba.gov.br

This study aimed to diagnose bovine tuberculosis by isolation and molecular identification of *Mycobacterium bovis*. From January 2014 to March 2015 were collected fragments suggestive injuries of bovine tuberculosis, by the veterinarian inspector in cattle slaughtered in ten slaughterhouses under State Inspection Service, of the north-central and northeast regions of Bahia. The packaging of the fragments was made in saturated solution of sodium borate and cultivation in the Central Public Health Laboratory professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA). Some of the fragments were

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

²Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, Avenida Adhemar de Barros, 967, Ondina, Salvador, BA 40170-110, Brasil. *Autor para correspondência: marcio.batista@adab.ba.gov.br

³Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz, Setor de Micobacteriologia, Salvador, Bahia, Brasil.

⁴Faculdade de Agronomia e Veterinária (FAV), Universidade de Brasília (UNB), Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, ICC Sul 4508, Brasília, DF 70910- 970, Brasil.

⁵Department of Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, USA.

⁶Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁷Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

macerated and decontaminated by the modified Petroff method, inoculated in the middle Stonebrink-Leslie and Lowenstein Jensen and incubated for a maximum period of 90 days at 37 ° C, and the isolates were identified using the MPT64 test, p-nitrobenzoic acid and molecular diagnostics. From cultured fragments, 18% (7/38) were positive and belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex, representing five infected animals. The molecular identification of isolates confirmed 100% (5/5) of infected cattle with *Mycobacterium bovis* and revealed focus properties on the municipalities of Amargosa, Jeremoabo, Pedro Alexandre, Serrinha and Terra Nova. This result gives 17% of positive samples taken from 30 animals with presumptive lesions of bovine tuberculosis, selected from a universe of 562,910 cattle inspected in slaughterhouses in question. Bacteriological and molecular diagnosis confirmed the presence of *Mycobacterium bovis* in cattle slaughtered, presumably free of bovine tuberculosis, in slaughterhouses in Bahia and allowed the identification of outbreaks of the disease.

INDEX TERMS: Bacteriological diagnosis, *Mycobacterium bovis*, PCR, Zoonosis

RESUMO: Esse trabalho objetivou diagnosticar a tuberculose bovina pelo isolamento e identificação molecular de *Mycobacterium bovis*. No período de janeiro de 2014 a março de 2015 foram colhidos fragmentos de lesões sugestivas de tuberculose bovina, pelo inspetor Médico Veterinário, em bovinos abatidos em dez matadouros-frigoríficos sob Serviço de Inspeção Estadual, das regiões centro-norte e nordeste da Bahia. O acondicionamento dos fragmentos foi feito em solução saturada de borato de sódio e o cultivo no Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA). Partes dos fragmentos foram macerados e descontaminados pelo método de Petroff modificado, inoculados no meio Stonebrink-Leslie e Lowenstein Jensen, incubados por um período máximo de 90 dias a 37°C e, os isolados, foram identificados utilizando-se do teste MPT64, ácido p-nitrobenzóico e do diagnóstico molecular. Dos fragmentos cultivados, 18% (7/38) foram positivos e pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, representando cinco animais infectados. A identificação molecular dos isolados confirmou 100% (5/5) dos bovinos infectados com *Mycobacterium bovis* e revelou propriedades foco nos municípios de Amargosa, Jeremoabo, Pedro Alexandre,

Serrinha e Terra Nova. Esse resultado confere 17% de positividade das amostras colhidas de 30 animais com lesões presuntivas de tuberculose bovina, selecionados de um universo de 562.910 bovinos inspecionados nos matadouros-frigoríficos em questão. O diagnóstico bacteriológico e molecular confirmaram a presença de *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos, presumidamente livres da tuberculose bovina, em matadouros-frigoríficos na Bahia e permitiram a identificação de focos da doença.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Diagnóstico bacteriológico, *Mycobacterium bovis*, PCR, Zoonose

INTRODUÇÃO

A tuberculose bovina (BTB) é uma enfermidade zoonótica e de caráter crônico, causada por *Mycobacterium bovis*, o qual faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Acomete principalmente os bovinos e bubalinos, além de outros animais domésticos e silvestres. É caracterizada pela formação de granulomas nodulares em órgãos ou tecidos, principalmente no trato respiratório e seus linfonodos (ACHA & SZYFRES 2001, BRASIL 2006).

Os impactos socioeconômicos causados pela BTB descritos por diversos autores são representados pela infecção dos seres humanos em decorrência da ingestão de alimento contaminado, principalmente o leite não pasteurizado; e pelos prejuízos causados com morte de animais, redução da produção de leite e carne e condenação de carcaças no matadouro-frigorífico (BRASIL 2006, THOEN et al. 2006, ANAELOM et al. 2010, BELCHIOR et al. 2016).

Na busca de novos casos de BTB, o diagnóstico por métodos de tuberculinização normalmente utilizados na rotina de campo nos rebanhos são complementados por métodos diretos de acordo com a recomendação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) para a vigilância em matadouro-frigorífico e identificação de fontes de infecção da enfermidade na rotina de inspeção sanitária das carcaças dos bovinos abatidos (BRASIL 2006). O diagnóstico definitivo da BTB pelo isolamento e identificação do agente etiológico em material biológico por métodos bacteriológicos é considerado o padrão-ouro das técnicas (BRASIL 2008). Aliado a isso, a biologia molecular com a reação em cadeia da

polimerase (PCR) se revela como alternativa para a identificação das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, favorecendo o tratamento de pessoas com tuberculose resistente e na otimização da detecção de *M. bovis* em amostras biológicas (RUGGIERO et al. 2007, PÉREZ-LAGO et al. 2014).

Os prejuízos socioeconômicos em decorrência da BTB impulsionam a uma investigação constante na tentativa de minimizar os seus efeitos negativos. O presente estudo objetivou diagnosticar a BTB a partir do isolamento e identificação molecular de *Mycobacterium bovis* de lesões sugestivas da enfermidade identificadas na inspeção *post mortem* dos bovinos abatidos e identificar focos da enfermidade pelo rastreamento dos rebanhos de origem dos bovinos infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 10 matadouros-frigoríficos sob serviço de inspeção estadual localizados nos circuitos pecuários três e quatro (Anexos 1 e 2), representados pelas regiões centro-norte e nordeste da Bahia, utilizados no inquérito epidemiológico da doença que ocorreu de outubro de 2008 a novembro de 2010 (Figura 1).

De janeiro de 2014 a março de 2015, foram colhidos fragmentos de lesões sugestivas de BTB pelo inspetor médico veterinário na inspeção sanitária de rotina. Os fragmentos foram acondicionados em tubos tipo falcon de 50mL contendo solução saturada de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (ALZAMORA FILHO et al., 2014), armazenados em temperatura ambiente e encaminhados para o Laboratório de Sanidade Animal (LADESA) da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) para registro e, posteriormente, encaminhados para o Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA) para cultivo de *M. bovis*.

Os fragmentos foram triturados e processados pela técnica de Petroff modificado (BRASIL 2008, AMBRÓSIO et al. 2008). Parte do sedimento gerado foi utilizado para a microscopia pela técnica de Ziehl-Neelsen para a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistente (BAAR) e outra parte inoculada nos meios Stonebrink-Leslie e Lowenstein Jensen e, por fim, incubados em estufa bacteriológica a 37°C por até 90 dias, com leituras semanais. Os isolados foram acondicionados em criotubos contendo meio líquido 7H9 - Middlebrook com 10% de glicerol como conservante e congelados a -20°C e,

posteriormente, utilizados para a identificação fenotípica e para a extração do DNA para identificação molecular.

A identificação fenotípica dos isolados foi realizada por repique em meios Lowenstein Jensen contendo ácido p-nitrobenzóico (PNB) e testados no MPT64. A identificação molecular foi realizada no Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). A extração do DNA genômico foi realizada por termólise. Para a identificação dos membros do complexo *M. tuberculosis* foi feito a PCR pelo protocolo TB *multiplex* (WILTON & COUSINS 1992) com os *primers* MYCGEN-F e MYCGEN-R referentes ao gênero *Mycobacterium*; TB-1F e TB-1R referentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*; MYCAV-R referente ao *Mycobacterium avium*; e MYCINT-F referente ao *Mycobacterium intracellulare*. O produto de amplificação de 1030 pb identificam o gênero *Mycobacterium* e fragmentos menores de 850, 372 e 180 pb confirmam a presença de *M. intracellulare*, complexo *M. tuberculosis* e *M. avium*, respectivamente. Para diferenciar os membros do complexo *M. tuberculosis* foi utilizado o método de RD *Multiplex* PCR (WARREN et al. 2006) com os *primers* RD4-1, RD4-2 e RD4-3. As espécies *M. canettii*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. caprae* apresentam amplificado de 172 pb e as espécies *M. bovis* e *M. bovis* BCG amplificado de 268 pb.

As informações básicas do gado abatido foram obtidas a partir do documento sanitário obrigatório - Guia de Trânsito Animal (GTA) - e das requisições para o diagnóstico de isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* (Anexos 3 e 4) e utilizou-se uma planilha do Software Microsoft Office Excel® 2007 para a organização dos dados, tais como: o número de ordem das amostras, identificação, município de origem, matadouro-frigorífico de destino, tipo de amostra, quantidade amostra por animal, sexo, idade, data de colheita, de entrada no LACEN-BA e de cultivo. Foi utilizada a estatística descritiva simples (univariada) na avaliação dos dados apurados.

RESULTADOS

O abate de 562.910 bovinos, sadios ao exame *ante mortem* e sem restrições sanitárias, gerou 30 animais com lesão sugestiva para a BTB durante o exame *post mortem* de rotina da carcaça na linha de inspeção oriundos de cinco matadouros. Os bovinos amostrados foram originados de 21 municípios: Água Fria, Amargosa, Araci, Castro

Alves, Conceição do Almeida, Dom Macedo Costa, Feira de Santana, Itamari, Jeremoabo, Medeiros Neto, Muniz Ferreira, Novo Triunfo, Pedro Alexandre, Queimadas, Santa Luzia, Santo Antonio de Jesus, São Miguel das Matas, Serrinha, Terra Nova, Ubaíra e Varzedo.

Dos 30 bovinos amostrados gerou-se 38 fragmentos de diferentes órgãos, sendo que, dos animais que foram colhidos mais de um fragmento de tecido foi considerado como uma única amostra. A caracterização por sexo e idade dos animais com lesões demonstrou 60% (18/30) para as fêmeas enquanto os machos ficaram com 40% (12/30); a faixa etária mais acometida foi a de mais de 36 meses de idade com 53% (16/30) seguida pela de 25-36 meses com 43% (13/30) dos bovinos amostrados.

As lesões estavam distribuídas em linfonodos e órgãos da região da cabeça e pescoço, cavidades torácica e abdominal, bem como na carcaça bovina (Tabela 1).

À pré-cultura, a microscopia dos esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen demonstrou a partir das 38 análises que em 39% (15/38) foi observada a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), com uma positividade ao cultivo de 33% (5/15) em um tempo médio entre a colheita e o cultivo de 35 dias, e ausência de crescimento em 67% (10/15) num tempo médio de 54 dias. Nas análises sem observação de BAAR, 61% (23/38), em 9% (2/23) houve crescimento bacteriano num tempo médio de 31 dias, enquanto que em 91% (21/23) não apresentou formação de colônias num tempo médio de 53 dias entre a colheita e cultivo.

Houve crescimento em 18% (7/38) dos fragmentos cultivados no meio Stonebrink-Leslie, representando cinco animais amostrados. Esse resultado confere 17% (5/30) de positividade das amostras colhidas dos 30 animais. Os isolados foram caracterizados por colônias de coloração creme-amareladas, pequenas, arredondadas, com bordas irregulares, e ao teste com MPT64 e sensibilidade ao ácido p-nitrobenzóico foram identificados como pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 2). O tempo máximo de observação do crescimento das colônias foi 45 a 70 dias com uma média de 57 dias de acompanhamento sendo que os cultivos negativos foram observados até 90 dias. Não houve crescimento bacteriano no meio Lowenstein Jensen das amostras cultivadas com o intuito de isolar outras espécies de micobactérias.

A identificação molecular dos isolados resultou em 100% (5/5) positivo para *Mycobacterium bovis*. O produto de amplificação de 268 pb representa o *Mycobacterium bovis* e o de 172 pb os outros membros do complexo *M. tuberculosis* (*M. canettii*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. caprae*) (Figura 3).

Os cinco bovinos infectados foram originários de rebanhos de propriedades rurais pertencentes aos municípios de Amargosa, Jeremoabo, Pedro Alexandre, Serrinha e Terra Nova (Figura 4).

DISCUSSÃO

Dos matadouros-frigoríficos selecionados para o acompanhamento do abate houve colheita de amostras em apenas cinco deles. Esse fato reflete situação similar ocorrida com Perez et al. (2002) que sugeriram que a detecção de lesões em carcaças difere em decorrência da experiência do inspetor e do seu tempo disponível para exame, variando assim a colheita de amostras entre os matadouros-frigoríficos. Os 562.910 bovinos abatidos, presumidamente negativos para a tuberculose bovina, representaram 49,7% do total abatido no Estado (1.133.497 cabeças) nos estabelecimentos sob serviço de inspeção estadual (ADAB 2015).

A maior ocorrência de lesões sugestivas de BTB em fêmeas e em animais com faixa etária acima dos 36 meses de idade também foi constatada em estudo de Okeke et al. (2014) que observaram que a maioria dos bovinos abatidos estava acima de 60 meses (50,6%) e com um percentual de fêmeas em 64,3% na Nigéria. Nesse contexto, Damina et al. (2011) identificaram mais fêmeas abatidas e com lesões tuberculosas no período de estudo, sugerindo ser devido aos animais de descarte e com idade avançada para a reprodução. Esse fato deve-se a natureza crônica da doença e a possibilidade de aumento da frequência da infecção com a idade.

A localização das lesões sugestivas de tuberculose bovina estava distribuída, principalmente, nos linfonodos das cavidades torácica e abdominal e pulmões. Esse comportamento também foi observado por diversos autores, tais como: Atiadeve et al. (2014) que em trabalho com 2886 animais amostrados num período de 5 meses, observaram 145 animais com lesões em linfonodo pré-escapular e pulmões em estudo em Gana; Gathogo et al. (2012) encontraram lesões em sua maioria linfonodos bronquiais e mediastinais, e no parênquima pulmonar em bovinos no Quênia; Damina et al. (2011) e Sa'idu et al. (2015) identificaram, em sua maioria, nos pulmões e, em seguida, nos nódulos linfáticos em estudos na Nigéria; Alzamora Filho et al. (2014) acompanharam o abate de 825.394 bovinos na Bahia e encontraram 180 lesões

distribuídas nos linfonodos da cabeça e do pescoço, assim como nos pulmões e nos linfonodos torácicos, do fígado e do peritônio. A frequente presença das lesões nos pulmões ratifica o trato respiratório como uma das principais portas de entrada do agente (ACHA & SZYFRES 2001).

O tempo médio em torno de 30 dias, observado nesse estudo, com melhor percentual de crescimento bacteriano entre a colheita e o cultivo das amostras, reflete o encontrado por Morato (2011) que recomendou um tempo máximo de 30 dias como o melhor para a conservação de fragmentos de lesão na solução saturada de borato de sódio a uma temperatura entre 27°C e 37°C e observou a redução de formação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) entre 30 e 60 dias de conservação.

O crescimento bacteriano se deu apenas no meio Stonebrink-Leslie, o que foi observado também por Furlanetto et al. (2012) quando não obtiveram colônias no meio Lowenstein Jensen de outras micobactérias no estudo no qual avaliou 198 lesões granulomatosas de linfonodos com três amostras positivas. Os isolados provenientes dos 30 bovinos amostrados representaram cinco animais infectados, 17% (5/30) de positividade em relação ao crescimento, sendo 100% (5/5) identificados como *Mycobacterium bovis* pelo PCR *multiplex*. Alzamora Filho et al. (2014) em estudo semelhante identificaram o agente em 56% (14/25) dos isolados utilizando a mesma técnica diagnóstica. Com resultados mais expressivos, Gathogo et al. (2012) isolaram micobactérias de 36,4% das amostras, entretanto apenas 32,8% se referem a *M. bovis* e Sahraoui et al. (2009) obtiveram êxito de crescimento em 51,5% (134/260) com parcela de 87% para *M. bovis*. Giampaglia et al. (2007), em estudo com o ácido p-nitrobenzóico incorporado ao meio de cultura, confirmaram a sensibilidade das micobactérias do complexo *M. tuberculosis* a essa substância, ratificando a sua utilidade na classificação dos achados dentro desse complexo.

A identificação de *M. bovis* ratifica a existência de propriedades foco de tuberculose bovina no estado da Bahia. O rastreamento da origem dos bovinos infectados a partir do documento sanitário obrigatório (GTA) permitiu identificar que os animais egressaram de propriedades rurais e seus respectivos rebanhos dos municípios de Amargosa, Jeremoabo, Pedro Alexandre, Serrinha e Terra Nova, pertencentes ao circuito três e de menor prevalência (0,3%), exceto Amargosa que é pertencente ao circuito um com prevalência de 2% (ÁVILA et al. 2013).

Essas propriedades foco apresentaram um quantitativo de rebanhos entre 18 e 738 cabeças, adquiriram animais normalmente de outras propriedades rurais intra e ou intermunicipal e comercializavam para dentro e fora do Estado, caracterizando potencial risco para a disseminação da BTB segundo diversos relatos (ADAB 2016). Em estudo sobre os fatores de risco dos rebanhos para a BTB, Skuce et al. (2012) afirmaram que a movimentação dos animais, a ocorrência da enfermidade na propriedade e em áreas vizinhas, quantidade de animais, entrada de animais oriundos de rebanhos com histórico de BTB são fatores frequentemente identificados. Nesse contexto, Gates et al. (2013) indicaram testar o volume de gado importado de regiões endêmicas e investigar os riscos associados às deslocções de bovinos de rebanhos com diferentes classificações de risco de BTB, visto que a fonte mais provável de infecções na Escócia tenha sido de importações de gado de regiões endêmicas, além de evidências da transmissão dentro de fazendas de gado escocesas a fim de investigar a entrada da doença.

É de extrema importância uma maior atenção à movimentação dos animais, visto que o trânsito de animais representa um importante fator na disseminação de doenças, assim a movimentação de gado de áreas com BTB representa um potencial fator crítico (GILBERT et al. 2005). Sa'idu et al. (2015) relataram que o fluxo livre entre estados vizinhos com uma taxa prevalente maiores de BTB, de gado possivelmente infectado, poderia ser uma razão pela alta prevalência no estudo, aliado a alta taxa de densidade e diferentes origens e, também, o aumento da utilização do sistema intensivo no qual rebanhos são mantidos juntos por longos períodos podem ser considerados possíveis fatores de risco para disseminação da doença no Estado.

Dessa forma, a observância e controle dos pontos críticos da BTB são fatores primordiais para a redução da disseminação da enfermidade, como os citados por Humblet et al. (2009) que identificaram em países em desenvolvimento uma reduzida interação com serviço veterinário, falta de controle na movimentação de animais, contato entre animais de diferentes rebanhos, falta de vigilância em matadouros e outras espécies animais domésticas e selvagens. Gilbert et al. (2005) sugeriram a combinação do controle de movimento do gado, a identificação da tipagem de *M. bovis* e o conhecimento da fauna local como base na investigação da BTB em área com presença ou ausência da enfermidade.

Ficou evidenciada como limitação nesse estudo a operacionalização da colheita, transporte e processamento das amostras, visto que as amostras negativas foram analisadas em um tempo médio de 53 dias, superior ao tempo recomendado de 30 dias, o que pode ter contribuído para um maior percentual de negatividade.

CONCLUSÕES

A vigilância em matadouro-frigorífico proporcionou a identificação de propriedades com foco da tuberculose bovina a partir do cultivo de lesões macroscópicas sugestivas para a enfermidade.

As informações do documento sanitário permitiu rastrear as propriedades foco dos bovinos infectados.

O cultivo e identificação molecular dos isolados a partir de lesões sugestivas de tuberculose bovina permitiu identificar o *Mycobacterium bovis*.

Agradecimentos. À *Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz (LACEN-BA) e Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP) por proporcionar a logística de colheita das amostras, o cultivo dos fragmentos das lesões e a identificação molecular dos isolados realizados nesse estudo.*

REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.& SZYFRES, B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 266-283.

AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DA BAHIA - ADAB. 2015. Relatório semestral da campanha de erradicação da Febre Aftosa.

AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DA BAHIA - ADAB. 2016. Sistema de Integração Agropecuária - SIAPEC.

ALZAMORA FILHO, F.; REIS, V.M.; FEHLBERG, I.; ALCÂNTARA, A.C. de; CAVALCANTE, M.P.; ROCHA, V.C.F. & COSTA, J.N. 2014. Identificação de *Mycobacterium bovis* em

- carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(5):1585-1591.
- AMBROSIO, S.R.; OLIVEIRA, E.M. de D.; RODRIGUEZ, C.A.R.; FERREIRA NETO, J. S. & AMAKU, M. 2008. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:241-244.
- ANAELOM, N.J.; IKECHUKWU, O.J.; SUNDAY, E.W. & NNAEMEKA, U.C. 2010. Zoonotic tuberculosis: A review of epidemiology, clinical presentation, prevention and control. *Journal of Public Health and Epidemiology*. 2(6):118-124.
- ATIADAVE, S.K.; GYAMFI, O.K.; MAK-MENSAH, E.; GALYUON, I.K.A.; OWUSU, D.; BONSU, F.A.; BEDZRA, K.D. & GYASI, R.K. 2014. Slaughter surveillance for tuberculosis among cattle in three metropolitan abattoirs in Ghana. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. 6(7):198-207.
- ÁVILA, L.N.; PEREZ, A.M.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F.; TELLES, E.O; DIAS, R.A.; AMAKU, M. & GONÇALVES, V.S.P. 2013. Análise de detecção de cluster na caracterização espaço-temporal da tuberculose bovina no Estado da Bahia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(11):1313-1318.
- BELCHIOR, A.P.C.; LOPES, L.B.; GONÇALVES, V.S.P. & LEITE, R.C. 2016. Prevalence and risk factors for bovine tuberculosis in Minas Gerais State, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 48:373-378.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT. 188p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2008. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. 436p.
- DAMINA, M.S.; OWOLUDUN, O.A.; CHUKWUKERE, S.; AMEH, J.A. & ALIYU, M.M. 2011. The use of Deletion Analysis in the Detection of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium africanum* among Slaughtered Cattle in Plateau State, North Central Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*. 32(1):9-15.
- FURLANETTO, L.V.; FIGUEIREDO, E.E.S.; CONTE JUNIOR, C.A.; CARVALHO, R.C.T.; SILVA, F.G.S.; SILVA, J.T.; LILINBAUM, W. & PASCHOALIN, V.M.F. 2012. Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(11):1138-1144.
- GATES, M C.; VOLKOVA, V.V. & WOOLHOUSE, M.E.J. 2013. Risk factors for bovine tuberculosis in low incidence regions related to the movements of cattle. *BMC Veterinary Research*. 9(225):1746-1762.

- GATHOGO, S.M.; KURIA, J.K.N. & OMBUI, J.N. 2012. Prevalence of bovine tuberculosis in slaughter cattle in Kenya: a postmortem, microbiological and DNA molecular study. *Tropical Animal Health and Production*. 44(7):1739-1744.
- GIAMPAGLIA, C.M.S.; MARTINS, M.C.; CHIMARA, E.; OLIVEIRA, R.S.; VIEIRA, G.B. de O.; MARSICO, A.G.; MELLO, F.C.Q.; FONSECA, L. de S.; KRITSKI, A. & TELLES, M. A. da S. 2007. Diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* e outras Micobactérias com ácido p-nitrobenzóico utilizando o sistema MGIT960. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 11(7):803–807.
- GILBERT, M.; MITCHELL, A.; BOURN, D.; MAWDSLEY, J.; CLIFTON-HADLEY, R. & WINT, W. 2005. Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain. *Nature*. 435(26):491-496.
- HUMBLET, M.F.; BOSCHIROLI, M.L. & SAEGERMAN, C. 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Veterinary Research*. 40(5).
- MORATO, F. Avaliação do borato de sódio como conservante de amostra de tecido com lesão tuberculosa. 2011. 56p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2011.
- OKEKE, L.A.; CADMUS S.; OKEKE, I.O.; MUHAMMAD, M.; AWOLOH, O.; DAIRO, D., WAZIRI, E.N.; OLAYINKA, A.; NGUKU, P.M. & FAWOLE, O. 2014. Prevalence and risk factors of *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in slaughtered cattle at Jos South Abattoir, Plateau State, Nigeria. *Pan African Medical Journal*. 18(7):1-5.
- PEREZ, A.M.; WARD, M.P.; TORRES, P. & RITACCO, V. 2002. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*. 56:63-74.
- PÉREZ-LAGO, L.; NAVARRO, Y. & GARCÍA-DE-VIDEIRA, D. 2014. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. *Research in Veterinary Science*. 97:94-100.
- RUGGIERO, A.P.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A. & ROXO, E. 2007. Tuberculose Bovina: Alternativas para o diagnóstico. *Arquivo do Instituto Biológico*. 74(1):55-65.
- SA'IDU, A.S.; OKOLOCHA, E.C.; DZIKWI, A.A.; KWAGA, J.K.P.; GAMAWA, A.A.; USMAN, A.; MAIGARI, S A. & IBRAHIM, S. 2015. Detection of *Mycobacterium bovis* in Organs of Slaughtered Cattle by DNA-Based Polymerase Chain Reaction and Ziehl-Neelsen Techniques in Bauchi State, Nigeria. *Journal of Veterinary Medicine*. 2015:7 pages.
- SAHRAOUI, N.; MÜLLER, B.; GUETARNI, D.; BOULAHBAL, F.; YALA, D.; OUZROUT, R.; BERG, S.; SMITH, N.H. & ZINSSTAG, J. 2009. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Veterinary Research*. 5(4).

SKUCE, R.A.; ALLEN, A.R. & MCDOWELL, S.W.J. 2012. Herd-Level Risk Factors for Bovine Tuberculosis: A Literature Review. *Veterinary Medicine International*. 2012:1-10.

THOEN, C.; LOBUE, P. & KANTOR, I. de. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology*. 112:339-345.

WARREN, R.M.; GEY VAN PITTIUS, N.C.; BARNARD, M.; HESSELING, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M.C.; CHEGE, G.K.; VICTOR, T.C.; HOAL, E.G. & VAN HELDEN, P.D. 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 10(7):818-822.

WILTON, S. & COUSINS, D. 1992. Detection and Identification of Multiple Mycobacterial Pathogens by DNA Amplification in a Single Tube. *Genome Research*. 1:269-273.

Legenda da Tabela

Tabela 1. Distribuição das lesões sugestivas de tuberculose bovina nos animais abatidos no período de estudo, 2014/2015, na Bahia.

Legenda das Figuras

Figura 1. Divisão do mapa da Bahia em circuitos pecuários.

Figura 2. Isolados do cultivo.

Figura 3. Produto de amplificação da diferenciação membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* por RD m-PCR de isolados de cultivo bacteriano. **M**, marcador de peso molecular 100bp; **H3**, controle positivo *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; **A5**, controle positivo *Mycobacterium bovis* AN5; **1, 2, 3, 4, 5** amostras positivas para *Mycobacterium bovis*; **C-**, controle negativo (água).

Figura 4. Municípios da Bahia com propriedade foco de tuberculose bovina no período do estudo - 2014/2015

Tabela 1. Distribuição das lesões sugestivas de tuberculose bovina nos animais abatidos no período de estudo, 2014/2015, na Bahia

Localização	Lesão sugestiva					
	Quantidade	%	POS	%	NEG	%
Cabeça e pescoço	6	15,8	0	0	6	19,4
Cavidade torácica e abdominal	29	76,3	6	85,7	23	74,2
Carcaça	1	2,6	1	14,3	0	0
Sem informação	2	5,3	0	0	2	6,5
TOTAL	38	100,0	7	100,0	31	100,0



Figura 1. Divisão do mapa da Bahia em circuitos pecuários



Figura 2. Isolados do cultivo
Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 3. Produto de amplificação da diferenciação membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* por RD m-PCR de isolados de cultivo bacteriano. **M**, marcador de peso molecular 100bp; **H3**, controle positivo *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; **A5**, controle positivo *Mycobacterium bovis* AN5; **1, 2, 3, 4, 5** amostras positivas para *Mycobacterium bovis*; **C-**, controle negativo (água)

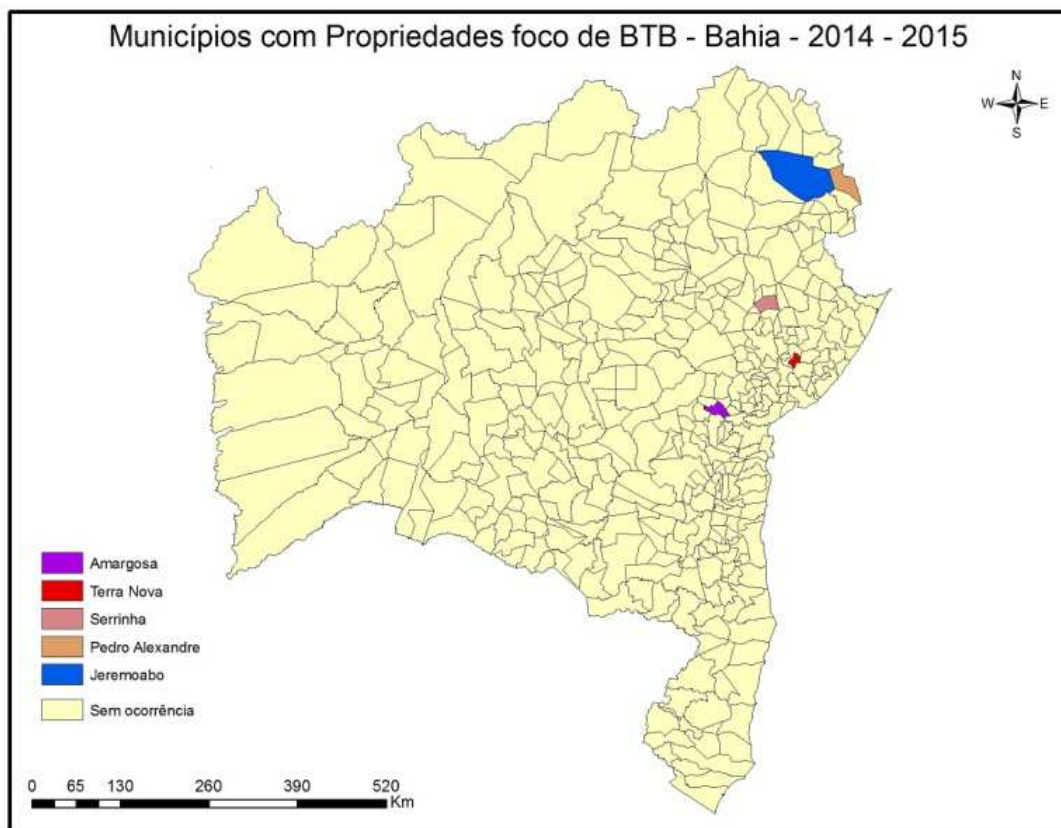


Figura 4. Municípios da Bahia com propriedade foco de tuberculose bovina no período do estudo - 2014/2015

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização das técnicas de cultivo bacteriológico de lesões sugestivas de tuberculose bovina e identificação molecular dos isolados foram eficientes para a vigilância dessa enfermidade em matadouros-frigoríficos inspecionados, confirmando a presença de *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos, presumidamente livres de tuberculose, no Estado.

O tempo entre a colheita da amostra e o processamento em laboratório acima do esperado de 30 dias pode ter contribuído para um menor percentual de positividade dos fragmentos de lesões sugestivas cultivados.

Com os resultados apresentados nesse estudo pode-se propor um plano de vigilância ativa em matadouros-frigoríficos sob serviço de inspeção em busca de focos de tuberculose no estado da Bahia.

ANEXOS

ANEXO 1

Municípios do Circuito Pecuário 3

COREG	Municípios	Rebanho bovino
Paulo Afonso	Abaré	6483
	Chorrocho	4771
	Coronel João Sá	29393
	Glória	4994
	Jeremoabo	52119
	Macurure	3098
	Novo Triunfo	5774
	Paulo Afonso	18331
	Pedro Alexandre	32330
	Rodelas	1053
	Santa Brígida	20639
Sítio do Quinto	18471	
Subtotal		197456
Ribeira do Pombal	Acajutiba	10883
	Adustina	12190
	Água Fria	8720
	Alagoinhas	21229
	Antas	19819
	Aporá	21449
	Araçás	5982
	Araci	19592
	Aramari	6173
	Banzae	13069
	Barrocas	5641
	Biritinga	13730
	Cardeal da Silva	5526
	Catu	18814
	Cícero Dantas	30063
	Cipó	7071
	Conceição do Coité	22825
	Conde	18740
	Crisópolis	23044
	Entre Rios	26375
	Esplanada	18929
	Euclides da Cunha	40746
	Fátima	13727
Heliópolis	18881	
Inhambupe	28404	
Itanagra	6486	

Itapicuru	21372	
Jandaira	13082	
Lamarão	6054	
Monte Santo	22967	
Nova Soure	17369	
Olindina	19882	
Ouriçangas	6826	
Paripiranga	18074	
Pedrao	8024	
Pojuca	7442	
Quijingue	21712	
Retirolândia	4788	
Ribeira do Amparo	13674	
Ribeira do Pombal	46247	
Rio Real	30973	
Santa Luz	29874	
São Domingos	6870	
Sátiro Dias	11487	
Serrinha	17214	
Teofilândia	10129	
Tucano	30398	
Valente	6159	
<hr/>		
Subtotal	808725	
<hr/>		
Feira de Santana	Amélia Rodrigues	7734
	Anguera	7130
	Antonio Cardoso	13377
	Aratuípe	4495
	Baixa Grande	32503
	Cabaceiras do	
	Paraguaçu	5125
	Cachoeira	10454
	Candeal	15708
	Capela do Alto Alegre	24748
	Castro Alves	31512
	Conceição da Feira	6281
	Conceição do Almeida	24522
	Conceição do Jacuípe	10679
	Coração de Maria	18932
	Cruz das Almas	6530
	Dom Macedo Costa	9983
	Elísio Medrado	10056
	Feira de Santana	50750
	Gavião	12456
	Governador Mangabeira	2709
	Ichu	4024
	Ipecaeta	10896

Ipirá	94725
Irará	8432
Itaparica	238
Itatim	11047
Jaguaripe	8684
Madre de Deus	0
Maragogipe	8143
Muniz Ferreira	6982
Muritiba	4948
Nazaré	8379
Nova Fátima	12497
Pé de Serra	27907
Pintadas	27650
Rafael Jambeiro	33053
Riachão do Jacuípe	42333
Salinas da Margarida	105
Santa Bárbara	11485
Santanópolis	6868
Santa Terezinha	15690
Santo Amaro	19293
Santo Antonio de Jesus	15508
Santo Estevão	11196
São Felipe	17365
São Félix	4153
São Francisco do Conde	7077
São Gonçalo dos Campos	13338
Sapeaçu	6307
Saubara	560
Serra Preta	30685
Tanquinho	7365
Teodoro Sampaio	14220
Terra Nova	14656
Varzedo	10829
Vera Cruz	434
Subtotal	822756
Sede	
Camaçari	2029
Candeias	9228
Dias D'Avila	639
Lauro de Freitas	267
Mata de São João	14784
Salvador	460
São Sebastião do Passé	35432
Simões Filho	2351
Subtotal	65190
Total	1894127

ANEXO 2

Municípios do Circuito Pecuário 4

COREG	Municípios	Rebanho bovino
Itaberaba	Andaraí	13465
	Boa Vista do Tupim	45305
	Boninal	11402
	Bonito	5504
	Iaçú	40697
	Ibiquera	14188
	Ibitiara	18646
	Iraquara	8217
	Itaberaba	51889
	Itaete	15372
	Lajedinho	13025
	Lençóis	4555
	Macajuba	17131
	Marcionílio Souza	35310
	Mucugê	7027
	Nova Redenção	9650
	Novo Horizonte	9040
	Palmeiras	3157
	Ruy Barbosa	36974
	Seabra	15400
Souto Soares	4572	
Utinga	16286	
Wagner	3536	
Subtotal		400348
Irecê	América Dourada	9148
	Barra do Mendes	9601
	Barro Alto	6114
	Canarana	10175
	Central	6293
	Gentio do Ouro	5882
	Ibipeba	9787
	Ibitita	8279
	Irecê	10359
	Itaguaçu da Bahia	16775
	João Dourado	15830
	Jussara	10071
	Lapão	9272
	Presidente Dutra	3349
	São Gabriel	5906
	Uibai	3507
Xiquexique	25048	

<hr/>	
Subtotal	165396
<hr/>	
Miguel	
Calmon	
Caem	16693
Cafarnaum	6533
Caldeirão Grande	11098
Capim Grosso	18304
Jacobina	43209
Mairi	29209
Miguel Calmon	32040
Mirangaba	17242
Morro do Chapéu	33987
Mulungu do Morro	3214
Mundo Novo	40197
Ourolândia	15607
Piritiba	25314
Quixabeira	7461
São José do Jacuípe	13450
Saúde	9586
Serrolândia	10608
Tapiramutá	22333
Umburanas	6123
Várzea da Roça	15959
Várzea do Poço	8134
Várzea Nova	9089
<hr/>	
Subtotal	395390
<hr/>	
Total	961134
<hr/>	

