



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Silvia Cristina da Silva Pedroso

**Caracterização histopatológica, imunohistoquímica e determinação molecular de
Mycobacterium bovis de lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos para
consumo no Estado do Amapá**

Belém
2016

Silvia Cristina da Silva Pedroso

Caracterização histopatológica, imunohistoquímica e determinação molecular de *Mycobacterium bovis* de lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos para consumo no Estado do Amapá

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

Co-orientadora: Dra. Karla Valéria Batista Lima

**Belém
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Pedroso, Silvia Cristina da Silva, 1981-
Caracterização histopatológica, imunohistoquímica e
determinação molecular de *Mycobacterium bovis* de lesões
sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos para
consumo no estado do Amapá / Silvia Cristina da Silva
Pedroso. - 2016.

Orientador: Washington Luiz Assunção
Pereira;

Coorientadora: Karla Valéria Batista Lima.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Pará, Campus de Castanhal, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2016.

1. Búfalo -- Doenças -- Amapá. 2.
Tuberculose em animais -- Amapá. 3.
Mycobacterium bovis. I. Título.

CDD 22. ed. 636.293098116

Silvia Cristina da Silva Pedroso

Caracterização histopatológica, imunohistoquímica e determinação molecular de *Mycobacterium bovis* de lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos para consumo no Estado do Amapá

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

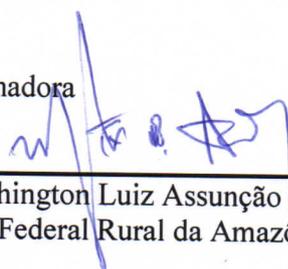
Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

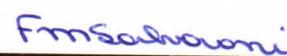
Co-orientadora: Dra. Karla Valéria Batista Lima

Data da aprovação. Belém - PA: 26 / 02 / 2016

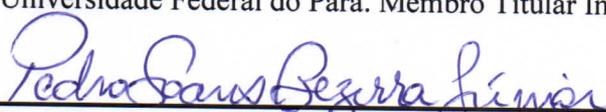
Banca Examinadora



Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira
Universidade Federal Rural da Amazônia
Orientador



Prof. Dr. Felipe Masiero Salvarani
Universidade Federal do Pará. Membro Titular Interno



Prof. Dr. Pedro Soares Bezerra Júnior
Universidade Federal do Pará. Membro Titular Externo



Profa. Dra. Carina Martins de Moraes
Universidade Federal do Pará. Membro Titular Externo



Prof. Dr. Sandro Patroca da Silva
Instituto Evandro Chagas. Membro Titular Externo

Dedico esta tese especialmente a minha família construída na base do amor e respeito: ao meu esposo Dennis e nosso amado Gabriel! Meu amor, serei sempre grata pelo apoio, dedicação e incentivo, muitas vezes se privando para que eu pudesse dar continuidade aos meus sonhos, e principalmente ajudando a me levantar e me tranquilizando nas horas mais difíceis. Você e nosso filho são meu porto seguro! Dedico também aos meus familiares (mãe e irmãos), que apesar de todas as dificuldades já enfrentadas na vida, sempre fizeram o possível para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai que me amparou e encheu de forças sempre em todos os momentos, especialmente nas minhas fraquezas.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, que me permitiu desde o Mestrado dar continuidade à pós-graduação e realizar esse grande sonho de ser Doutora na minha profissão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira, me faltam palavras para lhe agradecer por tudo o que o Senhor fez por mim, aceitando me orientar na metade do caminho, depositando sua confiança em mim, enfrentando os desafios nos quais fomos apresentados, me apoiando nas horas mais difíceis, e principalmente, me mostrando que era possível sim que eu chegasse até aqui, por toda sua competente orientação, conhecimento transmitido, por sua presença marcante. O Senhor foi muito mais que um orientador, e como sou agradecida por Deus ter me permitido lhe conhecer como orientada. Obrigada Professor!! Muito obrigada!!

Agradeço de forma especial à Dra. Karla Valéria Batista Lima, pesquisadora do Instituto Evandro Chagas, pela co-orientação e profissionalismo, por todo o apoio disponibilizado nas nossas análises e por sua valiosa contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a Dra Ismari Perini Furlaneto, pesquisadora do Instituto Evandro Chagas, por toda a contribuição nas nossas análises, consideráveis sugestões para nossos capítulos e análise estatística.

Ao meu esposo Dennis Magalhães que não mediu esforços e sempre esteve ao meu lado, desde o início desse sonho, especialmente pelo cuidado, amor e força nas horas mais difíceis, não sei se conseguiria chegar até aqui sem seu apoio, muito obrigada meu marido e amor da minha vida.

Ao meu maior presente de Deus, meu amado filho Gabriel, que transformou minha vida em momentos mágicos de amor sem medidas. Como é possível morrer de amor e continuar vivendo?! Obrigada meu Deus!

Aos meus familiares (mãe Léa, irmã Mara, irmão Silvio Jr e meus amados sobrinhos), como é bom tê-los ao meu lado sempre, uma solidez que me fortalece diariamente.

Aos meus filhos de quatro patas (que não são poucos, rsrsrs – Funny, Happy, Gotha, Alegria, Tissot, Memnoch, Laurinha e Estrelinha), especialmente a minha amada filha Funny, que com seu olhar doce e seus momentos de sapeca, me descontraíram muitas vezes, e a todos que enchem meu coração de muito amor.

Aos Médicos Veterinários Nayana e Paulo, que me ajudaram disponibilizando realizar as coletas de amostras no matadouro frigorífico, bem como disponibilizando informações essenciais para a coleta de dados dos animais abatidos.

Agradeço também aos meus colegas de trabalho do Estado do Amapá, pelo incentivo e compreensão nos momentos em que tive que me ausentar das minhas atribuições perante as atividades departamentais.

À todos que de certa forma contribuíram e me ajudaram para que eu chegasse até aqui, meus sinceros agradecimentos, vocês foram pessoas fundamentais em minha caminhada.

“O difícil não é iniciar uma caminhada, mas sim continuar. Ir em frente requer, perseverança, persistência e humildade. Mas, semeando a boa semente, ainda que seja pela umidade das lágrimas ela germinará. Pode acontecer que alguns outros não valorizem os nossos trabalhos, as nossas lutas diárias. Mas os resultados dessas lutas nos fazem sentir que as experiências adquiridas na longa caminhada serviram para que acreditássemos em sonhos, mesmo sabendo que jamais deveríamos viver deles. Estas experiências, muitas vezes, nos fizeram chorar, mas jamais deixamos as lágrimas turvarem a nossa visão. Não importa também se, nesse esforço, tropeçamos e caímos, pois é aos que tombam na luta que se costuma chamar de heróis.”

Grifos nosso.

RESUMO

A criação de búfalos é uma importante fonte de renda no Amapá, representando um importante setor na economia local. A tuberculose é uma enfermidade infecto-contagiosa de distribuição mundial, que ocorre em bovinos e bubalinos, causada predominantemente por *Mycobacterium bovis*. A doença tem caráter crônico debilitante com impacto econômico na produção de carne e leite em diversas regiões do mundo, além de ser uma importante zoonose. Objetivando caracterizar *M. bovis* em lesões sugestivas de tuberculose detectadas na inspeção de bubalinos no Estado do Amapá, através dos métodos histopatológicos e imunohistoquímicos (IHQ) e análise molecular, realizou-se a coleta de 109 amostras de lesões sugestivas de tuberculose. Para a análise histopatológica, empregou-se técnicas habituais para inclusão em parafina, pela coloração de hematoxilina e eosina, e Fite-Faraco. Para a IHQ utilizou-se o método da peroxidase-antiperoxidase (PAP) com um anti-soro policlonal de coelho contra o *M. bovis* (Dako B0124). Para a análise molecular, a extração do DNA micobacteriano, foi realizada diretamente do linfonodo e tratado pelo método do fenol-clorofórmio, passando por dois protocolos de amplificação (PCR convencional e Nested-PCR). Histologicamente, 94,5% (103/109) apresentaram reação tecidual granulomatosa típica de lesão tuberculoide (LT), enquanto em 5,5% (06/109) sem características de granulomas tuberculoides ($p < 0.0001$). Os resultados obtidos através da IHQ, dentre os casos positivos pela histopatologia, todos apresentaram algum tipo de lesão classificada em diversos estágios pelo exame histopatológico, sendo observado que a maioria delas 82,2% (74/90; $p < 0.0001$) estava apenas no estágio IV. Entre os casos negativos, lesões necróticas apresentando-se apenas no último estágio de desenvolvimento (IV) também foram as mais frequentes 52,5% (10/19), e 31,5% (06/19) também foram negativos no histopatológico ($p = 0.0030$). Das 103 amostras positivas ao exame histopatológico, 73,8% (76/103) apresentaram reação de PCR positiva para o gênero *Mycobacterium* e 64,1% (66/103) apresentaram amplificação para a região RD4, confirmando a deleção, exclusiva da espécie *M. bovis*. Os resultados demonstraram que a tuberculose está presente nos rebanhos bubalinos do Amapá e regiões do Marajó no Pará, representando um sério risco de saúde pública.

Palavras-chave: Tuberculose. Búfalo. Amazônia. Saúde pública. Diagnóstico.

ABSTRACT

The creation of buffalo is an important source of income in Amapá, an important sector in the local economy. Tuberculosis is an infectious disease of worldwide distribution, which occurs in cattle and buffaloes caused mainly by *Mycobacterium bovis*. The disease has debilitating chronic nature with economic impact on the production of meat and milk in different regions of the world, besides being an important zoonosis. Aiming to characterize *M. bovis* in suggestive of tuberculosis lesions detected in buffalo inspection in the State of Amapá, through histopathological and immunohistochemical methods (IHC) and molecular analysis, there was the collection of 109 samples suggestive of tuberculosis lesions. For histopathological analysis, we used standard techniques for paraffin by hematoxylin and eosin and Fite-Faraco. For IHC was used the method of peroxidase-antiperoxidase (PAP) with a polyclonal rabbit antiserum against *M. bovis* (Dako B0124). For molecular analysis, mycobacterial DNA extraction was directly performed lymph node and treated by the phenol-chloroform method through two amplification protocols (conventional PCR and Nested-PCR). Histologically, 94.5% (103/109) had typical granulomatous tissue reaction tuberculoide injury (LT), while in 5.5% (06/109) without features of tuberculoid granulomas ($p < 0.0001$). The results obtained by IHC among the positive cases by histopathology, all had some kind of injury classified in several stages by histopathology, and observed that most of them 82.2% (74/90; $p < 0.0001$) was only stage IV. Among the negative cases, necrotic lesions presenting only the last stage of development (IV) were also frequently 52.5% (10/19) and 31.5% (06/19) were also negative in the histopathologic ($p = 0.0030$). Of the 103 positive samples for histopathology, 73.8% (76/103) were PCR positive reaction to the genus *Mycobacterium* and 64.1% (66/103) had amplification for the RD4 region, confirming the deletion, exclusive of the species *M. bovis*. The results showed that tuberculosis is present in buffalo herds of Amapá and regions of Marajó in Pará, representing a serious risk to public health.

Keywords: Tuberculosis. Buffalo. Amazon. Public health. Diagnosis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.A.A.R.	Bacilos Álcool-Ácido-Resistentes
AP	Amapá
CL	Células de Langhans
CMT	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DIAGRO	Agência de Defesa e Inspeção do Amapá
DIPOA	Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Animal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HE	Hematoxilina-eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IHQ	Imunohistoquímica
LS	Lesão sugestiva
LT	Lesão tuberculoide
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MNT	Micobactéria não tuberculosa
NC	Necrose de caseificação
PA	Pará
PAP	Método peroxidase-antiperoxidase
PBS	Solução tampão de fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	Ácido ribonucleico
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
TB	Tuberculose
TBS	Solução TRIS salina tamponada
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. GERAL.....	15
2.2. ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1. BUBALINOCULTURA NO ESTADO DO AMAPÁ.....	16
3.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>Mycobacterium bovis</i>	17
3.3. TUBERCULOSE EM BUBALINOS.....	20
3.4. PATOGENIA E TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO TUBERCULOSA.....	22
3.5. A TUBERCULOSE NA INSPEÇÃO SANITÁRIA DE CARNES.....	25
3.5.1. Lesões anatomopatológicas da tuberculose na inspeção.....	28
3.6. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA TUBERCULOSE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	31
3.6.1. Diagnóstico Histopatológico.....	32
3.6.2. Diagnóstico Imunohistoquímico.....	36
3.6.3. Diagnóstico Molecular.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. MATERIAL.....	40
4.2. MÉTODOS.....	41
4.2.1. Análise Histopatológica.....	41
4.2.2. Análise Imunohistoquímica.....	42
4.2.3. Análise Molecular.....	43
4.2.3.1. Obtenção do DNA.....	43
4.2.3.2. Amplificação do DNA.....	43
4.2.4. Análise Estatística.....	45
5. RESULTADOS.....	46
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma enfermidade infectocontagiosa de distribuição mundial, causada por microorganismos do gênero *Mycobacterium*. Em bovinos e bubalinos prevalece como agente dessa enfermidade *Mycobacterium bovis*, que pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), causando doença crônica debilitante, que provoca perdas econômicas comprometendo a produção de carne e leite em diversas regiões do mundo (FREITAS; GUERRA; PANETTA, 2001; ACHA; SZYFRES, 2003; BEZERRA; CERQUEIRA, 2012; ALZAMORA FILHO et al., 2014).

Devido ao seu impacto na saúde coletiva, vários países desenvolveram programas de controle e erradicação da doença em bovinos (GRISI FILHO et al., 2011). O Brasil iniciou o combate à doença de forma mais organizada em 2001, com o lançamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), que tem certificado propriedades livres e testado animais em trânsito como principais estratégias de combate à tuberculose (BRASIL, 2006).

No Brasil, o efetivo de bubalinos em 2014 era de 1.319,478 milhões de cabeças (IBGE, 2014), com o rebanho concentrando-se sobremaneira nos estados do Pará (37,41%) e Amapá (21,65%), representando cumulativamente 59,06% do total nacional. Nesse aspecto, o estado do Amapá possui o segundo maior rebanho de bubalinos do país, ficando atrás apenas do Pará, sendo o único Estado da Federação com uma concentração maior de bubalinos do que de bovinos. Esta escolha ou condição se dá devido à resistência do animal às adversidades, a fácil adaptação da espécie à região de várzeas e a popularização da sua carne (NEIVA, 2010; SILVA, 2010; SANTO, 2013).

O Estado do Amapá é o único Estado da Federação com uma concentração maior de bubalinos do que de bovinos (IBGE, 2014). Segundo dados da Agência de Defesa e Inspeção Agropecuária do Amapá - DIAGRO foram abatidos somente no ano de 2015, em um matadouro com Serviço de Inspeção Estadual (SIE0003), 33.690 cabeças de búfalo para abastecer Macapá, a capital do estado, e alguns municípios. Nesse mesmo ano o estabelecimento abateu 6.578 cabeças de bovino, ou seja, aproximadamente 84% da carne comercializada no estado é proveniente da espécie bubalina, demonstrando o elevado consumo da mesma na região.

O SIE vem registrando alterações sugestivas de tuberculose nas carcaças, cabeças ou vísceras, bem como casos de lesões generalizadas. No abate de animais, tais lesões sugestivas

de tuberculose são rotineiramente observadas, contribuindo para as grandes perdas econômicas devido às rejeições e condenações de carcaças e órgãos. Todavia um percentual considerável dessas lesões pode ocorrer devido a outras enfermidades, podendo confundir o veterinário inspetor. Entre as patologias mais frequentes destacam-se a onchocercose bovina, processos granulomatosos causados por fungos, actinobacilose, actinomicose, coccidiomicose, abscessos, paratuberculose, granuloma eosinofílico, granuloma parasitário, granuloma por corpo estranho, carcinomas e sarcomas. Além disso, nem sempre os animais com tuberculose apresentam lesões aparentemente tuberculóides (CORNER et al., 1990; ARAÚJO, 2014).

Em levantamento através de dados do SIE da DIAGRO, Silva et al. (2014), evidenciaram aproximadamente 3% de alterações do tipo tuberculoides em rebanho bubalino no Amapá, com 8,56% das amostras com lesões generalizadas, 5% localizadas na carcaça, 18,24% na cabeça, 65,22% nas vísceras vermelhas (pulmões, coração e fígado), e 2,97% nas vísceras brancas (estômago e intestinos).

No diagnóstico da tuberculose bovina, ressalta-se a importância de métodos de detecção da bactéria para estabelecimento de um diagnóstico mais preciso, já que nem toda lesão sugestiva é positiva para tuberculose (ARAÚJO, 2014). A histopatologia através da coloração Ziehl-Neelsen (ZN) tem alta especificidade, mas baixa sensibilidade, necessitando ser reexaminadas, em casos de planos de erradicação, com outros métodos. A imunohistoquímica é uma opção de método diagnóstico relativamente rápido, mais sensível e específico para estabelecer o diagnóstico etiológico da tuberculose em amostras histológicas (MUSTAFA et al., 2006; VARELLO et al., 2008).

Rotineiramente, o diagnóstico da tuberculose (TB) em bovídeos é principalmente anatomopatológico *post mortem*, porém esta técnica apresenta consideráveis limitações pelo fato de que muitas inflamações granulomatosas possuem características morfológicas semelhantes à TB, inclusive reações pós-vacinais (FURLANETTO et al., 2012; NORONHA, 2015). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e diversos métodos baseados nessa técnica têm sido explorados para a detecção e identificação de micro-organismos a partir das mais variadas fontes, apresentando vantagens em comparação com os métodos clássicos, como especificidade, sensibilidade e rapidez (FURLANETTO et al., 2007; RUGGIERO et al., 2007; SALES, 2012).

A literatura reporta levantamento de dados através dos órgãos oficiais de inspeção sanitária acerca de prevalência e localização de lesões sugestivas da tuberculose em bubalinos

do estado do Amapá (BEZERRA; CERQUEIRA, 2012; SILVA et al., 2014). Entretanto, o presente estudo adotou uma metodologia investigativa diferente da desenvolvida pelos respectivos trabalhos de levantamento, nos aspectos anatomopatológicos das lesões abordando não apenas o percentual encontrado de lesões como também suas características histopatológicas e imunohistoquímicas, e detecção molecular do agente etiológico da enfermidade.

Neste contexto, o presente trabalho objetiva caracterizar *Mycobacterium bovis* nas lesões sugestivas de tuberculose detectadas na inspeção de bubalinos no Estado do Amapá, através dos achados histopatológicos, da imunomarcção imunohistoquímica e análise molecular, o que possibilita a comparação entre as técnicas desenvolvidas com demais trabalhos semelhantes disponíveis na literatura, e ainda conhecer a situação sanitária para esta enfermidade no rebanho local, e os riscos à saúde da população que consome produtos oriundos desses animais.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Caracterizar *Mycobacterium bovis* nas lesões sugestivas de tuberculose detectadas na inspeção de bubalinos no Estado do Amapá, através dos achados histopatológicos, da imunomarcção imunohistoquímica e análise molecular.

2.2. ESPECÍFICOS

- Analisar a frequência e a distribuição de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose em carcaças e/ou vísceras de bubalinos abatidos para consumo no Estado do Amapá;
- Caracterizar e discutir os aspectos histopatológicos das lesões tuberculóides diagnosticadas na inspeção;
- Correlacionar a participação de *M. bovis* nas lesões tuberculóides mediante estudo imunohistoquímico;
- Investigar a presença de micobactérias nas amostras de lesões presuntivas de tuberculose através da Reação em Cadeia mediada pela Polimerase.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. BUBALINOCULTURA NO ESTADO DO AMAPÁ

A criação de búfalos é uma importante fonte de renda no Amapá, apesar das restrições sanitárias pela ausência do serviço de inspeção federal nos estabelecimentos de abate, que acabam limitando o escoamento da produção e sua venda para outros estados, o que impede o desenvolvimento produtivo e dessa forma, seu consumo acaba se restringindo ao mercado local (SILVA et al., 2014c).

Os búfalos são animais domésticos da família dos bovídeos, de origem asiática, utilizados para produzir carne e leite para consumo humano, além de apresentar-se como opção de transporte em algumas regiões (FELINI, 2013). No Brasil, são reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos quatro raças: Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi (búfalo-do-rio) e Carabao (búfalo-do-pântano) (MONTEIRO, 2009).

Os búfalos da raça indiana Murrah e seus mestiços ocupam 80% das fazendas no Amapá. São animais com conformação média e compacta, cabeça leve e chifres curtos, espiralados, enrodilhando-se em anéis na altura do crânio. Possuem temperamento dócil, o que facilita sua criação e manejo, apresentando grande capacidade de adaptação aos mais diferentes ambientes, inclusive aqueles com baixa adequação aos bovinos, mesmo em áreas alagadas (BANIN, 2013).

Na região Norte a bubalinocultura é extensiva, a ponto das fazendas não contabilizarem o rebanho anualmente (BANIN, 2013). Entretanto, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), refere que o Estado do Amapá tem um rebanho bubalino efetivo de 268.903 cabeças, e uma participação de 20,18% no efetivo total nacional, considerado como o segundo maior índice entre as Unidades da Federação, perdendo apenas para o estado do Pará, com 38,12%. Os municípios de Chaves (PA), Cutias (AP) e Almeirim (PA) são os que têm os maiores efetivos de bubalinos (FELINI, 2013).

A pecuária tem se expandido significativamente nas últimas décadas, representando um importante setor na economia do Brasil. No censo agropecuário de 2014, houve um aumento considerável no número de bubalinos na região Norte, no qual o país possuía um rebanho bubalino de 1,319 milhões de cabeças, sendo o Norte detentor de 66,49% do efetivo. O Amapá abriga 21,65% de cabeças, permanecendo como o único estado da Federação que possui uma concentração maior de bubalinos do que de bovinos (IBGE, 2014).

Os bubalinos são mais precoces que os bovinos e podem atingir a idade de abate, a pasto, entre 18 e 24 meses, quando criados exclusivamente para corte (BANIN, 2013). No que se refere à sanidade, esses animais são tão sensíveis às doenças quanto os bovinos, ainda que, sistematicamente, se apresentem mais resistentes às moléstias e infecções comuns aos dois grupos de ruminantes, como a tuberculose, em búfalos abatidos para consumo no Estado do Pará (FREITAS; GUERRA e PANETTA, 2001).

Apesar do destaque para a qualidade da carne bubalina, existem algumas restrições por parte da população consumidora de tal produto, que muitas vezes possui preferência pela carne de bovinos do que de bubalinos. Nesse sentido, no estado do Amapá, são poucos os locais em que se observa uma cadeia produtiva bem consolidada em relação à produção de carne bubalina e o preço pago pela carne de búfalo varia em torno de 15 e 20% a menos quando comparado com o valor pago pela carne bovina (MARQUES et al, 2013). Esses fatores evidenciam a fragilidade da cadeia produtiva bubalina no Estado do Amapá, em toda a sua extensão, o que a torna vulnerável à práticas fraudulentas (OLIVEIRA et al., 2015).

3.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Mycobacterium bovis*

As bactérias causadoras de tuberculose pertencem à ordem Actinomycetales, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*, sendo a espécie *M. bovis* o principal agente causal da tuberculose bovina. O gênero compreende 127 espécies e 11 subespécies diferentes, com características muito diversas com relação à morfologia das colônias e às características bioquímicas, mas com algumas características taxonômicas comuns como: álcool-ácido-resistência, presença dos ácidos micólicos e DNA com alto teor de guanina e citosina. São bacilos curtos aeróbicos, imóveis, não capsulados, não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, medindo de 0,5 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,7 µm de largura, sendo a álcool-ácido resistência a sua propriedade mais característica. São moderadamente resistente ao calor, dessecação e diversos desinfetantes e diferem-se em tropismo entre hospedeiros, fenótipos e patogenicidade (BRASIL, 2008; MOTA, 2008; HERRERA-LEON et al., 2009; DUARTE, 2010; SIMÕES, 2011; GOMES, 2014).

Essa bactéria produz a tuberculoproteína (tuberculina), uma proteína que é ativada em reações de hipersensibilidade do tipo retardada. Animais sensibilizados ao *M. bovis*

evidenciam uma reação cutânea quando inoculados com a tuberculoproteína, teste importante no diagnóstico desta infecção (GOMES, 2014).

As micobactérias apresentam uma elevada concentração de lipídeos em sua parede celular, correspondendo a cerca de 20 a 40% do peso seco do bacilo. Os ácidos micólicos são provavelmente o suporte molecular da álcool-ácido resistência, visto que quando ligados ao peptidoglicano, formam uma barreira periférica hidrofóbica capaz de se ligar e reter fucsina a certos lipídios da parede, adquirindo a cor vermelha durante a coloração Ziehl-Neelsen (ZN). As bactérias que não retêm a fucsina se coram pelo azul de metileno (ARAÚJO, 2004; COSTA, 2008; HEINEMANN et al., 2008; HERRERA-LEON et al., 2009).

Tais bacilos apresentam-se “gordos” em esfregaços de tecidos, maiores e mais finos em meio líquido, estritamente aeróbio com crescimento ótimo a 37°C, imóveis, não formadores de esporos, catalase positiva com exigências nutricionais complexas não crescem a 25°C, não reduzem o nitrato e a niacina, são resistentes à pirazinamida e sensíveis a hidrazida (QUINN et al., 2005; GOMES, 2014).

De acordo com Biberstein e Hirsh (2003) e Duarte (2010), o elevado conteúdo lipídico presente na parede celular é responsável pelos relevantes efeitos biológicos no hospedeiro, como a indução de granulomas, atividade adjuvante e antigenicidade, além da estabilidade ácida e propriedades imunológicas. Os micosídeos de superfície, como os glicolipídios, influenciam diretamente sobre as características coloniais, especificidade sorológica e sensibilidade bacteriofágica, além de assegurar a sobrevivência bacteriana quando fagocitada (ARAÚJO, 2004; DUARTE, 2010).

As bactérias causadoras da tuberculose em humanos e animais são agrupadas no “Complexo *Mycobacterium tuberculosis*” (CMT), que inclui as seguintes espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis*-BCG (Bacilo de Calmitte e Guérin), *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, e *M. canettii*. Os membros do CMT são reunidos por apresentarem uma estreita relação genética e, apesar do elevado grau de conservação dos seus genomas, as espécies do CMT demonstram importantes diferenças fenotípicas, adaptações a diferentes hospedeiros e evidenciam diferentes graus de virulência para o homem, sendo que *M. africanum* ainda não foi isolado no Brasil (BROSCH et al., 2000; DE LA RUA-DOMENECH, 2006; MOTA, 2008; HERRERA-LEON et al., 2009; GOMES, 2014).

De acordo com Mota (2008) e Gomes (2014), *M. bovis* permanece viável em estábulos, pasto e esterco por até dois anos, em até um ano na água e cerca de dez meses nos

produtos de origem animal contaminados. Agentes desinfetantes como fenólicos, álcool e em especial pelo hipoclorito de sódio são bastante eficientes no combate ao bacilo. Contudo, sua ação pode ser afetada pela concentração, o tempo de exposição, a temperatura e a presença de matéria orgânica. Compostos de amônia quaternários e clorhexidine não o destroem, entretanto, o calor úmido a 60°C mata o bacilo rapidamente. A pasteurização do leite (62,8 - 65,6°C por 30 minutos ou 71,7°C por 15 segundos) mata as micobactérias. É rapidamente destruído pela luz solar direta e no ambiente seco.

Gomes (2014) refere que as micobactérias, quanto à velocidade de crescimento e pigmentação, dividem-se em grupos diferentes, onde a espécie *M. bovis* produz pouco ou nenhum pigmento, se enquadrando no grupo das não cromogênicas e não fotocromogênicas. É considerado, assim como *M. tuberculosis*, parasita intracelular facultativo, no qual a principal célula que serve de hospedeiro para essas micobactérias são os macrófagos. São parasitas do sistema fagocítico mononuclear na grande maioria das infecções iniciais. Pode ser destruído pela luz solar, mas resiste bastante à dissecação, aos ácido e as bases.

Apesar de alguns estudos apontarem dificuldades na extração de DNA de *M. bovis* em tecidos, quando se aplica modificações no método de extração, a técnica se mostra mais sensível em 90% dos casos (TAYLOR et al., 2007). A proximidade genética das espécies do complexo *M. tuberculosis* pode ser verificada pelo alto grau de similaridade em nível de DNA e pela sequência 16s rRNA idêntica, mas diferem enormemente em termo de hospedeiro preferencial, características fenotípicas e patogenicidade (ARANAZ et al., 2003).

O genoma de *M. bovis* foi completamente sequenciado, possuindo 4.345.492 pares de bases, um conteúdo de Citosina+Guanina de 65,6% e 3.951 genes codificadores para proteínas, incluindo um profago e 42 elementos de inserção (*insertion sequence* - IS). A similaridade com o genoma de *M. tuberculosis* é de 99,95%, mostrando colinearidade e sem evidências de translocações, duplicações ou inversões. Entretanto, o genoma de *M. bovis* sofreu 11 deleções. Comparando-se ao genoma de *M. tuberculosis*, a maioria das variações nas sequencias de DNA ocorreu nos genes que codificam proteínas secretadas e de parede celular, que presumivelmente estão envolvidas na adesão celular e modulação da resposta imune (FARIAS, 2009; ROCHA, 2009).

3.3. TUBERCULOSE EM BUBALINOS

A tuberculose é caracterizada como uma doença crônica, de evolução lenta. Nos bovinos e bubalinos ocorre à formação de nódulos granulares denominados tubérculos e que podem estar localizados em qualquer órgão, mas as lesões com maior frequência são observadas nos linfonodos da cabeça e tórax, pulmões, intestinos, fígado, pleura e peritônio, sendo responsável por perdas econômicas importantes na pecuária brasileira (ALMEIDA, 2004; SANTOS, 2004; BRASIL, 2006; HEINEMANN et al., 2008).

A principal forma de transmissão é a inalação de aerossóis infecciosos, e o processo é clinicamente inaparente por muito tempo, e alguns animais, embora eliminem o agente para o ambiente, transcorrem as suas vidas produtivas sem sintomatologia evidente. Os animais sintomáticos geralmente desenvolvem sinais respiratórios e perda de peso progressiva, resultando em diminuição da produção de carne e leite (ACHA; SZYFRES, 2003; GOMES, 2014).

Esta enfermidade de distribuição cosmopolita apresenta uma maior prevalência nos países em desenvolvimento, enquanto nos países desenvolvidos, a prevalência é reduzida em virtude da implantação e consolidação de programas de controle e erradicação da doença (ALZAMORA FILHO, 2013). No Brasil, dados de notificações oficiais indicaram uma prevalência média nacional para a espécie bovina de 1,3% de animais reagentes à tuberculina no período de 1989 a 1998 (BRASIL, 2006).

Segundo Lopes Filho (2010), um fato que provoca bastante preocupação é que 85% dos bovinos e 82% da população humana mundial encontram-se em áreas onde a tuberculose bovina não está controlada ou possui apenas controle parcial.

Os programas de controle e erradicação da tuberculose visam o saneamento do rebanho, através da identificação de animais infectados e sacrifício daqueles reativos à tuberculina, implantação de um sistema de vigilância epidemiológica da doença a partir do monitoramento de carcaças de animais com lesões sugestivas de tuberculose em matadouros-frigoríficos com serviços oficiais e também pela pasteurização do leite para o consumo (KANTOR; RITACCO, 1994; SALAZAR, 2005; DE LA RUA-DOMENECH, 2006; KANTOR et al., 2008; GRISI FILHO et al., 2011).

A tuberculose é considerada uma doença de grande importância em saúde coletiva, causando grandes perdas econômicas. Estima-se que os animais infectados perdem de 10 a 25% de sua eficiência produtiva, com perdas na produção de leite e ganho de peso,

diminuição da eficiência reprodutiva, descarte precoce e eliminação de animais de considerado valor zootécnico, condenação de carcaças no abate, perda de mercados potenciais com restrição às exportações, além de custos com tratamentos em seres humanos e perda por mortes de animais (BRASIL, 2001; ARAÚJO, 2004; MORATO, 2007; OLIVEIRA et al., 2008; PACHECO et al., 2009).

É uma doença que gera consequências econômicas desastrosas, devidas em grande parte à aquisição de animais doentes, como a redução da produção de leite e carne, desvalorização comercial do animal infectado pela rejeição de sua carcaça, maior intervalo entre partos, maior necessidade de substituição dos animais no rebanho, produção de crias debilitadas e diminuição do valor comercial da fazenda. Por isso, ainda hoje se pratica o abate clandestino em várias regiões do Brasil, sendo difícil fazer uma estimativa do problema. Este fato é muito importante, pois alguns produtores de gado de corte, com altos índices de condenação por tuberculose, enviam seus animais para serem abatidos em locais sem controle sanitário (ABRAHÃO, 1998; ABRAHÃO et al., 2005; SOUZA, 2013).

A introdução e a manutenção da tuberculose bubalina em um rebanho são fortemente influenciadas por fatores diversos, como o aumento da densidade populacional de bovinos por propriedade, a introdução de animais ou material genético infectado, contaminação ambiental, alteração no manejo sanitário e tipo de exploração que facilitam a disseminação de diversos micro-organismos patogênicos, como *M. bovis*, de grande importância sanitária e econômica para a bovinocultura (COSTA, 2008; LOPES, 2008; BITTENCOURT, 2009; DUARTE, 2010).

A maioria dos bubalinos não manifesta sinais clínicos da doença. Porém, nos casos em que estes se manifestam se assemelham aos dos bovinos, bem como as lesões anatomopatológicas. Estudo realizado em búfalos abatidos em matadouro na cidade de Belém, estado do Pará, demonstrou uma prevalência de lesões compatíveis com tuberculose de 60,3%, ocorrendo principalmente nos pulmões (FREITAS; GUERRA; PANETTA, 2001).

Segundo Silva et al. (2014), analisando dados tabulados pelo SIE em um matadouro frigorífico do Estado do Amapá, a partir de lesões sugestivas de TB observadas durante o abate de animais, os municípios do Estado que apresentaram o maior número de carcaças com condenações generalizadas para tuberculose foram Tartarugalzinho (17%), Cutias de Araguari (16%), Macapá (12%) e Amapá (11%). Todos são localizados em região de extensas áreas de várzea e juntos representam 70% da pecuária estadual.

3.4. PATOGENIA E TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO TUBERCULOSA

Informações definitivas sobre a patogênese da tuberculose ainda não são totalmente conhecidas, embora o bacilo da tuberculose tenha sido descoberto há mais de 129 anos. Existem diferenças inexplicáveis na suscetibilidade entre os bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) e as diferentes espécies animais, apesar de todo o conhecimento (GOMES, 2014).

A patogênese da lesão tuberculosa depende de uma resposta imunológica conhecida como hipersensibilidade. A lesão inicial consiste de um aglomerado de neutrófilos circundando os bacilos invasores. As micobactérias são ingeridas, mas multiplicam-se intracelularmente. Com isso, os micro-organismos podem ter acesso aos linfócitos, de onde serão conduzidos até os linfonodos regionais e outros locais distantes. Com o início de uma resposta imune, a lesão passa a apresentar os aspectos típicos de um granuloma. Este granuloma vai aumentar de tamanho e suas células centrais sofrerão necrose caseosa. A seguir pode ocorrer calcificação no centro caseoso do tubérculo (JONES et al., 1997).

Quando um tubérculo se abre para a luz de um vaso sanguíneo e provoca um derrame muito grande de micobactérias na circulação, que se alojam nos capilares de órgãos viscerais, dão origem a múltiplas lesões em praticamente todos os órgãos, o que caracteriza a forma miliar da tuberculose, com granulomas pequenos de 2 a 3 mm de diâmetro, dispersos nos órgãos viscerais e na superfície do peritônio e da pleura (COSTA, 2008b).

Todas as lesões tuberculosas localizadas tendem a estimular a formação de uma cápsula fibrosa que as envolve, mas o grau de encapsulamento varia com o desenvolvimento da lesão. Os casos ativos ou abertos são disseminadores perigosos e são indicados pela tuberculose miliar com lesões em forma de pequenos pontos transparentes, localizados em vários órgãos, ou pelas lesões pulmonares, que não estão bem encapsuladas e caseificadas. A presença de broncopneumonia ou hiperemia em torno das lesões é altamente sugestiva de uma infecção ativa (PACOLA, 1998). Segundo esse autor, os casos de mastite tuberculosa ou metrite tuberculosa com secreção podem ser considerados como lesões abertas. Já as lesões fechadas são caracteristicamente discretas, nodulares, contendo um material caseoso, espesso e de coloração que varia de amarela a alaranjada, geralmente calcificada e envolvida por uma densa cápsula fibrosa. Apesar de ser pouco provável que estas lesões causem grande contaminação do ambiente, em comparação com as lesões abertas, os animais acometidos podem ser ainda importantes fontes de infecção.

A fonte de infecção de *M. bovis* em um rebanho pode consistir, principalmente na presença de animais infectados, sendo a via respiratória ou aerógena a forma mais comum de propagar o bacilo para outros animais suscetíveis, embora seja possível a transmissão através do leite, fezes, urina, secreções útero-vaginais, sêmen e produtos de abscedação de linfonodos, e ainda em menor proporção através da contaminação da água, pastagens, utensílios e cochos por essas secreções (ABRAHÃO et al., 2005; LAVAGNOLI, 2010; ALZAMORA FILHO, 2013; GOMES, 2014).

A ingestão de leite contaminado é a principal via de transmissão para animais jovens e também para o homem e as vias cutânea e genital são de ocorrência bastante rara. A ingestão de carne crua infectada também é considerada uma via de infecção de *M. bovis* para o homem (CORNER, 1994; ZANINI et al., 2002; SALAZAR, 2005; COSTA, 2008; LOPES FILHO, 2010; VURAL; ALCIGIR, 2010; COSTA, 2012).

Tradicionalmente, bovinos leiteiros possuem uma taxa de infecção maior que os bovinos de corte, e os bezerros podem ser infectados intrauterinamente ou pelo leite de vacas com infecção no úbere e há isolamentos de *M. bovis* do prepúcio, sugerindo que a transmissão venérea seja possível, em bovinos (GOMES, 2014).

M. bovis ocasiona tuberculose em uma ampla variedade de hospedeiros, podendo infectar diversas espécies de mamíferos silvestres e domésticos, como bovinos, bubalinos, suínos, primatas e carnívoros. No homem, a doença não tem diferença da causada por *M. tuberculosis*, sendo tratada da mesma forma (PARREIRAS, 2003; ABALOS; RETAMAL, 2004; ALZAMORA FILHO, 2013).

Em bovinos e bubalinos, cerca de 80 a 90% das infecções por *M. bovis* se dá pela via respiratória através da inalação de aerossóis contaminados com micro-organismos (ABRAHÃO et al., 2005; LOPES FILHO, 2010; COSTA, 2012). Assim, essa enfermidade de evolução crônica, apresenta o alvéolo pulmonar como a principal porta de entrada do bacilo, favorecendo o aparecimento de lesões granulomatosas no parênquima pulmonar, principalmente nos linfonodos brônquicos e/ou mediastínicos (SOUZA et al., 1999; LOPES, 2008).

A partir de uma infecção pulmonar, macrófagos alveolares e células dendríticas, podem fagocitar *M. bovis*, que migra através do sistema linfático em direção ao linfonodo regional e forma nesse órgão uma lesão, estabelecendo o “complexo tuberculoso primário”. Ao mesmo tempo, as células fagocíticas podem penetrar no parênquima pulmonar, iniciando um foco inflamatório para onde outros macrófagos serão atraídos. Nesse caso, o acúmulo de

células inflamatórias ao redor do micro-organismo inicia a formação de um granuloma, coordenado por linfócitos T e essas se tornam indispensáveis para a formação de granulomas estáveis, ficando em contato com fagócitos mononucleares e influenciando seu estado de diferenciação e ativação (TEIXEIRA et al., 2007).

Podem ocorrer casos de lesões de tuberculose em intestino e linfonodos relacionados, principalmente mesentéricos, quando a infecção se dá pela ingestão do agente em pastagens e uso de bebedouros e cochos coletivos contaminados por animais infectados. Portanto, os sinais clínicos da enfermidade e a distribuição das lesões dependem do modo de transmissão (CASWELL; WILLIAMS, 2007).

Mycobacterium não elabora toxina ou outro fator de virulência celular, embora o "fator corda" esteja presente em cepas virulentas e não presentes em cepas avirulentas. Seu papel sobre a virulência não é compreendido, mas se acredita que tenha importância na estimulação da resposta granulomatosa (GOMES, 2014). Segundo esse autor, animais jovens frequentemente desenvolvem as lesões mais severas frente às infecções micobacterianas, quando comparadas aos animais mais velhos, considerando a maioria das espécies animais.

Espécies silvestres podem assumir papel importante na cadeia epidemiológica como reservatórios de *M. bovis*, com condições de introduzir ou reintroduzir a doença em rebanhos (BITTENCOURT, 2009). Entre eles, destacam-se o texugo (*Meles meles*), marsupiais silvestres (*Trichossurus vulpecula*), furão (*Mustela furo*) e cervídeos (*Odocoileus virginianos*), que tiveram suas populações infectadas primariamente pelos hospedeiros clássicos da doença, ou seja, humanos e bovinos (ACHA; SZYFRES, 2003; CORNER, 2006). Outra maneira da tuberculose ser introduzida em um rebanho é principalmente pela aquisição de animais infectados, podendo a enfermidade se propagar, independentemente da idade, sexo e raça (ABRAHÃO et al., 2005).

M. bovis pode ser eliminado ainda pelas fezes, urina, secreções útero-vaginais, sêmen e produtos de abscedação de linfonodos, sendo que a sua transmissão ocorre em menor proporção através da contaminação da água, pastagens, utensílios e cochos por secreções (CORNER, 1994; MORRIS et al., 1994; SALAZAR, 2005). A ingestão de leite contaminado é a principal via de transmissão para animais jovens e também para o homem e as vias cutânea e genital são de ocorrência bastante rara (ZANINI, 2002; ABRAHÃO et al., 2005; COSTA, 2008).

A lesão tuberculosa pode regredir, persistir estabilizada ou progredir e generalizar-se no organismo em duas fases: o complexo primário e o pós-primário. O complexo primário

constitui-se na lesão inicial, na qual houve a primo infecção com comprometimento do linfonodo regional. A generalização da tuberculose ocorre na fase pós-primária e pode assumir a forma miliar aguda, com a distribuição sistêmica de grande carga bacilar através da circulação, que consiste em discretas lesões espalhadas por vários órgãos; ou de forma protraída, que é a disseminação do agente, por via circulatória ou linfática, por reinfecção contínua em outros tecidos, podendo acometer praticamente todo o sistema, pela recrudescência da lesão ou por reinfecção exógena. O desenvolvimento da doença pode ocorrer precocemente ou numa fase tardia, em decorrência de uma queda na imunidade animal (RADOSTITS et al., 2002; BRASIL, 2006).

3.5. A TUBERCULOSE NA INSPEÇÃO SANITÁRIA DE CARNES

No Brasil, a tuberculose bovina ocorre por todo o território nacional, porém a sua prevalência e distribuição regional não estão bem caracterizadas (BRASIL, 2001).

Embora o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose preconize a tuberculinização como teste de diagnóstico, há outros métodos que podem auxiliar na identificação da doença nos rebanhos (PAIXÃO; NETA, 2006). A inspeção sanitária de produtos de origem animal é uma forma rotineira de diagnóstico da doença. A inspeção feita em todas as carcaças bovinas nas linhas de abate em frigoríficos e abatedouros com inspeção veterinária tem um papel importante na detecção de rebanhos infectados, contribuindo ativamente para o sucesso dos programas de controle e erradicação (CORNER, 1994; KANTOR; RITACCO, 2006; PAIXÃO; NETA, 2006).

O exame *post mortem* realizado durante o abate pelo serviço de inspeção de produtos de origem animal é uma etapa essencial no diagnóstico da tuberculose bovina, em virtude do seu papel tanto na proteção ao consumidor (com o objetivo de tornar seguro o consumo dos alimentos inspecionados), quanto na atuação da vigilância epidemiológica da doença. A presença de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, geralmente caracterizadas por nódulos granulomatosos, constitui um diagnóstico presuntivo (BRASIL, 2006; KANTOR; RITACCO, 2006).

Animais reagentes ao teste intradérmico podem não apresentar lesões visíveis durante o exame *post mortem*, mas isso não significa, porém, que se trata de reação falso-positiva. As

lesões podem estar em estágios iniciais de evolução, ou simplesmente não terem sido encontradas durante a inspeção de rotina (BRASIL, 2006).

A inspeção veterinária (mesmo que possua falha, já que o diagnóstico definitivo depende da identificação do agente causal, e na grande maioria dos estabelecimentos de abate as condenações ocorrem a partir de lesões sugestivas macroscópicas), tem como finalidade avaliar o estado das carcaças, impedindo o consumo humano de produtos que representem risco à saúde humana (BALIAN et al., 1997). Nesse sentido, Furlanetto et al. (2012) verificaram na inspeção *post mortem* de bovinos com suspeita de tuberculose, que pode ocorrer resultados indicativos de equívocos durante o julgamento das lesões suspeitas de tuberculose. Isto pode provocar uma distorção nas estimativas da tuberculose em abatedouros, o que traria consequências para o sucesso do PNCEBT.

Para minimizar equívocos no julgamento de tuberculose em abatedouros, recomenda-se a utilização de testes complementares de diagnóstico rápido nas lesões localizadas em regiões da carcaça frequentemente acometidas pela tuberculose, em especial do linfonodo retrofaringeano (FURLANETTO et al., 2012).

Em relação à literatura relacionada a estudos acerca da inspeção sanitária de bovinos no Brasil, Araújo et al. (2005), isolaram e identificaram *M. bovis* em amostras de órgãos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose no Estado do Mato Grosso do Sul, detectadas pela inspeção sanitária de abate, confirmando a presença de tuberculose bovina em seus rebanhos. Silva et al. (2013), em Uberlândia, MG encontraram 4,22% de alterações patológicas no sistema respiratório e 0,76% na cabeça, após inspeção *post mortem* de bovinos, onde a tuberculose foi a enfermidade mais frequente com 2,69% dos casos.

Silva et al. (2014b), verificando lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina, na região nordeste do Estado de São Paulo, observando que as lesões tuberculosas podem se apresentar tanto na forma caseosa quanto na forma calcificada em diferentes órgãos e/ou tecidos do mesmo animal, e que os órgãos mais afetados são, na maioria das vezes, os pulmões, fígado e linfonodos. Foi observado incidência de 0,16% de lesões sugestivas de tuberculose caseosa e 0,11% de lesões sugestivas de tuberculose calcificada, e de todos os órgãos estudados, o mais acometido foi o pulmão, apresentando 86,7% das lesões calcificadas e 83,5% das lesões caseosas.

A inspeção de animais em matadouros representa um ponto de partida em potencial para o rastreamento e identificação de "focos" de enfermidades. Tabosa et al. (2000), na região semi-árida da Paraíba, observaram que 3,14% dos animais inspecionados apresentavam

lesões macroscópicas semelhantes a tuberculose, sendo que cinco foram positivos (0,48%), confirmados pela bacteriologia e/ou histoquímica.

Alvim e Pinheiro Júnior (2005) registraram incidência de 1,51% de tuberculose para os animais estudados na região sul do Pará, afirmando que a doença está amplamente difundida na região. Albernaz et al. (2015), estudando teste cervical comparativo em búfalos de diferentes regiões do Estado do Pará, encontraram prevalência de 4,65% de animais positivos, com resultado satisfatório quando comparado com exame histopatológico e bacteriológico. Ainda no Pará, Freitas; Guerra e Panetta (2001), estudaram as características da tuberculose em búfalos abatidos para consumo na região metropolitana da cidade de Belém, encontraram uma taxa de prevalência de 7,7% da doença a partir de alterações macroscópicas, análise histopatológica, e isolamento de cepas micobacterianas, predominantemente de *M. bovis*. Os autores afirmam que no abate de búfalos, carcaças e órgãos demonstraram alterações anatomopatológicas indistinguíveis daquelas da tuberculose bovina, e o aparelho respiratório é o mais importante órgão da infecção primária.

No Amapá, Silva et al. (2014), realizaram um estudo de prevalência de lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos no principal estabelecimento de abate de bovídeos que abastece a população e evidenciaram aproximadamente 3% de alterações do tipo tuberculoide. Bezerra e Cerqueira (2012), após avaliação macroscópica e bacteriológica de lesões clinicamente sugestivas de tuberculose em 25 bubalinos e 4 bovinos abatidos no Amapá, identificaram que aproximadamente 42% das amostras estudadas foram positivas para *M. bovis*. Os autores enfatizam que no estado do Amapá não existem estabelecimentos de abate com serviço de inspeção federal ou municipal, e que a identificação de doença para a condenação e/ou rejeição de vísceras e carcaça é realizada a partir do exame macroscópico de lesões indicativa de tuberculose e segundo a extensão das lesões (localizada ou generalizada).

É importante destacar que no Brasil, a inspeção das carcaças é regulamentada pelo “Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal” (RIISPOA) da Divisão de Normas Técnicas do Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Animal (DIPOA), do Ministério da Agricultura, segundo decreto de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos de 1962, 1994, 1997, e vigente nos dias atuais (BRASIL, 1952).

Nos países desenvolvidos, a inspeção das carcaças para a evidenciação de tuberculose tornou-se cada vez mais uma prática a ser considerada como uma extensão do programa nacional de saúde animal e não apenas como um ponto de controle na prevenção de casos humanos de tuberculose causado por *M. bovis*. Nesses países, é levado em consideração a

importância de concentrarem-se sobretudo na eficiência que a inspeção veterinária da carne possui, apoiada pelo diagnóstico avançado da bacteriologia, o que favorece a possibilidade de erradicação desta doença zoonótica (BERENDS et al., 1993).

Uma questão que merece ser ressaltada é que no abatedouro em países menos desenvolvidos, o diagnóstico é feito apenas com base na lesão sugestiva e é de conhecimento que existem bactérias que causam lesões semelhantes à tuberculose, mas que não são a rigor micobactérias (ARAÚJO, 2014). Onchocercose bovina, processos granulomatosos causados por fungos, actinobacilose, actinomicose, coccidiomicose, abscessos, paratuberculose (nos casos de tuberculose digestiva), granuloma eosinofílico, granuloma parasitário, granuloma por corpo estranho, carcinomas e sarcomas são as patologias mais frequentemente confundidas com as lesões de tuberculose (CORNER et al., 1990; BRIET et al., 2005). Por sua semelhança, Lage et al. (1998), acrescentam que o diagnóstico macroscópico da tuberculose pode ser confundido ainda com outros processos inflamatórios granulomatosos, tais como lesões por *Corynebacterium pyogenes*.

Um sistema adequado de controle de doenças e vigilância epidemiológica depende da inspeção no matadouro. Isto implica uma infra-estrutura de pessoal altamente treinado e um sistema de registo confiável. No entanto, a escassez de inspetores veterinários qualificados e pessoal treinado limita a eficiência do exame *post-mortem* em vários países (KANTOR; RITACCO, 2006). Portanto, a vigilância no matadouro tem sido importante para a detecção de lesões durante o abate comercial que é usado como método eficiente em termos de custo para a vigilância passiva de tuberculose (RAMOS, 2012).

3.5.1 Lesões anatomopatológicas da tuberculose na inspeção

O diagnóstico realizado em matadouros, no momento do abate de animais, é baseado na observação de lesões granulomatosas, de aspecto nodular, denominada “tubérculo” (ABRAHÃO et al., 2005; ARAÚJO, 2014). Esses tubérculos ou nodulações consistem de estrutura discretamente diferente do tecido adjacente, com massa amorfa repleta de material caseoso encapsulado. As lesões macroscópicas dentro dos linfonodos variam em coloração, de branca a branco-amarelada, número e dimensões. Em geral, as lesões são bem delimitadas podendo no entanto apresentar-se irregulares. Ao corte, embora macias, pode-se sentir o

ranger da lâmina na maioria das lesões, o que sugere a ocorrência de mineralização (FRANÇA et al., 2013).

As lesões na tuberculose generalizada são representadas por nodulações miliares extensas nos órgãos e linfonodos da carcaça (MEIKLE, 2007). Em alguns casos, pode ser visualizado no parênquima dos órgãos um grande número de tubérculos secundários, com dois ou três milímetros de diâmetro, todos da mesma idade, caracterizando a tuberculose miliar (SMITH, 1993; RIET-CORREA; GARCIA, 2001). Dessa forma, o médico veterinário inspetor pode caracterizar se a carcaça ou órgãos são próprios para consumo.

O tamanho das lesões varia desde pequenas o suficiente para passarem despercebidas a olho nu até àquelas que envolvem a maior parte do órgão (OIE, 2009), e os linfonodos podem estar aumentados de volume até 10 vezes o tamanho normal (PAIXÃO; NETA, 2006).

Nos bovinos, as lesões de tuberculose são mais comumente encontradas nos linfonodos da cavidade torácica, seguido pelos linfonodos da cabeça e pelo parênquima pulmonar. Contudo, as lesões podem ser encontradas em qualquer linfonodo do corpo e uma boa parcela dos animais infectados apresenta uma única lesão de tuberculose e em alguns deles este único sítio está localizado fora da cavidade torácica (PAIXÃO; NETA, 2006; OIE, 2009). Em países com bons programas de controle, bovinos infectados normalmente têm poucas lesões na inspeção. A maior parte destas lesões são encontradas nos linfonodos associados ao sistema respiratório. No entanto, lesões pequenas, muitas vezes podem ser descobertas nos pulmões destes animais se os tecidos são seccionados (RAMOS, 2012).

A inspeção visual associada à palpação e recorte seriado dos linfonodos favorece a detecção das lesões macroscópicas. Os cortes seriados dos linfonodos são importantes para detectar pequenas lesões localizadas internamente no parênquima que não são visíveis externamente. Na cabeça, deve-se examinar trato respiratório superior (cavidade nasal, nasofaringe, traqueia), tonsilas, linfonodos parotídeos, mandibulares e retrofaríngeos. No tórax, pulmões, pleura, linfonodos bronquiais e mediastinais. No abdômen, fígado, baço, rins, peritônio, útero, linfonodos hepático e mesentéricos. E na carcaça, linfonodos sub-ilíacos, inguinais, sacrais, glândula mamária, testículo e epidídimo (CORNER, 1994; PAIXÃO; NETA, 2006; OIE, 2009).

França et al. (2013), observaram que lesões sugestivas de tuberculose, ocorreram principalmente nos linfonodos da cabeça-pescoço (96,22%), seguidos dos traqueobronquiais (63,3%), dos hepáticos (20,0%) e mediastínicos (16,7%). Na carcaça, 68,75% isquiáticos, 18,75% peitorais e 6,25% ilíacos e pré-crurais. Não foram identificadas lesões sugestivas de

tuberculose nos linfonodos mesentéricos, o que pode ser atribuída ao fato da via oral ser uma forma de propagação secundária à respiratória, justificando maior frequência de lesões nos linfonodos da cavidade torácica.

Corner et al. (1990), observaram que de 70 a 76% das lesões tuberculosas, durante a inspeção *post mortem* de bovinos em abatedouros, ocorreram nos linfonodos da cabeça ou da cavidade torácica. Em relação às carcaças, 74% das lesões apresentam-se únicas, evidenciando assim, a importância da inspeção dos linfonodos para o diagnóstico desta doença.

De acordo com Caswell e Williams (2007), as lesões de tuberculose podem ocorrer nos pulmões e são frequentes nos linfonodos relacionados ao sistema respiratório, principalmente retrofaríngeos, bronquiais e mediastínicos. Em algumas circunstâncias, ocorrem inúmeros focos disseminados a partir da liberação de bacilos do micobacterium na circulação sanguínea, caracterizando tuberculose miliar.

Freitas; Guerra e Panetta (2001), em estudo no Estado do Pará, revelaram 72,1% de alterações tuberculóides localizadas e 27,9% de alterações generalizadas. No aparelho respiratório estavam localizadas 60,3% das alterações, no conjunto cabeça-língua 20,3%, na carcaça 9,6%, na cavidade abdominal 6,3% e nas mamas 3,8%. *M. bovis* foi a espécie predominante, correspondendo a 67,3% das cepas isoladas. Do isolamento micobacteriano 70,3% foram do aparelho respiratório e 87,5 do parênquima pulmonar. Entre outras micobactérias isoladas, oito (16,3%) eram cepas de *M. fortuitum*, quatro (8,2%) de crescimento rápido e escotocromogênico, duas (4,1%) do complexo *M. avium* e duas (4,1%) de *M. gordonae*. O aparelho respiratório foi a via primária de infecção observada nos animais abatidos, a qual apresentava um certo grau de doença progressiva, similar à de bovinos.

Pesquisas com avaliação anatomopatológica de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose em búfalos abatidos na cidade de Macapá, estado do Amapá, em 2012, demonstraram que, após coleta de amostra de 29 animais (25 bubalinos e 4 bovinos), foi observado uma distribuição das lesões sugestivas localizadas no pulmão (27,4%); nos linfonodos (20,94%); no fígado (11,3%); na pleura (3,22%) e no tecido ósseo (1,61%) (BEZERRA; CERQUEIRA, 2012).

De acordo com Silva et al. (2014), em estudo sobre a prevalência de tuberculose em bubalinos abatidos para consumo no estado do Amapá, haviam lesões generalizadas sugestivas de tuberculose em 8,56% das amostras estudadas, 5% localizadas na carcaça, 18,24% na cabeça, 65,22% nas vísceras vermelhas (pulmões, coração e fígado), e 2,97% nas

vísceras brancas (estômago e intestinos). Os casos considerados generalizados da doença foram aqueles com lesões disseminadas em diversos órgãos e tecidos. Já os casos considerados de tuberculose miliar, apresentaram lesões granulomatosas dispersas por todo o peritônio e nas serosas dos órgãos viscerais.

Rotineiramente, a avaliação macroscópica durante a inspeção *post mortem* de tuberculose em abatedouros é a única medida empregada para o diagnóstico da enfermidade, o que pode incorrer em erros na sua detecção, que por sua vez, podem resultar em prejuízos econômicos e sanitários, comprometendo o sucesso do programa de vigilância da tuberculose bovina (FURLANETTO et al., 2012). A real etiologia e prevalência de lesões granulomatosas não-tuberculosas, requerem mais atenção por representarem motivo de condenação desnecessária de carcaças e muitas vezes induzirem ao erro durante os procedimentos de inspeção (FRÁGUAS et al., 2008).

3.6. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA TUBERCULOSE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os testes de diagnóstico da tuberculose no Brasil estão de acordo com os padrões internacionais e, em particular, com as recomendações do Código Zoo-sanitário Internacional. Entretanto, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), pretende atualizar e melhorar o padrão de diagnóstico, à medida que novos e melhores testes forem surgindo no mercado (BRASIL, 2001, 2004).

Os métodos utilizados no diagnóstico da tuberculose em animais podem ser divididos em diretos e indiretos. Os diretos envolvem a detecção e identificação do agente etiológico no material biológico (lesões, escarros). A bacterioscopia e os métodos moleculares, dentre estes a PCR, correspondem também a esta categoria. Já os indiretos pesquisam uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral, pela produção de anticorpos circulantes ou celular, mediada por linfócitos e macrófagos (ALZAMORA FILHO, 2013).

A grande variabilidade de sinais e lesões, bem como o caráter crônico da tuberculose, fazem com que o diagnóstico clínico tenha um valor relativo, proporcionando apenas um diagnóstico presuntivo. Os testes para diagnóstico da enfermidade se baseiam na detecção de

infecções latentes por *Mycobacterium* sp através de testes alérgicos ou pela detecção do agente em secreções, sendo este último o mais utilizado em humanos (SOUZA et al., 1999).

Para o diagnóstico da tuberculose bovina, os métodos mais utilizados são: a reação tuberculínica, a bacteriologia e a histopatologia, juntamente com a interação de achados epidemiológicos (SOUZA et al., 1999; ALZAMORA FILHO, 2013). Para os métodos diretos as amostras teciduais, são obtidas durante a inspeção de carcaças no abate, com lesões sugestivas da doença e pelo isolamento de BAAR em cultura (CORNER, 1994; SOUZA et al., 1999; CHARRO; OSÓRIO, 2013).

Gomes (2014) orienta que, nos animais, especialmente nos ruminantes, as amostras para análise laboratorial devem ser coletadas do pulmão e linfonodos associados ao trato respiratório (linfonodos bronquiais, mediastínicos, submandibulares e retrofaríngeos), bem como dos linfonodos torácicos e abdominais, linfonodos faríngeos e linfonodos intestinais, considerados como os locais mais comuns para disposição do micro-organismo.

Entre os métodos de diagnóstico que podem complementar a inspeção *post mortem* estão os testes histopatológicos, com coloração dos tecidos por hematoxilina-eosina (HE), a baciloscopia, com coloração por ZN, a cultura bacteriológica, e também testes moleculares baseados na PCR (FURLANETTO et al., 2012).

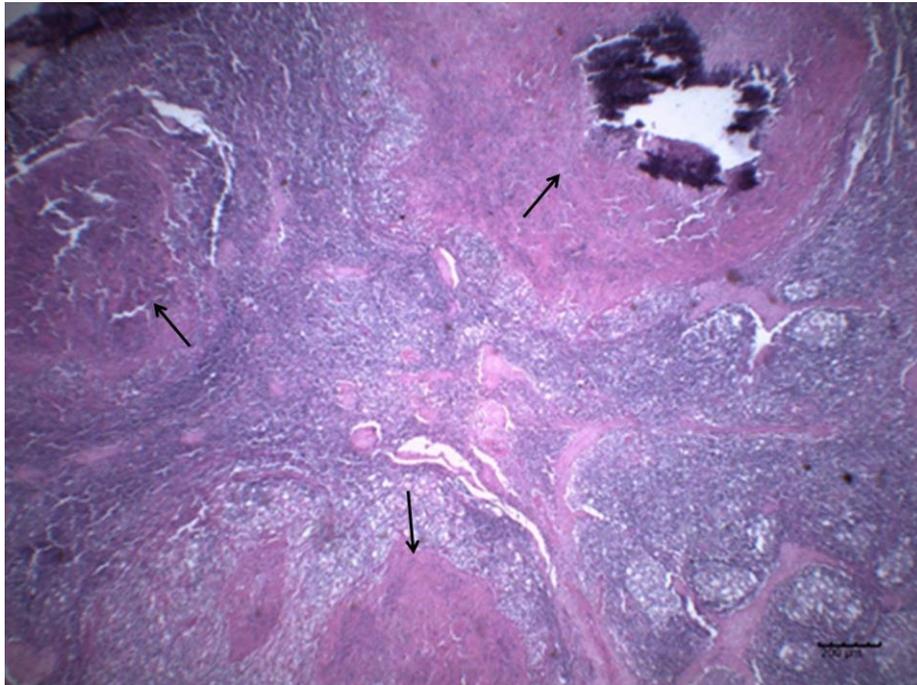
O diagnóstico microbiológico é baseado na cultura a partir de lesões, podendo demorar até três meses (90 dias) para ter o resultado, e ainda passa por uma bateria de testes bioquímicos (ARAÚJO, 2014b). Do mesmo modo que o exame histopatológico, o bacteriológico tem sido apontado como uma sinalização da presença de micobactérias em animais com tuberculose e outras micobacterioses. Segundo Pinto et al. (2002), o estudo bacteriológico da tuberculose serve para controlar o diagnóstico realizado no campo ou durante a inspeção em matadouros e permite avaliar a eficácia da prova da tuberculinização.

3.6.1. Diagnóstico histopatológico

O diagnóstico histopatológico é uma forma complementar ao exame *post mortem* de carcaças com lesões presuntivas de tuberculose (SALAZAR, 2005). Na avaliação histopatológica são observados aspectos indicativos de tuberculose, como a organização da lesão granulomatosa, e a presença de bacilos, através da coloração de ZN (VARELLO et al., 2008).

Os achados histológicos de amostras que revelaram bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) no cultivo caracterizam-se por uma área central de necrose caseosa, podendo ter mineralização. Estas áreas são circundadas por células gigantes multinucleadas de Langhans, células epitelióides, macrófagos e na periferia há a presença de células mononucleares, linfócitos e raros plasmócitos, circundados por tecido conjuntivo fibroso, configurando o granuloma (Figura 1) (ARAÚJO, 2004; ULRICHS; KAUFMANN, 2006).

Figura 1 - Multifocos granulomatosos (setas) em linfonodo de bubalino. Coloração HE. Obj. 10x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Histologicamente, as lesões se caracterizam por apresentarem áreas multifocais a coalescentes ou difusas de necrose caseosa, compostas por material eosinofílico homogêneo, núcleos e restos nucleares (cariorréxia) escassos, com graus variados de mineralização multifocal, ausente em alguns casos. Adjacente à necrose pode-se observar inflamação granulomatosa com macrófagos epitelióides abundantes, células de Langhans e linfócitos escassos a abundantes. Observou-se ainda proliferação discreta a acentuada de tecido conjuntivo fibroso circundando o infiltrado inflamatório ou, em alguns casos, entremeadado nele. BAAR põem-se pela coloração de ZN em todos os casos (ANDREAZZA et al., 2015).

Os métodos histológicos empregados para o diagnóstico de tuberculose, com identificação dos bacilos, a exemplo daqueles obtidos por meio de cortes de lesões coradas, são rápidos e baratos, contudo, apresentam baixa sensibilidade, na qual outros agentes que

não *M. bovis* podem também produzir lesões semelhantes à tuberculose bovina, dificultando o diagnóstico (WARDS et al., 1995; ZANINI et al., 2001). O diagnóstico definitivo de tuberculose depende do isolamento e identificação do agente etiológico. No entanto, esta metodologia apresenta aspectos restritivos para uso em larga escala, pois requer uma grande quantidade de bacilos viáveis, o que não é frequente em infecções recentes; requer também o uso de métodos drásticos de descontaminação, podendo comprometer a eficácia do cultivo; e o crescimento fastidioso do agente (ZANINI et al., 2001).

O método de visualização de micobactérias através da coloração de ZN, a despeito de ser rápido e barato, só consegue revelar a presença de BAAR em concentrações superiores a 10^3 bactérias por mL, sendo que esta técnica não permite distinguir os membros da família *Mycobacteriaceae* de outros micro-organismos, como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* que tem as mesmas características tintoriais (PRITCHARD, 1988; ZANINI, 2002).

O exame histopatológico pode ser aplicado principalmente em regiões de elevada prevalência da doença, por ser de conclusão mais rápida para o diagnóstico presuntivo, que deve ser confirmado em definitivo pelo cultivo de amostra (CORNER, 1994).

As variações das lesões de tuberculose podem ocorrer devido ao estado imunológico de cada animal, da toxicidade do tipo bacilar e ainda da espécie animal, predominando os caracteres de uma inflamação, ora proliferativa, ora exsudativa (JULIANO, 2007).

M. bovis produz uma lesão, com componentes proliferativos e exsudativos. A primeira reação é do tipo exsudativa e de caráter inespecífico, que consiste no aparecimento de congestão vascular, edema e exsudação leucocitária, já a lesão granulomatosa específica ocorre com a formação do granuloma tuberculoso, constituído por uma zona central de necrose caseosa, intimamente ligada à hipersensibilidade retardada, na qual pode-se observar mineralizações por precipitações de sais de cálcio. Rodeando esta zona de necrose, observa-se macrófagos com núcleo grande e claro, com abundante citoplasma, dispendo-se um ao lado do outro, conferindo ao conjunto um aspecto que recorda epitélio, chamado “células epitelióides”. Intercaladas observam-se células gigantes multinucleadas de Langhans, com núcleos ordenados preferentemente na periferia, originários a partir da fusão de macrófagos (MOTA; NAKAJIMA, 1992). À medida que a lesão evolui, o tubérculo desenvolve fibroplasia (SOUZA et al., 1999).

Estudo comparativo realizado por Fráguas et al. (2008) para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização demonstrou que 64,95% dos

animais apresentaram lesão granulomatosa característica quando corados pela HE. Todas estas lesões eram associadas à lesões macroscópicas, não tendo sido caracterizado como um achado inesperado, uma vez que a totalidade dos animais examinados foram reativos aos testes intradérmicos e provinha de rebanhos com histórico de tuberculose. Em 10% dos animais as lesões macroscopicamente semelhantes à tuberculose não se confirmaram no exame histopatológico. Esta diferença pode ser compreendida pela ocorrência de lesões granulomatosas determinadas por outras etiologias, com características macroscópicas indiferenciáveis da tuberculose (KANTOR et al., 1981).

A coloração ZN tem alta especificidade, mas baixa sensibilidade, o que pode ser explicado por uma baixa taxa de sobrevivência de micobactérias no ambiente da necrose caseosa ou perda de estrutura bacteriana devido respostas imunes que operam na inflamação granulomatosa em micobacterioses. Por esta razão, a identificação de BAAR usando o método de ZN precisa ser reexaminadas para sua aplicação em planos de erradicação com outros métodos de diagnóstico ou coloração imunohistoquímica (VARELLO et al., 2008).

3.6.2. Diagnóstico imunohistoquímico

A imunohistoquímica (IHQ), segmento moderno da histoquímica, é uma combinação de técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, relativamente recentes, que possibilita a detecção de antígenos tissulares *in situ*, por meio da utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras, cuja crescente utilização tem provocado grande impacto na patologia humana e veterinária devido à sua elevada sensibilidade e especificidade (GIMENO, 1995; SILVA; NOGUEIRA, 2002).

A técnica permite a avaliação da relação entre a presença de antígenos específicos dos tecidos com as lesões por eles provocadas, com rapidez e precisão nos diagnósticos, favorecendo a durabilidade do material corado e a realização de estudos retrospectivos (SILVA; NOGUEIRA, 2002). Diante da alta especificidade, esses métodos IHQ podem ser usado para avaliar a precisão de diferentes técnicas imunológicas e sorológicas (BREES et al., 2000).

A pesquisa de material antigênico de micobactérias por IHQ está recomendada de forma sistemática em todos os casos de reação granulomatosa sem definição etiológica, inclusive na tuberculose pleural, onde o bacilo é dificilmente encontrado. Ademais, contribui

para a caracterização da etiologia do processo em casos de tuberculose submetidos à terapêutica específica, ocasião em que, as paredes das bactérias são alteradas precocemente repercutindo, em resultados negativos nas reações histoquímicas (ZN, Fite-Faraco, etc.) o que não ocorre com a técnica IHQ (DUARTE; PAGLIARI, 1999).

Deve-se assinalar que a imunomarcagem não demonstra a morfologia dos bacilos. Identifica-se através desta, material antigênico particulado principalmente entre as células epitelíoides, no citoplasma de macrófagos e em meio ao material necrótico (DUARTE; PAGLIARI, 1999).

A detecção de antígenos micobacterianos por IHQ, utilizando anticorpos policlonais e monoclonais produzidos contra organismos completos ou seus componentes purificados, em parede celular ou citoplasma de micobactérias, é uma alternativa para a coloração ácido-resistente convencional com resultados variáveis em tecidos embebidos em parafina (FURAK et al., 2003; ULRICHS et al., 2005; PUROHIT et al., 2007).

Para Ahmed (2014), o diagnóstico da tuberculose através da técnica de IHQ é de fácil realização e adequado para laboratórios de países em desenvolvimento, onde os recursos laboratoriais são limitados. Entretanto, Lima (2011) cita que há escassez na literatura quanto ao diagnóstico de tuberculose por essa técnica.

Ulrichs et al. (2005), em estudo de detecção de *M. tuberculosis* em tecido humano com ZN negativo e utilizando a técnica IHQ com o anti-soro policlonal anti-*M. bovis Calmette Guérin* (pAbBCG), observaram que a referida técnica tem algumas vantagens em relação aos métodos convencionais (ZN e PCR - Reação em cadeia da polimerase). Dentre estas se destacam a alta sensibilidade em localizar as células infectadas pela micobactéria no interior do tecido humano infectado, bem como permite o diagnóstico de atividade da doença. Neste estudo, apesar da alta sensibilidade do método, os autores sugerem seu aprimoramento utilizando anticorpo monoclonal com sensibilidade comparada ao pAbBCG, porém, com especificidade expressiva para o complexo *M. tuberculosis*.

Mustafa et al. (2006), realizaram IHQ em biópsia de paciente com linfadenite granulomatosa sugestiva de tuberculose, utilizando anticorpo MPT64, que demonstrou alta sensibilidade e especificidade do método em relação a PCR para a amplificação da IS6110. De acordo com o estudo, trata-se de um anticorpo específico contra o antígeno MPT64 secretado por micobactérias não sendo portanto o referido antígeno detectado em micobactéria não tuberculosa. Os autores concluíram que a IHQ com anti-MPT64 mostra-se um método rápido, sensível e específico para estabelecer o diagnóstico etiológico da

tuberculose em amostras histológicas, bem como demonstraram sua vantagem em relação a PCR por se tratar de um teste diagnóstico barato, com possibilidade de uso em laboratório de rotina.

3.6.3. Diagnóstico molecular

Devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da TB em animais, como limitações relacionadas à sensibilidade e especificidade do teste de reação cutânea no campo e o longo período para a confirmação da presença do agente pelos métodos bacteriológicos de rotina, o interesse pelo desenvolvimento de métodos moleculares para a detecção direta do agente em amostras clínicas tem aumentado nos últimos anos, sendo as técnicas baseadas em PCR as mais apropriadas (ZANINI et al., 2002).

A PCR é um método de síntese enzimática *in vitro* que permite a geração exponencial de sequências gênicas específicas a partir de mistura simples ou complexas de RNA ou DNA. Apresenta maior eficiência que o cultivo do micro-organismo e as colônias podem ser identificadas no mesmo dia em que o crescimento nos meios de cultura são detectados, possibilitando sua utilização como ferramenta auxiliar na inspeção sanitária ou para apoiar a decisão quanto ao sacrifício de animais com suspeita de serem portadores de TB (COUSINS et al., 1991; ZANINI et al., 2001).

Várias técnicas de biologia molecular têm sido exploradas no sentido de identificar rapidamente *M. bovis* com altos graus de sensibilidade e especificidade. Alguns desses testes incluem a detecção do DNA do bacilo por PCR, servindo ainda como um complemento para o teste da tuberculina e para os testes microbiológicos (JORDÃO JÚNIOR et al., 2005). É um método rápido, simples e extremamente sensível, capaz de detectar até 10 fg DNA de micobactéria, o equivalente a cinco BAAR (COLLINS, 2011).

A técnica vem sendo empregada tanto para a detecção do agente etiológico da TB isolado em culturas, como diretamente a partir de amostras clínicas (KESARWANI et al., 2004). No entanto, as principais limitações são os resultados falso negativos, que quais podem ser atribuídos principalmente à presença de inibidores da reação de PCR no material investigado (GARBACCIO; CATALDI, 2010), mas também à natureza paucibacilar das amostras teciduais (RORING et al., 2000).

Em amostras clínicas de pacientes humanos, a PCR tem sido aplicada para a detecção do complexo *M. tuberculosis*, mas já foi relatada como sendo de pouco uso para o diagnóstico de TB animal (SANTOS, 2004). No entanto, a técnica pode ser mais rápida e segura do que os métodos bioquímicos para a diferenciação de *M. bovis* de outros membros do complexo *M. tuberculosis* (OIE, 2000) e, apesar de detectar até uma micobactéria apenas, necessita de cuidados para evitar a contaminação da amostra com outro material de necropsia, podendo resultar em falso positivo (VITALE et al., 1998).

O Complexo *M. tuberculosis* (MTC) compreende um grupo de bacilos que possui um elevado grau de similaridade genética. Duas espécies deste grupo – *M. tuberculosis* e *M. bovis* – são os principais agentes causadores da doença em humanos e bovinos, respectivamente, sendo que o bacilo bovino tem uma gama de hospedeiros mais ampla, incluindo os seres humanos. Assim, a diferenciação dos grupos de micobactérias é de grande importância do ponto de vista de manejo e controle epidemiológico (SALES et al., 2014).

O padrão-ouro para o diagnóstico da TB bovina é o isolamento e subsequente identificação por métodos bioquímicos (BRASIL, 2006; TAYLOR et al., 2007; CARDOSO et al., 2009). Este método é demorado devido ao lento crescimento micobacteriano. A utilização de métodos moleculares baseados em PCR e suas variantes (PCR convencional, PCR multiplex, nested-PCR, PCR em tempo real e nested-PCR em tempo real) tem se mostrado promissoras, permitindo tanto resultados rápidos e precisos na identificação após o isolamento, bem como a detecção em amostras clínicas (ARAÚJO et al., 2014a, 2014b; SOINI; MUSSER, 2001).

No entanto, apesar de ser promissora, a sensibilidade destes métodos às vezes é baixa, principalmente em amostras com baciloscopia (LIMA et al., 2008). Além disso, o desenvolvimento de ensaios de PCR tem usado diferentes alvos genômicos, como *IS6110*, *16S rDNA*, *rpoB*, *recA*, e *hsp65*, que têm mostrado resultados discrepantes em sua sensibilidade e especificidade (NEONAKIS et al., 2008).

O gene *hsp65* é de uma proteína de choque térmico, altamente conservada, presente no gênero *Mycobacterium*, sendo considerada um alvo valioso para a utilização no diagnóstico molecular detectando e diferenciando micobactérias de não-micobactérias em amostras clínicas (ZAKHAM; BAZOUI; AKRIM, 2012). Já o gene *IS6110* é um elemento genético de inserção exclusivo do CMT, altamente conservado, de múltiplas cópias no DNA, variando no número de repetições de 1 a 22 dependendo da espécie, e apresenta um excelente potencial de amplificação (HALDAR; BOSE; CHAKRABARTI, 2011). Essa repetição é um fator que

aumenta a sensibilidade das amplificações quando comparada com uma única cópia em *hsp65* (COLLINS, 2011).

A escolha correta dos marcadores moleculares a serem detectados e o desenho dos iniciadores (*primers*) é crítico para o sucesso de uma reação de PCR no diagnóstico de tuberculose e detecção de micobactérias (SAKAMOTO et al., 1999). Os melhores resultados foram obtidos utilizando PCR com iniciadores MB.400 relacionadas com a deleção da região RD4, que foi indicada por outros estudos (BROSCH et al., 2002) como a mais adequada para a identificação de *M. bovis*; enquanto que o gene que codifica a proteína de choque térmico 65-kDa (*hsp65*) foi reportado como um alvo útil para a detecção de micobactérias (MACENTE et al., 2013).

A variação nos resultados quanto à especificidade e sensibilidade destes testes são devido a muitos fatores, tais como, o tipo de amostra utilizada, a utilização de diferentes metodologias de preparação de amostras, o sistema de amplificação e de detecção do produto amplificado, e o meio de protocolo confiável e padronizado por vários laboratórios (OIE, 2009).

O sucesso da técnica depende da disponibilidade de DNA livre de contaminantes, que interferem na amplificação, na escolha correta dos *primers* para a amplificação do material, assim como no emprego de métodos de extração adequados, especialmente para amostras paucibacilares (KLAUSTER et al., 1998; ZANINI et al., 2001; RUGGIERO, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

A investigação foi realizada em bubalinos em idade de abate, de ambos os sexos, procedentes de diversos municípios do Estado do Amapá e alguns municípios da região da Ilha de Marajó, no Estado do Pará, ambos no Norte do Brasil. Os animais foram abatidos para consumo em um matadouro-frigorífico fiscalizado pelo SIE da DIAGRO, situado no Município de Santana (00°02'20" N/51°03'59" W). A coleta das amostras utilizadas neste estudo foi realizada no período de novembro de 2014 a abril de 2015, totalizando 109 casos de bubalinos abatidos com lesões macroscópicas sugestivas de TB.

Os dados relacionados aos animais, como procedência, identificação da carcaça no matadouro, inspeção *post mortem*, características e localização das lesões, julgamento e destinação de carcaças e órgãos, foram levantados com o SIE, a partir de informações levantadas através de fichas do serviço de inspeção.

No acompanhamento do abate, foram observadas lesões macroscópicas sugestivas de TB a partir de órgãos (pulmões, intestinos, fígado, conjunto cabeça e língua), carcaças e/ou seus respectivos linfonodos, dos quais foram coletados amostras no decorrer das linhas de inspeção, após a sangria e evisceração, das quais foram obtidos fragmentos para estudo histopatológico, imunohistoquímico (IHQ) e molecular.

Para a análise histopatológica, as amostras foram acondicionadas individualmente em frascos plásticos contendo formol tamponado a 10% e identificados com os dados do animal, para envio ao laboratório. Já para as análises IHQ e molecular, as amostras foram acondicionadas em frascos plásticos sem formol, e congeladas para envio ao laboratório.

Na inspeção os critérios basearam-se no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA - Art. 196), referente aos casos de condenações por TB, além de periódicos e livros com considerações acerca da TB na inspeção, como em casos de TB generalizada.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Análise histopatológica

Para a análise histopatológica, o material foi processado através das técnicas habituais para inclusão em parafina, com a obtenção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) e Fite-Faraco (FF), para caracterização histopatológica das lesões e pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), respectivamente. As lâminas histopatológicas foram subsequentemente examinadas à microscopia de luz sob objetivas de 10 (100x) e 40 (400x).

No presente estudo, para a comprovação histológica da lesão macroscópica sugestiva de infecção por micobactérias, foram consideradas pelo menos uma das três condições sugeridas por França et al. (2013) para granulomas tuberculoides: i) presença de necrose caseosa, com ou sem calcificação, inflamação crônica com células de Langhans; ii) presença de necrose, calcificação e inflamação crônica ou iii) presença de células gigantes.

Na avaliação histomorfológica do granuloma tuberculoide, foi adotada a classificação histológica de Wangoo et al. (2005), que estabeleceu graduação das lesões em quatro estágios, definidos de acordo com sua evolução, conforme descritos abaixo:

- **Estágio I** (inicial): aglomerados irregulares de macrófagos epitelioides com infiltrado linfocitário associado e um pequeno número de neutrófilos. Raras células de Langhans. Lesão sem necrose e fibrose.
- **Estágio II** (sólido): os granulomas nesta fase são compostos principalmente de macrófagos epitelioides com infiltração de neutrófilos, linfócitos e muitas vezes células de Langhans. Hemorragia é frequentemente observada e áreas mínimas de necrose estão às vezes presentes e geralmente compostas por células inflamatórias necróticas. O processo está em parte ou completamente envolto por uma fina cápsula conjuntiva.
- **Estágio III** (mínima necrose): os granulomas estão totalmente encapsulados, com áreas centrais de necrose caseosa e mineralização, cercada por macrófagos epitelioides e com células de Langhans. Na zona mais periférica aos macrófagos aglomerados, há presença de linfócitos e neutrófilos que se estendem até a cápsula fibrosa.
- **Estágio IV** (necrose e mineralização): os granulomas são multicêntricos, grandes, irregulares e encapsulados, com necrose caseosa proeminente e áreas extensas de mineralização em grande parte da lesão. Presença de macrófagos epitelioides e células de

Langhans ao redor da necrose, com infiltrado denso de linfócitos junto à cápsula fibrótica periférica.

4.2.2. Análise imunohistoquímica

Para a análise IHQ, os cortes em lâminas positivadas (ImmunoSlide-EasyPath) foram desparafinizadas em estufa a 60°C, durante 60 minutos, e diafanizadas em soluções de xilol I e II, por 10 minutos cada. Em seguida, os cortes foram reidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%) a cada dois minutos e, posteriormente, foram lavados em água destilada por 10 vezes.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada durante 15 minutos, à temperatura ambiente, e as amostras foram novamente lavadas em água destilada. O bloqueio de proteínas inespecíficas, a fim de se evitar a formação de ligação cruzada, foi realizado incubando-se os cortes com leite em pó desnatado (Molico[®]) a 5% diluído em solução tampão de fosfato (PBS), durante 30 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com as lâminas imersas em solução tampão de citrato de sódio a 10mM (pH 6.0), em forno de micro-ondas na potência máxima (5 minutos). Para evitar a evaporação, adicionou-se, quando necessário, solução tampão (citrato de sódio ou PBS). Após o resfriamento das lâminas, procedeu-se a nova lavagem em água destilada.

Foi utilizando o método peroxidase anti-peroxidase (PAP), onde, após a aplicação de 100 µL de anti-soro policlonal de coelho contra o *M. bovis* (Dako B0124) na diluição de 1:1000 em solução tampão (PBS), as secções foram incubadas em câmara úmida por 12-14 horas ("overnight") a 4°C. Depois desse procedimento, incubou-se o complexo streptavidina-biotina (LSAB) com o anticorpo secundário biotilado universal durante 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a lavagem com tampão TBS (solução TRIS salina tamponada) seguida de incubação pela streptavidina (20 minutos), em temperatura ambiente, e posterior lavagem com água destilada.

As reações foram reveladas utilizando o cromógeno diaminobenzidina (DAB; Peroxidase substrate - Kit DAB K3466, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) durante 5 minutos, seguido de lavagem em água destilada. A contra coloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Harris, com permanência de um minuto. As lâminas foram lavadas em água corrente e passaram por desidratações sucessivas, a cada 1 minuto, em banhos de álcool

etílico (70%, 80%, 90% e 100%) e em duas soluções de xilol. A montagem das lâminas foi realizada com Entelan[®].

4.2.3. Análise molecular

4.2.3.1. Obtenção do DNA

O DNA foi extraído diretamente do linfonodo e tratado com proteinase K e purificado pelo método do fenol-clorofórmio (ASSIS et al., 2007), seguindo modificações descritas por Furlaneto et al. (2007). A biópsia foi macerada e adicionada de 150 µl de tampão de homogeneização (tris-HCL 1M, pH 8,0; NaCl 1M; EDTA 0,5M, pH 8,0; sacarose), 150 µl de tampão de lise (tris-HCL 1M, pH 9,0; EDTA 10mM, pH 8,0; sucrose 20%, SDS 10%) e 10 µl de proteinase K (10 mg/ml). Esta mistura foi incubada a 56°C por 12 horas. À temperatura ambiente, foram adicionados 300µl de fenol tamponado (PA), depois homogeneizados por 10 minutos e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. A extração foi repetida com 300 µl de clorofórmio, seguido por 300 µl clorofórmio-álcool isoamil (24:1), intercalados por etapa de homogeneização por 10 minutos e centrifugação (13000 rpm/10 min). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionou-se 100 µl de acetato de sódio (3M, pH 4,8) e 500 µl de isopropanol, para precipitação do DNA. O DNA foi, então, lavado com 500 µl de etanol a 70%, seco a 37°C e ressuspensão em água ultrapura. Para cada processo de extração, foi incluído um controle negativo que recebeu o mesmo tratamento das amostras.

4.2.3.2. Amplificação do DNA

As amostras foram submetidas a dois protocolos de amplificação, ambos qualitativos, cada um com determinado objetivo. Para investigar a presença de DNA específico de *M. bovis*, foi usada PCR convencional para um alvo que flanqueia uma região de deleções genômicas sequenciais irreversíveis (*Region of Difference 4 – RD4*), a qual amplifica um fragmento de 400pb apenas para a espécie *M. bovis* (*primers Mb.400 F/R*), conforme estudos prévios (LÁZARO SALES et al., 2014).

Nos casos negativos para o *M. bovis*, foram realizadas Nested-PCR utilizando iniciadores específicos para o gênero *Mycobacterium* (TELENTI et al., 1993), que amplificam um segmento de 441 pb do gene que codifica uma proteína de choque térmico (*heat shock protein*) de 65-kDa (hsp65), a fim de esclarecer se nestes casos havia micobactérias que não o bacilo causador da TB bovina.

Como controles foram utilizados DNA de *M. bovis* BCG (Isogen, Bioscience, Holanda), *M. tuberculosis* H37Rv e os controles ‘brancos’ de extração e PCR.

As reações de PCR para a sequência alvo do *M. bovis* (flanqueadora da RD4 do *M. bovis*) foram realizadas para um volume de 25 µl contendo 2 mM de MgCl₂, 0.12 mM de cada desoxinucleotídeo, 0.5 pmol de cada iniciador (Mb.400.F – AACGCGACGACCTCATATTC e Mb.400.R – AAGGCGAACAGATTCAGCAT), solução Q[®], tampão da Taq 1X, 1.0 U da enzima Taq DNA polimerase (Qiagen, Holanda) e 4 µL do produto da extração.

A primeira reação da Nested-PCR para amplificar o alvo gênero específico utilizou 2 mM de MgCl₂, 0.12 mM de cada desoxinucleotídeo, 0.5 pmol de cada iniciador (hsp65.A – CAATTGCGTACGACGAAGAG e hsp65.B – CGGATCTTGTTGACGACCA), solução Q[®], tampão da Taq 1X, 1.0 U da enzima Taq DNA polimerase (Qiagen, Holanda) e 4 µL do produto da extração, e a segunda utilizou 2.5 mM de MgCl₂, 0.12 mM de cada desoxinucleotídeo, 0.5 pmol de cada iniciador (Tb11 – ACCAACGATGGTGTGTCCAT e Tb12 – CTTGTCTGAACCGCATACCCT), solução Q[®], tampão da Taq 1X, 1.0 U da enzima Taq DNA polimerase (Qiagen, Holanda) e 4 µL do produto da primeira PCR, ambas para um volume final de 50 µL. As condições de termociclagem foram realizados em um termociclador Veriti[®], (Applied Biosystems) (Quadro 1) e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com SYBRsafe (Invitrogen) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

Quadro 1 - Condições de termociclagem

Reação	Ciclos	Temperatura/Tempo
PCR convencional <i>M. bovis</i>	1 x	95°C/10 minutos
	40 x	94°C/1 minuto
		64°C/1 minuto
		72°C/1 minuto
	1 x	72°C/7 minutos
Nested-PCR Reação 01 Gênero <i>Mycobacterium</i>	1 x	95°C/15 minutos
	30 x	95°C/1 minuto
		50°C/1 minuto
		72°C/1 minuto
		72°C/10 minutos
Nested-PCR Reação 02 Gênero <i>Mycobacterium</i>	1 x	95°C/15 minutos
	40 x	94°C/1 minuto
		50°C/1 minuto
		72°C/1 minuto
	1 x	72°C/7 minutos

4.2.4. Análise estatística

Os dados referentes às características epidemiológicas e clínicas foram tratados utilizando estatística descritiva, expressos sob a forma de frequências absoluta e relativa e apresentados em tabelas e/ou gráficos.

A associação entre variáveis categóricas foi avaliada utilizando o teste G de independência, e distribuição de casos de acordo com as categorias foi avaliada pelo Qui-Quadrado de Aderência.

A diferença entre as proporções de casos observados de acordo com a sua classificação em cada categoria (localização das lesões, estágio de desenvolvimento das lesões) observada foi avaliada utilizando o Qui-quadrado (ou o teste G, conforme o caso) de aderência, e a associação entre variáveis categóricas (localização das lesões *versus* região de origem do animal, casos positivos ou negativos em cada teste *versus* estágio das lesões) foi efetuada utilizando o teste do Qui-Quadrado (ou teste G, conforme a necessidade) de independência e, no caso de associação significativa, a análise foi complementada pela Análise de Resíduos do Qui-Quadrado.

Para a análise molecular, considerou-se a diferença entre as proporções de casos observados de acordo com a positividade para os marcadores, avaliada através do teste Qui-Quadrado (Aderência) e a associação entre variáveis categóricas (casos positivos ou negativos *versus* estágio das lesões) estimada utilizando o teste do Qui-Quadrado (ou teste G, conforme a necessidade) e, no caso de associação significativa, a análise foi complementada pela Análise de Resíduos do Qui-Quadrado.

A concordância entre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas utilizadas foi estimada pela estatística Kappa (k), sendo que $k > 0.75$ denota excelente reprodutibilidade, $0.40 \leq k \leq 0.75$ denota boa reprodutibilidade e $0 \leq k < 0.40$ representa reprodutibilidade fraca ou marginal (ROSNER, 2011). Todos os testes foram executados com o auxílio do software BioEstat 5.4 (AYRES et al., 2008), e resultados com $p \leq 0.05$ (bilateral) foram considerados significativos.

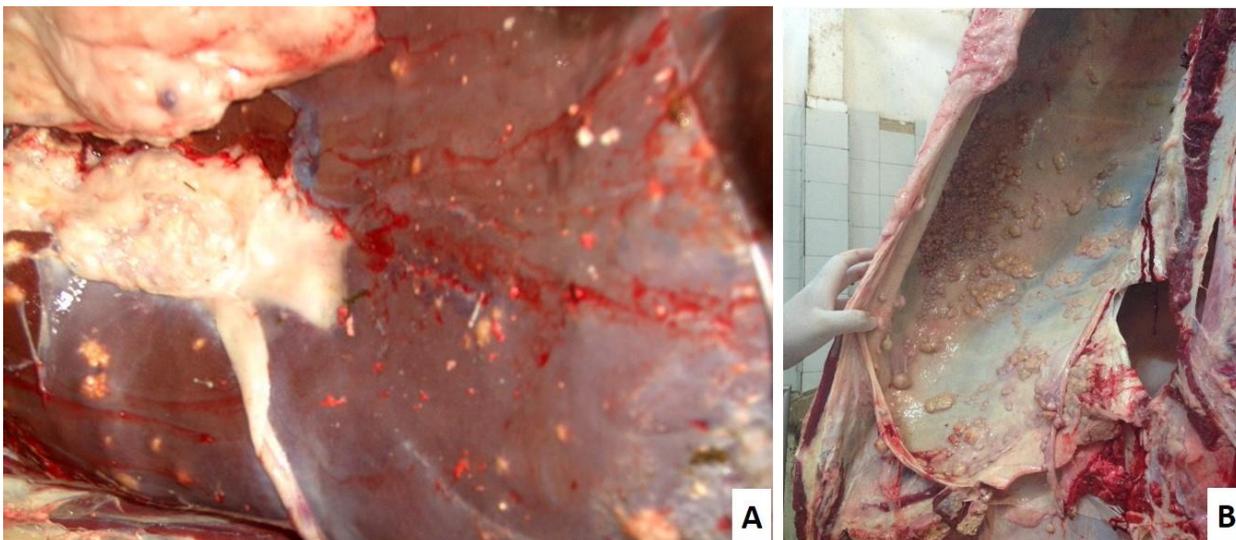
5. RESULTADOS

As características das lesões sugestivas (LS) de TB variaram desde pequenas alterações nos linfonodos, variando em coloração de branca a branco-amarelada, com aumento em suas dimensões, a lesões granulomatosas de maiores extensões, caracterizadas como tubérculos, de aspecto nodular, constituído de massa amorfa, repleta de material caseoso encapsulado, encontrando-se em alguns casos bem delimitados, ou ainda irregulares e dispersos nas carcaças e/ou vísceras (Figura 2A), bem como no conjunto cabeça e língua.

Ao corte, tais lesões apresentaram-se ora macias com conteúdo pastoso de coloração amarelada, ora podendo-se sentir o ranger da lâmina com áreas calcificadas, e ainda de aspecto petrificado, no qual nesse último caso, não foi possível realizar o corte de tal lesão, pois se apresentava dura, com aspecto de ‘pedra’, sendo que na maioria das amostras evidenciou-se a presença de mineralização, portanto, uma forma calcificada de tuberculose.

Em grande parte dos casos diagnosticados as lesões mostraram-se na forma de pequenos pontos transparentes, ou nodulações, encontrados dispersos em vários órgãos, e principalmente, disseminadas na carcaça e seus linfonodos, o que caracteriza a TB miliar ou TB generalizada (Figura 2B).

Figura 2 – (A) Nódulos hepáticos de lesões sugestivas de tuberculose. (B) Carcaça com tuberculose miliar.



Fonte: Arquivo pessoal.

A avaliação macroscópica através de LS de TB durante a inspeção *post mortem* é a única medida empregada para o diagnóstico da enfermidade no frigorífico no qual foi realizada a presente pesquisa. Dos 109 búfalos abatidos com LS de TB, 69 casos (63,3%) foram notificados em animais do Amapá e 40 (36,7%) de regiões do Estado do Pará (Tabela 1).

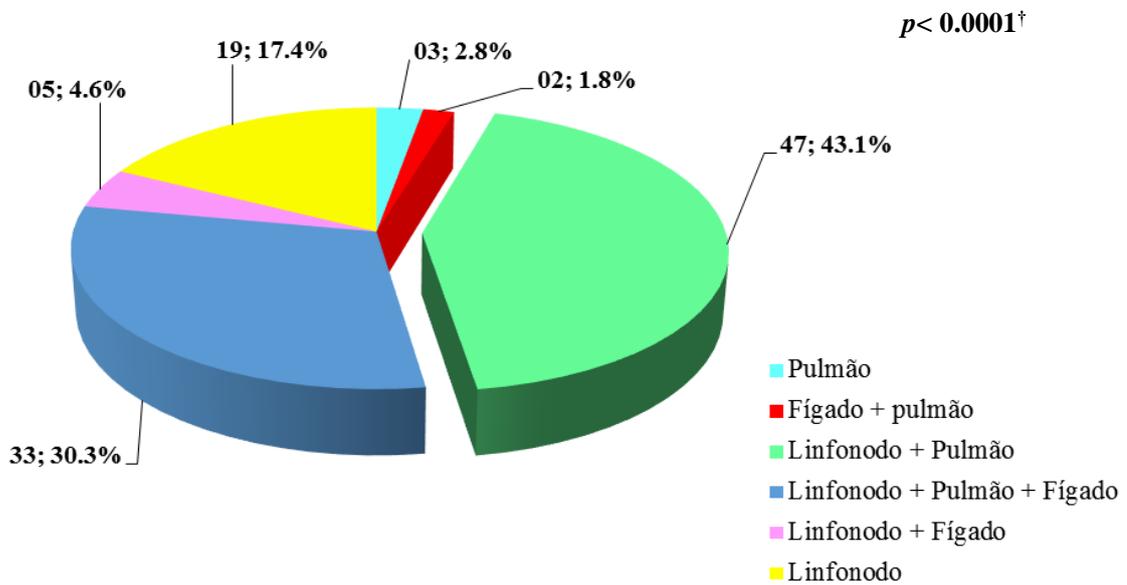
Tabela 1 – Distribuição dos animais com lesões sugestivas de tuberculose de acordo com o estado e município de procedência, abatidos no período de novembro de 2014 a abril de 2015. Amapá e Pará, 2014-2015.

Estado de origem	Frequência	
	N	(%)
Amapá		
Pracuúba	01	1.5
Ferreira Gomes	01	1.5
Tartarugalzinho	09	13.0
Itaubal	11	15.9
Macapá	21	30.4
Amapá	12	17.4
Cutias	14	20.3
Total	69	100
Pará		
Chaves	21	52.5
Almeirim	09	22.5
Prainha	08	20
Afuá	02	05
Total	40	100

Fonte: Protocolo de Pesquisa.

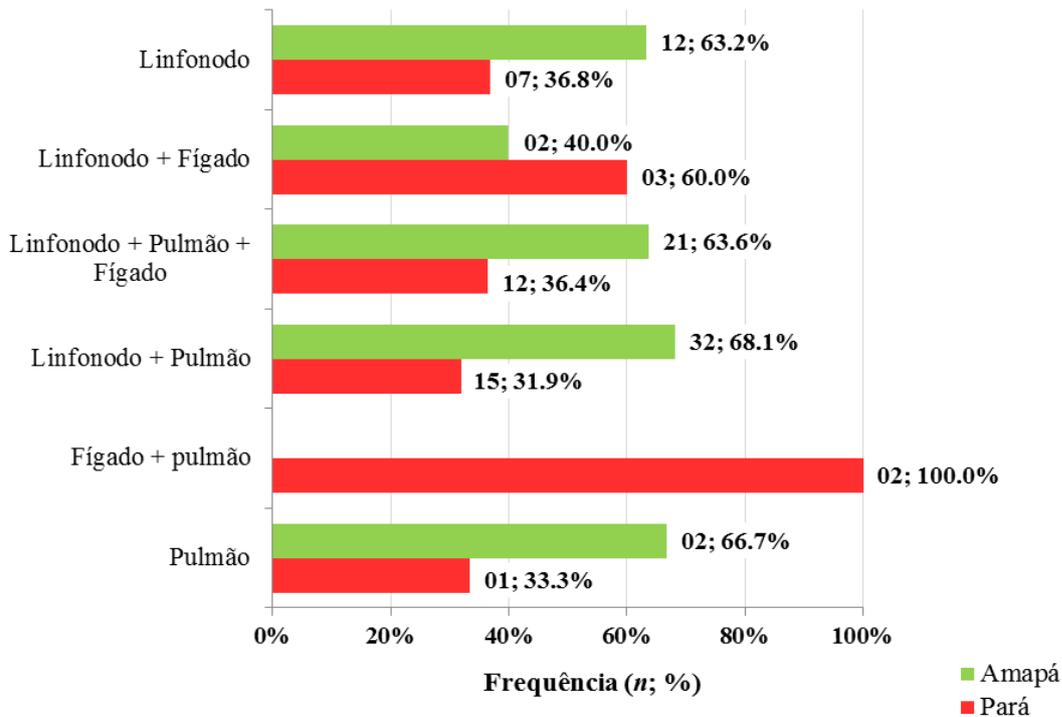
Dentre as 109 carcaças avaliadas nesse estudo, a maior parte das LS de TB situava-se no conjunto linfonodo e o pulmão (47/109, 43,1%), seguido pelo conjunto linfonodo, pulmão e fígado (33/109, 30,3%), sendo observado menor número de lesões no conjunto fígado e pulmão (02/109, 1,8%), exclusivamente nos pulmões (03/109, 2,8%) e no linfonodo e fígado (05/109, 4,6%) ($p < 0.0001$) (Gráfico 1). Em relação à distribuição de casos, quanto à localização das lesões e a origem do animal, não foi observada diferença significativa entre os estados considerando-se o sítio de coleta ($p = 0.4169$) (Gráfico 2).

Gráfico 1 – Distribuição das lesões sugestivas de tuberculose, de acordo com a localização da lesão em bubalinos incluídos no estudo. Amapá e Pará, 2015.



Fonte: Protocolo de pesquisa.
 $p < 0.0001$ (Qui-Quadrado de Aderência). † Estatisticamente significativo.

Gráfico 2 – Frequência de bubalinos com lesões sugestivas de tuberculose, abatidos para consumo no estado do Amapá, de acordo com a localização da lesão e a região de origem dos animais, no período de novembro de 2014 a abril de 2015.

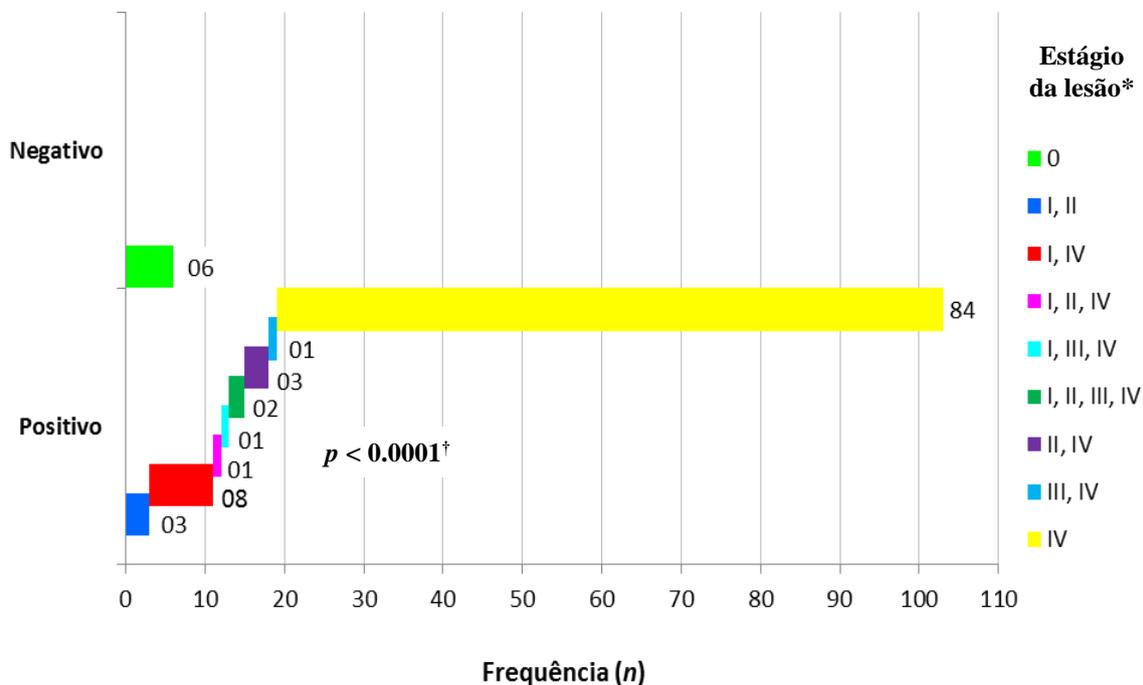


Fonte: Protocolo de pesquisa.
 $p = 0.4169$ (Teste G de Independência).

Todos os 109 casos com diagnóstico macroscópico sugestivo de TB foram avaliados pelas técnicas de histopatologia e imunohistoquímica (IHQ). Destes, considerando as condições sugeridas por França et al. (2013) para a comprovação histológica da lesão macroscópica sugestiva de infecção por micobactérias, 94,5% (103/109) puderam ser confirmados por esta técnica, apresentando histologicamente reação tecidual granulomatosa típica de lesão tuberculose (LT) e característica de um “granuloma completo”, descrito para bovinos por Wangoo et al. (2005) e Andreazza et al. (2015), com necrose caseosa central e frequente mineralização, rodeada por um infiltrado inflamatório de células epitelioides, macrófagos, linfócitos e, em todos os casos, presença de células gigantes de Langhans, e na periferia uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso.

Entre os 103 casos (94,5%) que atendiam aos critérios sugeridos por França et al. (2013), considerados como granulomas do tipo tuberculose, a maioria (84/103; 81,6%) apresentou lesão apenas no estágio IV de acordo com a classificação de Wangoo et al. (2005) ($p < 0.0001$) (Gráfico 3). Quanto aos os demais casos (06/109, 5,5%), estes não apresentaram nenhuma das condições que os caracterizassem como granulomas tuberculoides.

Gráfico 3 – Distribuição dos casos com lesões sugestivas de tuberculose ao exame macroscópico, de acordo com a análise histopatológica das lesões e o estágio da lesão*. Macapá, 2014-2015.



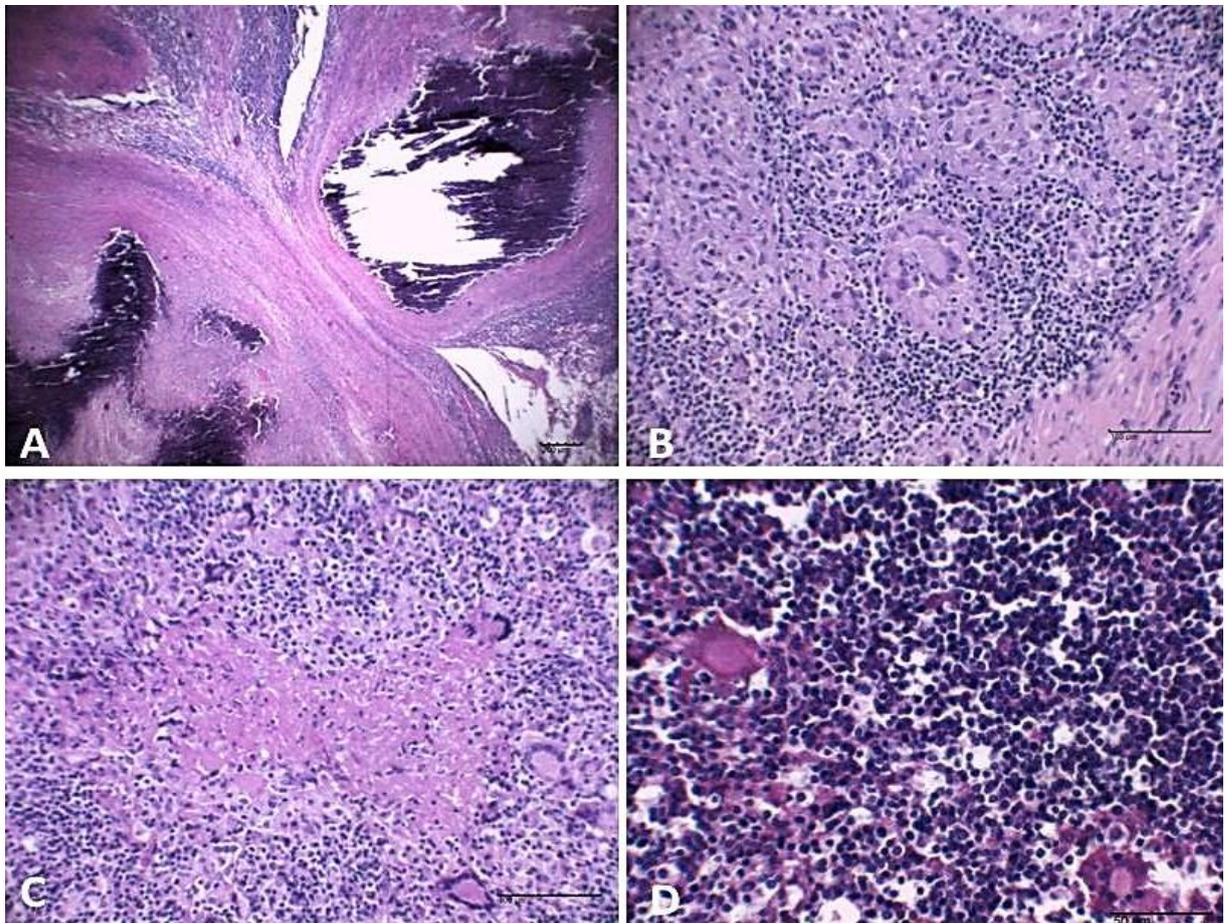
Fonte: Protocolo de pesquisa.

*Classificado de acordo com Wangoo et al. (2005).

$p < 0.0001$ (Teste G de Aderência). †Estatisticamente significativo.

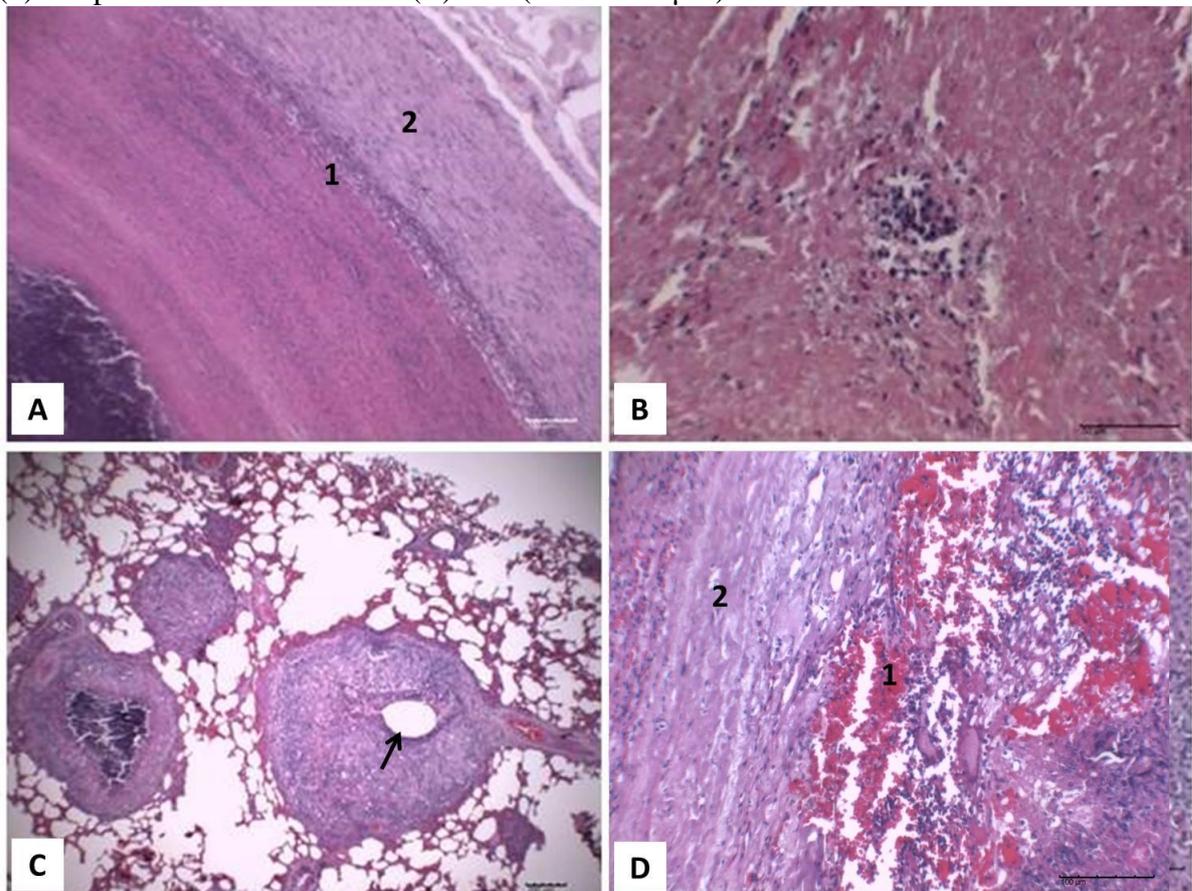
A LT em estágio inicial (I), sempre associada com lesões em outros estágios (Gráfico 3), estava presente em 14,6% (15/103) dos casos, sendo observados granulomas sem necrose de caseificação (NC) e fibrose, apresentando aglomerados irregulares de macrófagos epitelioides com infiltrado linfocitário associado (Figura 3B) e presença de raras células de Langhans (CL), alterações estas que em todos os casos estavam associadas a outros estágios de desenvolvimento do processo granulomatoso. Lesão em estágio II (Figura 3C) foi observada em 8,8% (09/103) dos casos de LT, também associada a outras fases de evolução do granuloma (Gráfico 1); em três casos estavam presentes CL, infiltradas no tecido linfóide de linfonodos acometidos (Figura 3D), sem evidências de reação granulomatosa associada, provavelmente um estágio inicial de desenvolvimento de processo tuberculoide. A hemorragia estava ocorrendo em apenas 1,9% (02/103) dos casos no estágio IV da LT.

Figura 3 - (A) Linfonodo: lesão tuberculoide (LT) com multifocos, coalescentes de necrose de caseificação (NC) e calcificação. HE (barra= 200µm). (B). Linfonodo: LT estágio I, com células epitelioides, células Langhans (CL), linfócitos e ausência de NC, sem calcificação. HE (barra= 100µm). (C). Linfonodo: LT estágio II, com reação linfo-macrofágica, presença de NC, sem calcificação. HE (barra= 100µm). (D). Linfonodo: CL distribuída aleatoriamente pelo tecido linfonodal, sem evidência de LT. HE (barra= 50µm).



Histologicamente, 97,1% (100/103) dos casos apresentavam lesões no estágio IV (Figura 4A), nos quais 84% (84/100) estava isolada e 16% (16/100) estava presente em associação com lesões em outros estágios de evolução (Gráfico 3). Quanto à presença de neutrófilos, 69,9% das LT (72/103) não apresentavam esse tipo celular e, quando presente, os infiltrados eram de grau leve a moderado, situando-se dispersos ou em pequenos agrupamentos na região de células macrofágicas ou em área de necrose caseosa (Figura 4B). Em 25,2% (26/103) dos casos as LT foram de origem pulmonar, e em todos eles se observou o comprometimento bronquiolar (Figura 4C). A LT hepática estava presente em 17,5% (18/103) dos casos, e como nos pulmões, o processo mostrou-se multicêntrico e a reação fibrótica mais expressiva (Figura 4D).

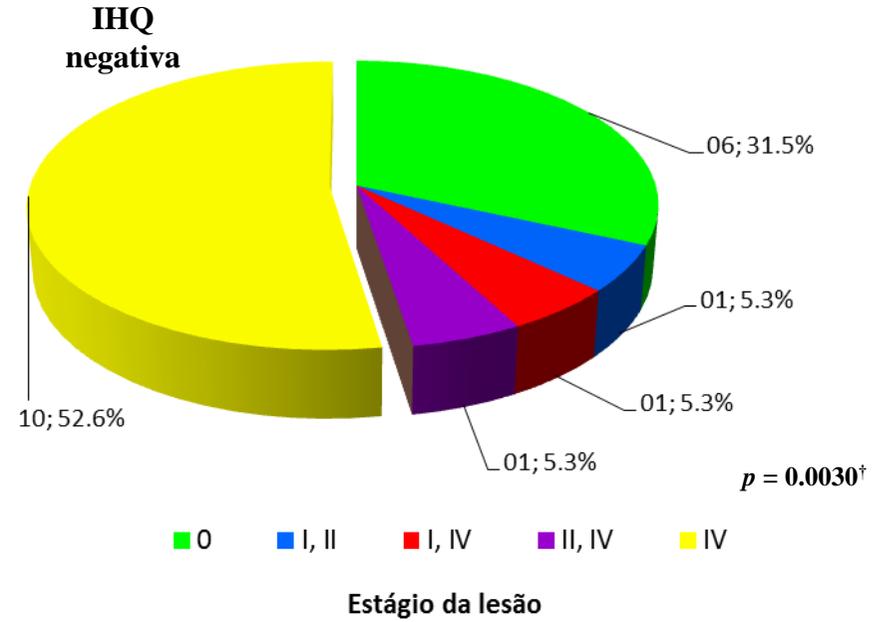
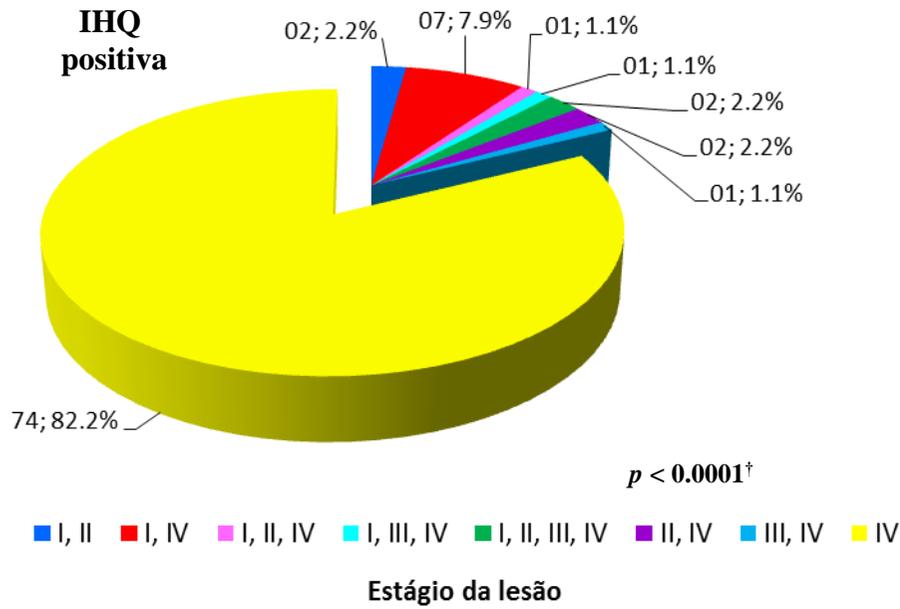
Figura 4 - (A). Pulmão: LT estágio IV, demonstrando caráter mais crônico, com pequena reação celular (1) e maior espessamento da capsula conjuntiva (2). HE (barra= 100µm). (B). Linfonodo: Necrose de caseificação com piócitos dispersos e em pequenos agregados. HE (barra= 50µm). (C). Pulmão: multifocos granulomatosos, com comprometimento bronquiolar (seta). HE (barra= 200µm). (D). Fígado: Lesão em estágio IV, com a presença de hemorragia (1) e cápsula bem desenvolvida (B). HE (barra= 100µm).



Fonte: Arquivo pessoal.

Em relação aos resultados obtidos através da IHQ, dentre os casos positivos por essa técnica todos apresentavam algum tipo de lesão, classificada em diversos estágios pelo exame histopatológico, sendo observado que a maioria delas (74/90, 82,2%; $p < 0.0001$) estava apenas no estágio IV da classificação proposta por Wangoo et al (2005). Entre os casos negativos, lesões necróticas apresentando-se apenas no último estágio de desenvolvimento (IV) também foram as mais frequentes (52,5%, 10/19), e 31,5% (06/19) também foram negativos no histopatológico ($p = 0.0030$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Distribuição dos casos com lesões sugestivas de tuberculose de acordo com o resultado da Imunohistoquímica (IHQ) e o estágio da lesão. Macapá, 2014-2015.

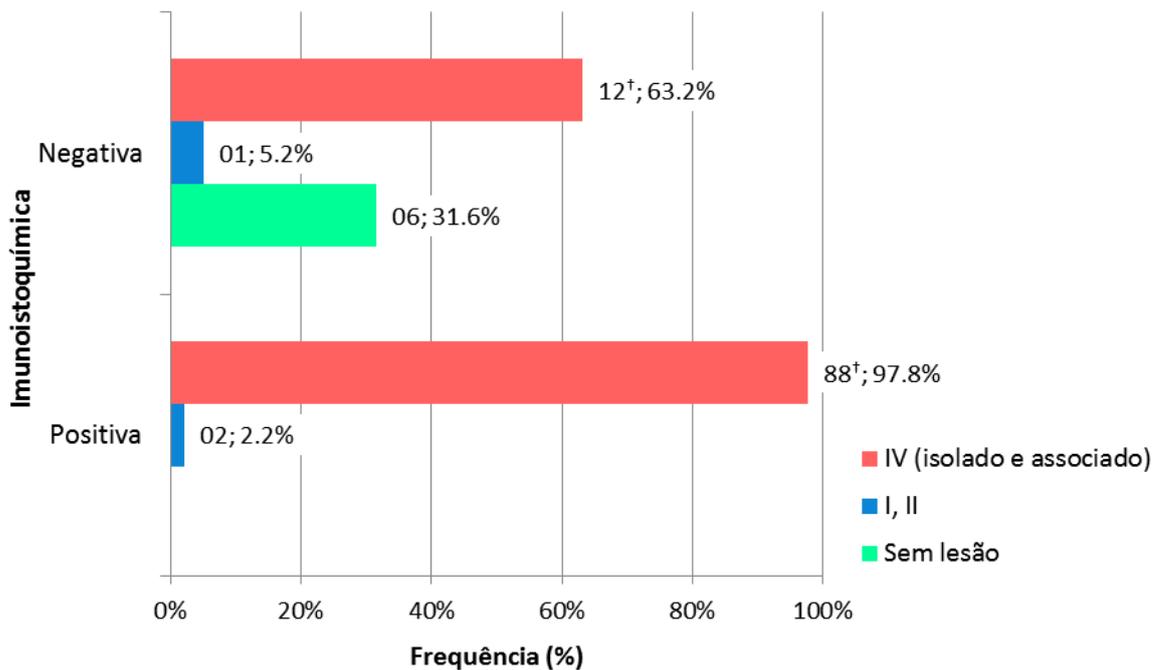


Fonte: Protocolo de pesquisa.

$p < 0.0001/p = 0.0030$ (Teste G de Aderência). † Estatisticamente significativo.

Notou-se associação significativa entre a positividade pela IHQ e as lesões que apresentavam necrose e mineralização (estágio IV apenas ou associado) e também entre o resultado negativo por essa técnica e a ausência de lesões ao histopatológico ($p < 0.0001$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Distribuição dos casos com lesões sugestivas de tuberculose de acordo com o resultado da Imunohistoquímica (IHQ) e o estágio da lesão. Macapá, 2014-2015.



Fonte: Protocolo de pesquisa.

$p < 0.0001$ (Teste G de Independência/Análise de Resíduos do Qui-Quadrado). †Estatisticamente significativo.

Quanto à concordância, a reprodutibilidade entre resultados obtidos pela histopatologia e IHQ foi classificada como “boa” ($k = 0.4325$, $p < 0.0001$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação dos resultados obtidos através das técnicas histopatológicas e imunohistoquímica na análise de lesões sugestivas de tuberculose ao exame macroscópico. Macapá, 2014-2015.

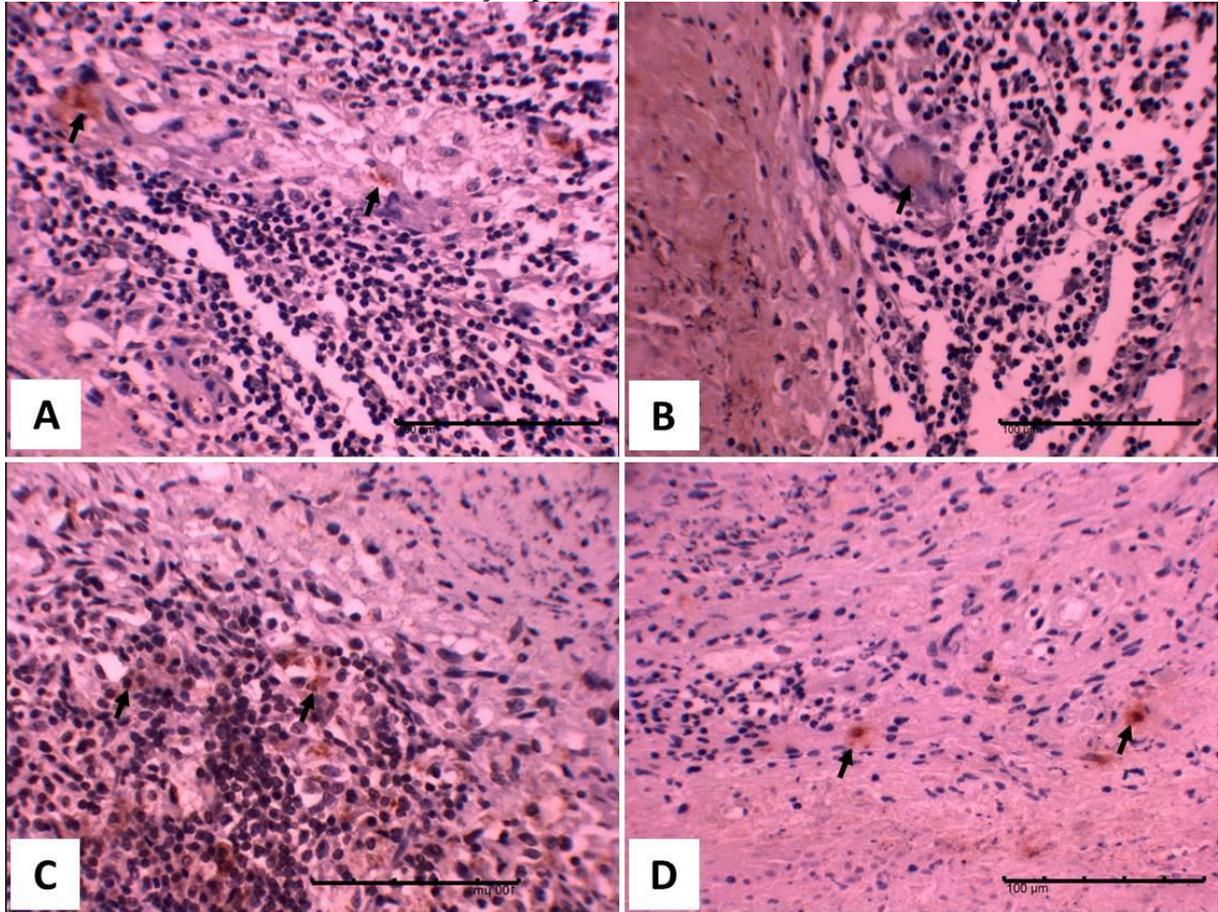
	Histopatológico		Kappa (interpretação ^a)	p-valor*
	Positivo n (%)	Negativo n (%)		
Imunohistoquímica				
Positiva	90 (87,4)	0 (0)	0,4325 (Boa)	< 0,0001 [†]
Negativa	13 (12,6)	06 (100)		

Fonte: Protocolo de Pesquisa.

^aRosner B, 2011. *Teste Kappa. [†]Estatisticamente significativo.

A imunomarcagem de *M. bovis* nas LT de bubalinos do presente estudo ocorreu em 82,6% (90/109) dos casos. Nos casos positivos à IHQ, a marcação foi mais observada em macrófagos epitelioides (Figura 5A) ocorrendo em menor proporção nas células gigantes (Figura 5B). Na área necrótica também houve positividade na coloração IHQ para o *M. bovis* (Figura 5C) em 21,8% dos casos. Neste estudo, as células epitelioides da periferia do granuloma eram mais positivamente coradas do que as células epiteliais próximas a zona necrótica central (Figura 5D).

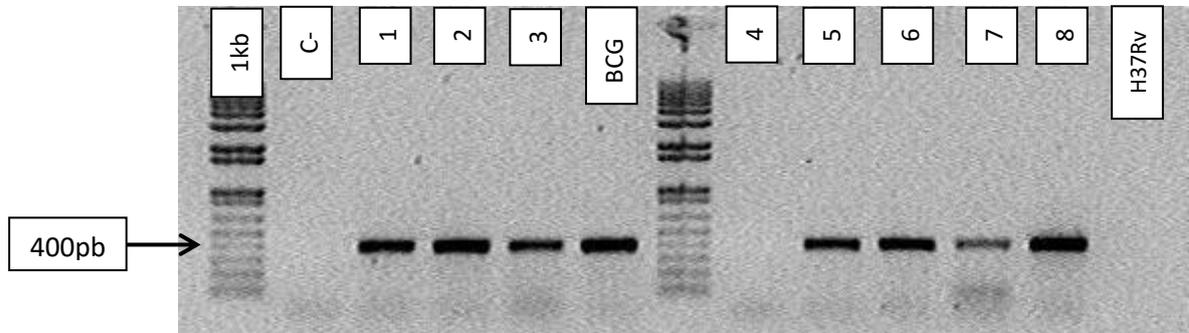
Figura 5 – Fotomicrografia de linfonodos bubalinos. Imunomarcação anti-*Mycobacterium bovis*, corando o antígeno específico *M. bovis* de cor marrom. (A) Em macrófagos epitelioides (setas). (B) Em célula gigante Langhans (seta). (C) Em células epitelioides e linfócitos da periferia do granuloma (setas). (D) Em macrófagos em área de necrose (setas). (Polyclonal primary antibody (DAKO, B0124) na diluição de 1:1000 com revelação pelo método diaminobenzidina (DAB) e contrastação pela Hematoxilina de Harris. Bar 100µm.



Fonte: Arquivo pessoal.

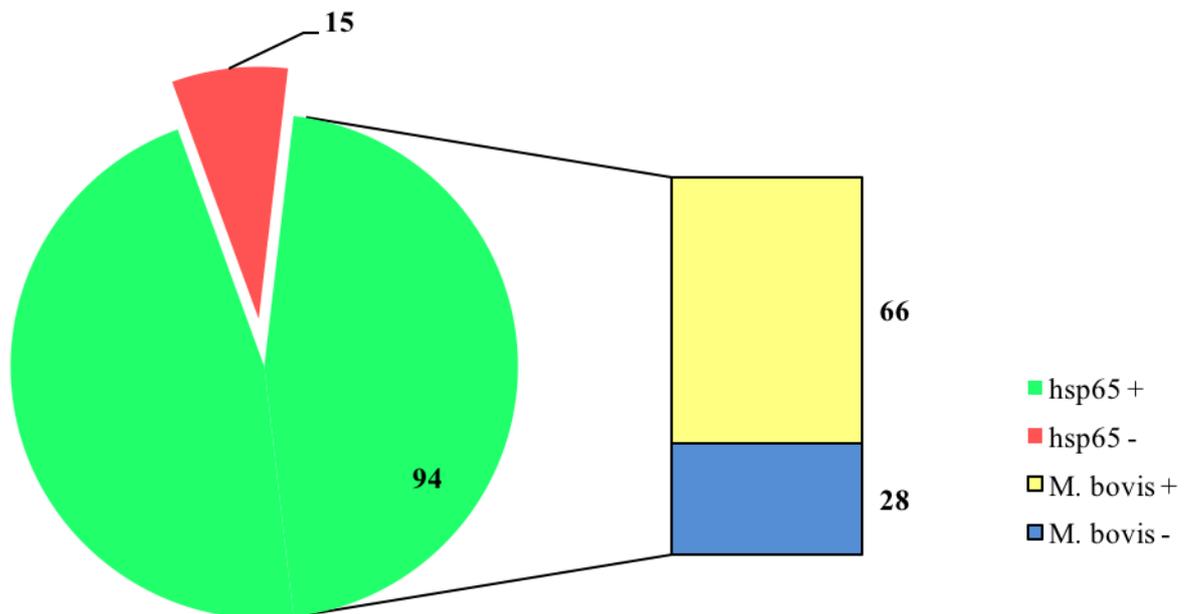
Das 109 amostras incluídas no estudo – todas com diagnóstico macroscópico presuntivo de TB –, a maioria (66/109, 60,6%; $p = 0.0351$) apresentou reação de PCR positiva para o alvo exclusivo de *M. bovis* (Figura 6) e, em 65,1% (28/43; $p = 0.0673$) das negativas para este alvo houve amplificação do fragmento de 441 pb presente nos bacilos do gênero *Mycobacterium* (*hsp65* positivo) (Gráfico 6). Não houve amplificação dos controles negativos e os controles positivos apresentaram os perfis esperados.

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos após reação para amplificação do fragmento de 400 pares de base do genoma de *M. bovis*. 1kb: marcador de peso molecular de 1kb. Colunas numeradas de 1 a 8: amostras. C-: controle negativo de PCR. BCG e H37Rv: cepas controle.



Fonte: Arquivo pessoal.

Gráfico 6 – Distribuição das amostras com diagnóstico macroscópico sugestivo de tuberculose, de acordo com a positividade para os marcadores moleculares do gênero *Mycobacterium* e da espécie *M. bovis*. Macapá, 2014-2015.



Fonte: Protocolo de Pesquisa.

hsp65: heat shock protein 65kDa. CMTB: Complexo *M. tuberculosis*

Dentre as 15 amostras que não apresentaram amplificação do alvo específico para o gênero *Mycobacterium*, 73,3% (11/15) foram classificadas como granuloma tuberculoide pelo exame histopatológico, com 91,0% (10/11) apresentando lesões com evolução até o estágio IV, e 66,7% (10/15) apresentaram imunomarcção na IHQ (Tabela 03).

Todos os casos foram submetidos previamente ao exame histopatológico para verificar a presença de granulomas do tipo tuberculoide e também testados por IHQ, a fim de pesquisar material antigênico de micobactérias. Do total de casos incluídos, 103 (94,5%) foram definidos como granulomas do tipo tuberculoide ao exame histopatológico, com 97,1% (100/103) contendo lesões desenvolvidas até o estágio IV da classificação proposta por Wangoo et al. (2005) e seis (5,5%) foram negativos por essa técnica. Pela IHQ, 82,6% (90/109) dos casos foram positivos, sendo observado que 97,8% (88/90) continha lesões em estágio IV. Entre os casos negativos, 63,2% (12/19) apresentavam lesões no último estágio de desenvolvimento (IV) e 31,5% (06/19) também foram negativos no histopatológico.

Desta forma, quanto à concordância entre os resultados obtidos pela técnica molecular – considerando apenas a positividade para o gênero *Mycobacterium*, já que a IHQ e o histopatológico não diferenciam entre as espécies do gênero – e os demais métodos utilizados, observou-se que a positividade entre a técnica molecular e as demais não era independente ($p < 0.0001$), porém esta concordância mostrou-se ‘fraca’ em relação à histopatologia ($k = 0.3281$) e ‘boa’ em relação à positividade pela IHQ ($k = 0.4260$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise de concordância entre os resultados obtidos com as técnicas molecular, histopatológica e imunohistoquímica na detecção de micobactérias em amostras de lesões sugestivas de infecção tuberculosa. Macapá, 2014-2015.

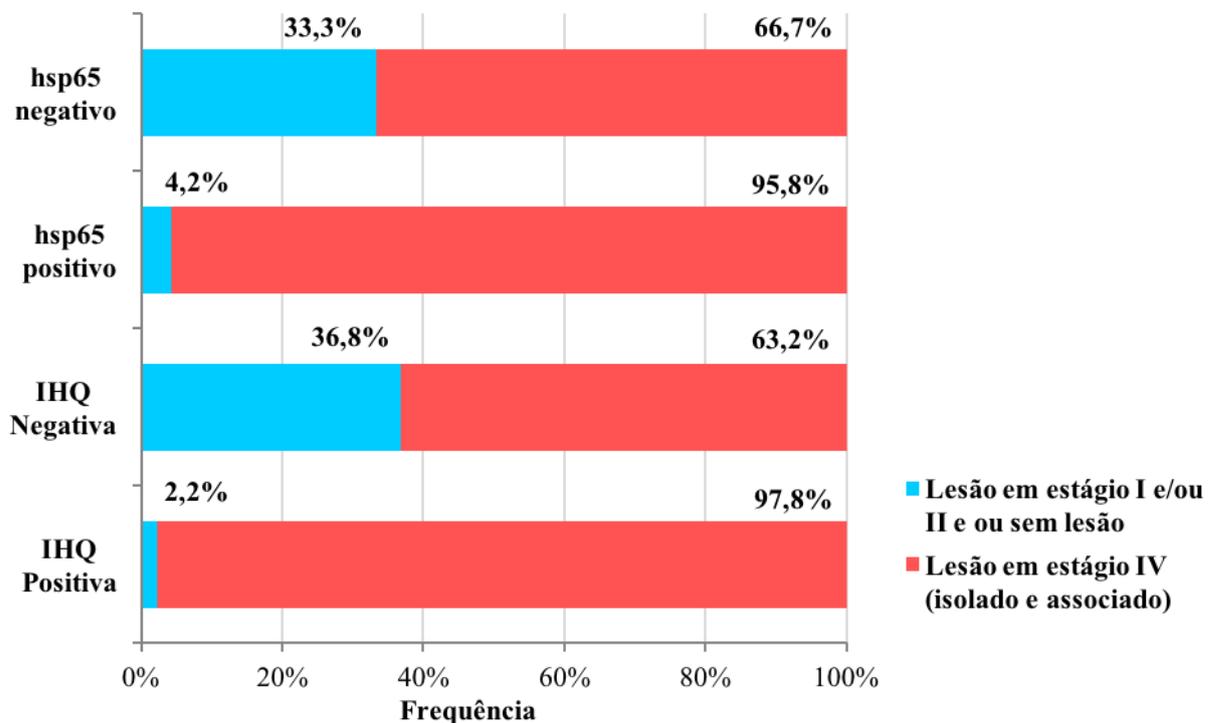
Técnica	Identificação molecular para o gênero <i>Mycobacterium</i> (<i>hsp65</i>)		Concordância (k) (interpretação)	p -valor*
	Positivo n (%)	Negativo n (%)		
Histopatologia				
Positivo	92 (97,9)	11 (73,3)	0.3281 (Fraca)	< 0.0001 [†]
Negativo	02 (2,1)	04 (26,7)		
Imunohistoquímica				
Positivo	80 (85,1)	10 (66,7)	0.4260 (Boa)	< 0.0001 [†]
Negativo	14 (14,9)	05 (33,3)		

* Teste Kappa. [†]Estatisticamente significativo.

Fonte: Protocolo de Pesquisa.

Considerando os resultados positivos e negativos para o alvo *hsp65* quando considerada a presença ou ausência de amostra com lesão em estágio IV ou sem lesão em estágio IV ou negativa pela histologia, notou-se que a ausência de amplificação estava significativamente associada à ausência de lesão ou lesões em estado menos avançado (I e/ou II) pelo exame histopatológico ($p < 0.01$), assim como a positividade estava diretamente associada à presença de lesão em estágio IV ($p < 0.01$). Também se observou associação significativa entre os resultados positivos pela IHQ e a maior frequência de casos com lesões crônicas (estágio IV) ($p < 0.01$), e também entre a ausência de imunomarcação e os casos classificados histologicamente como “sem lesões” e lesão em “estágio I ou II” ($p < 0.01$) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Distribuição das amostras com diagnóstico macroscópico sugestivo de tuberculose, de acordo com a presença de imunomarcação por IHQ e amplificação por PCR para o alvo em micobactérias e a presença de lesões em diferentes estágios de desenvolvimento ao exame histopatológico. Macapá, 2014-2015.



IHQ: imunohistoquímica. PCR: reação em cadeia mediada pela polimerase.
 $p = 0.0001^\dagger$ (Teste G de independência). † Estatisticamente significativo.
 Fonte: Protocolo de Pesquisa.

Por questões técnicas, a pesquisa de BAAR (Fite Faraco) foi possível para 102 das 109 amostras do estudo, das quais em 54,0% (55/102) foi possível a visualização de bacilos. Dentre essas, todas eram positivas pelo exame histopatológico, 96,3% (52/54) apresentaram imunomarcção e 91,0% apresentaram amplificação do alvo molecular presente nas espécies do gênero *Mycobacterium*.

Quanto à concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas utilizadas e a pesquisa de BAAR nas peças, observou-se que os resultados alcançados pela IHQ e histopatologia, embora demonstrando fraca concordância, não eram independentes ($p = 0.0032$ e $p = 0.0022$, respectivamente) quando comparados aos resultados do Fite Faraco. No entanto, a concordância entre a baciloscopia pelo Fite Faraco – técnica considerada de baixa sensibilidade e especificidade – e os resultados obtidos pela técnica molecular mostraram-se independentes, realçando as diferenças entre essas duas técnicas ($p = 0.1856$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise de concordância entre os resultados obtidos com a pesquisa de BAAR e as técnicas molecular, histopatológica e imunohistoquímica na detecção de micobactérias em amostras de lesões sugestivas de infecção tuberculosa. Macapá, 2014-2015.

Técnica	Pesquisa de BAAR		Concordância (<i>k</i>) (interpretação)	<i>p</i> -valor*
	Positivo <i>n</i> (%)	Negativo <i>n</i> (%)		
Histopatologia				
Positivo	55 (100)	41 (87,2)	0.1363 (Frac)	0.0032 [†]
Negativo	0 (0)	06 (12,7)		
Imunohistoquímica				
Positivo	52 (94,6)	32 (68,1)	0.2770 (Frac)	0.0002 [†]
Negativo	03 (5,4)	15 (31,9)		
PCR^a				
Positivo	49 (89,1)	39 (83,0)	0.0644 (Frac)	0.1856
Negativo	06 (10,9)	08 (17,0)		

* Teste Kappa. [†]Estatisticamente significativo. ^aReação em cadeia da polimerase para o gênero *Mycobacterium* (alvo *hsp65*).

Fonte: Protocolo de Pesquisa.

6. DISCUSSÃO

Roxo et al. (2007), afirmam que a literatura apresenta poucos os trabalhos a respeito da TB em bubalinos. Dentre os estudos, Freitas; Guerra e Panetta (2001) pesquisaram a TB em búfalos abatidos em um matadouro no Estado do Pará, onde cepas de *Mycobacterium spp.* foram isoladas em 60,3% dos 1.735 animais examinados. Conforme os autores, daqueles animais considerados positivos, 55,1% apresentavam lesões no trato respiratório, resultado este inferior ao presente trabalho, no qual 78,0% dos animais com LS de TB, apresentaram lesões no trato respiratório, de forma isolada (2,8%) ou associada ao fígado (1,8%), ao linfonodo adjacente (43,1%) e ao linfonodo e fígado (30,3%). Além disso, as lesões localizadas de TB foram encontradas nas regiões da cabeça e da língua (20,1%), carcaça (9,6%), cavidade abdominal (6,3%) e úbere (3,8%) e as lesões generalizadas, referentes a TB miliar, foram encontradas em 27,9% do animais examinados.

As características morfológicas em geral das LS de TB da presente pesquisa foram semelhantes às descritas por França (2013) para TB em bovinos, com lesões com coloração de branca a branco-amarelada, com aumento em suas dimensões, a lesões granulomatosas de maiores extensões, de aspecto nodular, massa amorfa, repleta de material caseoso encapsulado.

Da mesma forma que Silva et al. (2014), na presente pesquisa ao corte das lesões evidenciou-se ora macias com conteúdo pastoso de coloração amarelada, ora podendo-se sentir o ranger da lâmina com áreas calcificadas, e ainda de aspecto petrificado, não sendo possível realizar o corte de tal lesão, pois se apresentava com aspecto de ‘pedra’, com presença de mineralização, forma calcificada de tuberculose.

Na presente pesquisa foi observado que a localização das LS de TB apresentavam-se em sua maioria situadas ao mesmo tempo nos pulmões e linfonodo adjacente (43,1%), corroborando com Neill et al. (1994), onde essa lesão pulmonar, juntamente com a lesão no linfonodo regional é denominada de “complexo tuberculoso primário”.

A presença de TB em bubalinos no Estado do Pará foi descrita também por Ribeiro et al. (2003), os quais mencionaram lesões nos linfonodos retrofaríngeo, mediastínico e mesentérico. Os autores demonstraram que 8,11% dos 1.061 bubalinos estudados, procedentes de dez propriedades de cinco municípios, incluindo a Ilha de Marajó foram

reagentes positivos a TB, inferior ao presente trabalho, onde 36,7% dos animais estudados com LS de TB eram procedentes de regiões do Estado do Pará, incluindo a Ilha do Marajó.

Recentemente, a prevalência da TB em búfalos no Estado do Pará foi estimada por Barbosa et al. (2013), que avaliaram 3.917 fêmeas bubalinas das raças Murrah e Mediterrânea, das quais 2.809 eram provenientes da Ilha de Marajó e 1.108 de outras Mesorregiões do estado, e registraram prevalência de TB igual a 3,5% (100/2.809) nos búfalos da Ilha de Marajó e 7,2% (80/1.108) naqueles provenientes de outras Mesorregiões. Diante dos resultados, pode-se verificar que a prevalência de TB bubalina no estado do Pará é maior na Ilha de Marajó.

Corroborando com o que foi descrito pelos autores acima mencionados, Oliveira et al. (2015) ressaltaram que há escassez de dados relativos à TB bubalina na literatura. Portanto, devido ao incremento da criação desses animais e de sua importância econômica, torna-se relevante a necessidade de estudos e pesquisas relativos à ocorrência e identificação da TB nessa espécie.

No estudo realizado por Silva et al. (2014), encontrou-se lesões generalizadas em 8,56% dos casos, sendo que 56% das carcaças condenadas eram de animais provenientes da região de maior concentração de bubalinos do Estado do Amapá, os municípios de Tartarugalzinho, Cutias do Araguari, Macapá e Amapá. Dessa forma, em virtude dos resultados obtidos, os autores destacaram que se torna imprescindível a implementação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e TB Animal no Estado do Amapá para saneamento dos rebanhos.

O Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), refere que a TB bovina generalizada pode se apresentar sob a forma miliar, que acontece de forma abrupta e maciça, com entrada de um grande número de bacilos na circulação, e a forma protraída, que é a mais comum e a disseminação se dá por via linfática ou sanguínea, acometendo os pulmões, linfonodos, fígado, dentre outros órgãos (BRASIL, 2006). Situação esta diagnosticada em grande parte dos casos encontrados no presente trabalho, no qual as lesões mostraram-se na forma de pequenos pontos transparentes, ou nodulações, encontrados dispersos em vários órgãos, e principalmente, disseminadas na carcaça e seus linfonodos, o que caracteriza a TB miliar ou TB generalizada.

A presença de TB bubalina foi também relatada por Pereira et al. (2009), que avaliaram animais criados no município de Arari, Maranhão, onde encontraram uma prevalência de 13.54%, estimada por meio da prova alérgica de tuberculinização.

A variação na distribuição da TB nos diferentes municípios, segundo ressaltado por Ribeiro et al. (2011), pode estar relacionada com diversos fatores, como a fonte de aquisição dos animais, as práticas de manejo e o clima, sendo que todos os animais são criados extensivamente, em áreas alagadas, e são transferidos no período das chuvas para outras terras, entrando em contato com outros grupos de animais, aumentando desta forma a possibilidade de difusão da doença.

Observações semelhantes às do presente trabalho para as alterações macroscópicas e a análise histopatológica, foram feitas por Freitas; Guerra e Panetta (2001) para a TB nessa espécie, onde assim como as cepas micobacterianas isoladas, predominantemente de *M. bovis*, permitiram afirmar que os búfalos abatidos em Belém estavam afetados pela tuberculose. Os resultados desse estudo indicaram que esta é uma importante doença dos bubalinos oriundos de rebanhos regionais, pela prevalência. Adicionalmente, os autores demonstraram em seu estudo que o processo infeccioso da TB no bubalino é muito semelhante ao do bovino, que em alguns casos era evidenciado pela presença de múltiplos granulomas em diferentes fases de evolução, alguns com necrose central apenas e outros com necrose central e calcificação distrófica.

Ainda quanto ao exame histopatológico, Varello et al. (2008) referem que o mesmo possui alta precisão e bons valores preditivos positivos, apresentando elevada sensibilidade e especificidade, tornando-se desta maneira uma ferramenta confiável e de resultado rápido, podendo ser um aliado no diagnóstico *post mortem* realizado em frigoríficos e, de acordo com Salazar (2005), a histopatologia possui um bom valor preditivo para diagnóstico de lesões macroscópicas presuntivas de TB. Roxo (1997) afirma ainda que os resultados obtidos através dessa técnica podem ser considerados conclusivos em regiões em que a tuberculose é enzoótica.

Os resultados obtidos no presente estudo são superiores aos de Silva (2015), cuja análise histopatológica utilizando coloração HE, possibilitou a classificação de 64,0% das amostras como positivas por apresentar lesões teciduais sugestivas de TB. Entretanto, ao utilizar a coloração de ZN, apenas 12% foram positivas para BAAR. Já Andrade et al. (1991) avaliaram 159 lesões macroscópicas similares à tuberculose colhidas em frigoríficos,

provenientes de 14 municípios do Rio Grande do Sul e diagnosticaram histologicamente a tuberculose em 147 (92,45%) dessas lesões. Resultado superior foi registrado por Souza (2013), onde de 150 linfonodos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, 100% apresentaram lesões microscópicas compatíveis com a enfermidade.

As lesões granulomatosas em todos os casos foram multifocais, com alguns focos coalescentes (Figura 3A), aspecto também observado por Andrezza et al. (2015) em lesões do tipo tuberculoide de bovinos. Esses focos variaram em tamanho e morfologia, de acordo com os estágios de desenvolvimento. Wangoo et al. (2005) referem que as características histológicas e a variação nas proporções dos componentes celulares permitem uma noção acerca do tempo de evolução da LT. Assim, na avaliação histopatológica da LT, a literatura mostra que existem variações histológicas para a presença de caseificação, calcificação, infiltrado inflamatório e células gigantes, de conformidade com a fase de desenvolvimento do processo granulomatoso tuberculoide (SARWAR et al., 2004; WANGOO et al., 2005; MARTÍN-HERNANDO et al., 2010; SOUZA, 2013; ANDREAZZA et al., 2015). Essas alterações podem ainda variar entre espécies acometidas (RHYAN; SAARI, 1995).

Assim, pelos aspectos histológicos supracitados, os granulomas micobacterianos são dinâmicos, onde as populações celulares mudam ao longo do curso da infecção (WANGOO et al., 2005).

Na classificação de Wangoo et al. (2005) as hemorragias são frequentemente observadas no estágio II, o que difere da presente pesquisa, na qual a hemorragia estava ocorrendo em apenas 1,9% (02/103) dos casos no estágio IV da LT.

Variações na morfologia da lesão tuberculosa também foram registradas por Rhyan e Saari (1995) entre cervídeos, na espécie *Cervus elaphus* geralmente com mineralização periférica em vez de mineralização central, contendo mais neutrófilos e menos CL do que nas lesões vistas na espécie bovina. Em *Dama dama* as CL eram mais numerosas e praticamente indistinguíveis das lesões em *C. elaphus*; em *C. nippon* mais CL e menos neutrófilos do que nas lesões em bovinos ou noutras espécies de cervídeos. Ainda em *C. nippon* as CL foram maiores e com maior número de núcleos, que as CL nas outras espécies. Diferenças interespecies também foram observadas por Andrezza et al. (2015), que descreveram que as CL foram abundantes nas LT de bovinos enquanto que, em suínos, predominaram macrófagos epitelioides.

Histologicamente, 97,1% (100/103) dos casos apresentavam lesões no estágio IV (Figura 4A), nos quais 84% (84/100) estava isolada e 16% (16/100) estava presente em associação com lesões em outros estágios de evolução (Gráfico 3). Wangoo et al. (2005) e Welsh et al. (2005) referem que esta fase caracteriza o “granuloma tuberculoso clássico” (grande, multicêntrico, densamente necrótico e encapsulado), e resulta do progresso da enfermidade, onde no estágio I de desenvolvimento do granuloma a comunicação entre macrófagos ativados e linfócitos T facilita a produção de citocinas, especialmente de IFN- γ , IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF) (SAUNDERS; COOPER, 2000); esses fatores promovem a ativação e estimulação da proliferação de macrófagos, de células epitelioides e de CL, formando o núcleo do granuloma e, com o avanço da lesão, desenvolve-se a necrose central que expande nos estágios II, III e IV (WANGOO et al., 2005).

Sarwar et al. (2004), mostraram que nas LT iniciais, além da necrose de caseificação, os neutrófilos também estão presentes, enquanto que nas lesões tardias quando o granuloma está bem definido eles não são observados. No entanto, Wangoo et al. (2005) afirmam que os neutrófilos são vistos ocorrendo dispersos em todas as quatro fases da LT e, mais abundantemente, nos estágios iniciais da infecção por *M. bovis*.

Em 25,2% (26/103) dos casos as LT foram de origem pulmonar, e em todos eles se observou o comprometimento bronquiolar (Figura 4C). Laisse et al. (2011) observaram, em animais com grave lesão tuberculoide pulmonar, que os granulomas haviam destruído a parede dos bronquíolos, indicando que estes animais podem excretar *M. bovis* e ser uma fonte de infecção para outros animais.

Embora o granuloma seja uma lesão clássica de TB, não é considerado uma alteração patognomônica (BRASIL, 2006), conforme referem Wangoo et al. (2005). Nesse sentido, Furlanetto et al. (2012) atestaram que 98,3% (179/182) das lesões encontradas com características tuberculoides não foram ocasionadas por *M. bovis*. Portanto, a presença do granuloma, observado no exame histopatológico, não é conclusiva como parâmetro de diagnóstico de suporte da TB.

Esse aspecto de classificação descritivo apresentou diferenças em relação à literatura quanto aos estágios de desenvolvimento da LT. Souza (2013) também utilizou coloração de HE e classificação de acordo com o estágio de evolução adotado por Wangoo et al. (2005) e verificou que 14,5% dos casos foram LT no estágio I, 26,5% no estágio II, 43,5% no estágio III e 14% em estágio IV. Esses resultados diferem dos observados no presente estudo, visto

que 97,1% dos casos continham lesões no estágio IV (isoladamente ou associadas) e em 14,6% e 8,8% dos casos (associadas a outros estágios) estavam presentes LT em estágio I e II, respectivamente, indicando que a doença tem um caráter progressivo e desenvolvimento multicêntrico.

Resultado semelhante ao do presente estudo foi relatado em bovinos por Menin et al. (2013), em que a análise histológica revelou alta frequência de lesões crônicas em diferentes tecidos, onde 70-100% estavam na fase final de desenvolvimento do granuloma, ou seja, no estágio IV. Já os resultados de Liebana et al. (2008) para bovinos na Inglaterra Ocidental e País de Gales mostraram que os granulomas isolados na fase IV, ou nessa fase combinados com outros estágios, constituíram 63% das lesões, ao passo que 16% das lesões foram estágio I/II de granulomas.

Laisse et al. (2011) adotaram a mesma classificação de Wangoo et al. (2005) no estudo da TB em um rebanho de búfalo africano do Parque Hluhluwe-Imfolozi na África do Sul e, histologicamente, observaram os quatro estágios microscópicos da LT, onde em um mesmo animal estava presente mais de um estágio, sendo que as lesões de grau II foram as mais frequentes, diferindo do observado no presente estudo onde predominaram lesões no estágio IV. Menin et al. (2013) ressaltam que lesões encapsuladas, com múltiplas áreas de necrose caseosa intragranulomatosa e presença de mineralização distrófica, pelos critérios estabelecidos para o granuloma tuberculoide, podem ser classificadas como lesões crônicas e, portanto, nas fase III e IV do desenvolvimento.

Martín-Hernando et al. (2010) fazem uma classificação diferente de Wangoo et al. (2005), onde no tipo I (recente) a reação granulomatosa é constituída de processo inflamatório de células mistas, às vezes com um núcleo necrótico, no tipo II a LT apresenta necrose moderada e leve calcificação e no tipo III estão presentes necrose acentuada e calcificação, com a área de calcificação semelhante ou mais extensa do que a área de necrose. Não houve uma classificação para a fase IV da LT. Ainda em relação à evolução do processo granulomatoso tuberculoide, Palmer et al. (2007), em estudo experimental, observaram que os granulomas são mais numerosos nos estágios III e IV da doença. Os autores afirmam que embora não haja uma progressão ordenada através de estágios como lesão, a doença avança dentro de um determinado órgão em qualquer tempo, podendo haver granulomas de várias fases de desenvolvimento que provavelmente representam lesões com microambientes diferentes. Devido ao aumento da resistência bovina para a infecção por *M. bovis* é possível

que durante a infecção natural a maioria das lesões encontradas em animais assintomáticos estejam em uma fase avançada (crônica) de desenvolvimento (MENIN et al., 2013).

Entretanto, a imunomarcção do *M. bovis* em LT de bubalinos no presente estudo, que ocorreu em 82,6% (90/109) dos casos, foi inferior à obtida por Kohli et al. (2014), que realizaram IHQ em LT de bovinos e observaram maior proporção (95,56%), enquanto Martinez-Burnes et al. (2012), também estudando bovinos, registraram 100% de positividade para o *M. bovis* em LT de linfonodos. Na Turquia, Vural e Alcigir (2010) verificaram 96% de positividade para antígenos de *M. bovis* em bovinos, que foram vistos principalmente em macrófagos, em menor proporção nos detritos necróticos caseosos e raramente nas células gigantes de Langhans. A imunohistoquímica mostrou maior positividade e possibilitou maior evidência de *Mycobacterium* comparada ao método de ZN.

Segundo Seva et al. (2002), a IHQ marca antígenos micobacterianos, organismos vivos ou mortos e fragmentos, mesmo com a parede celular defeituosa. Já na presente pesquisa, a imunoreatividade para *M. bovis* foi expressa pelo cromógeno que marcou os bacilos como grânulos de coloração acastanhada.

Nos casos positivos à IHQ da presente pesquisa, foi mais observada a marcação em macrófagos epitelioides, ocorrendo em menor proporção nas células gigantes, diferindo de Martinez-Burnes et al. (2012), que apesar de detectarem pela IHQ o antígeno de *M. bovis* no citoplasma de macrófagos, evidenciaram ainda em grande parte de células gigantes de linfonodos de bovinos com LT.

Em estudo realizado em bovinos com tuberculose por Santos (2004), a técnica mostrou imunomarcção difusa na forma de massas indefinidas nas áreas de necrose caseosa, onde todas as amostras foram positivas também pela coloração de ZN e pela cultura.

Os resultados obtidos neste estudo e diversos outros confirmam a necessidade de se discutir a inclusão de técnicas de maior acurácia aos exames realizados pelos Serviços de inspeção no Brasil (ALMEIDA FRÁGUAS et al., 2008; FURLANETTO et al., 2007; ALZAMORA FILHO et al., 2014; NORONHA, 2015).

O diagnóstico anatomopatológico em frigoríficos, na inspeção *post mortem*, apresenta várias limitações, pois não confirma a presença do agente e muitos processos inflamatórios granulomatosos são comuns a outras co-morbidades e outros agentes que não *M. bovis* (BRASIL, 2006; WANGOO et al., 2005). Esse fato resulta em erros no diagnóstico e condenação nos matadouros, pois a legislação vigente preconiza a condenação de carcaças ou

parte delas, quando as lesões forem sugestivas de TB. Furlanetto et al. (2012) relataram que em 98,3% (179/182) das lesões encontradas com características tuberculoides não houve isolamento de colônias sugestivas de *M. bovis*. A presença do granuloma, observado no exame histopatológico, pode não ser conclusiva ou a recuperação de bacilos viáveis é uma limitação para cultivo de *M. bovis*.

Neste estudo foram consideradas pelo menos uma das três condições sugeridas por França et al. (2013) para granulomas tuberculoides. Diversos autores defendem o exame histopatológico pela sua alta precisão e bons valores preditivos positivos, apresentando elevada sensibilidade e especificidade (ROXO, 1997; SALAZAR, 2005). No entanto, o exame histopatológico deve ser considerado para infecções causadas pelo gênero *Mycobacterium*, pois o exame não permite a diferenciação do agente micobacteriano. Já Noronha (2015) sugere que manifestações anatomopatológicas podem estar relacionadas a reação vacinal após BCG.

A dificuldade em se obter um diagnóstico mais preciso, pode ser atribuída as várias dificuldades na identificação do agente da TB. Quanto ao cultivo de micobactérias, se considerarmos o volume de exames, haveria a necessidade de investimentos em laboratório com biossegurança adequada (Programme 2013) ou em um organizado esquema de vigilância que incluísse coleta de material nos criadouros pelo menos um mês antes da data de abate. A baciloscopia, com coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), permite maior rapidez na liberação dos resultados, além do baixo custo, no entanto, carece de sensibilidade e especificidade. A técnica imunohistoquímica pode ser um complemento de diagnóstico eficiente à coloração de ZN para o diagnóstico de granulomas tuberculoides, sendo uma técnica simples, sensível e específica (PAGLIS, 2013; KOHLI et al., 2014). No entanto, a imunomarcagem apenas identifica material antigênico particulado principalmente entre as células epitelioides no citoplasma de macrófagos e em meio ao material necrótico (DUARTE; PAGLIARI, 1999) e o anticorpo utilizado na técnica IHQ reage com cerca de 100 diferentes antígenos BCG, que podem ser comuns a outras micobactérias (HARBOE et al., 1979).

O CMT apresenta microorganismos com grande homologia genética. O genoma de *M. bovis* assemelha-se em 99,95% com *M. tuberculosis*, sendo as deleções genômicas sequenciais irreversíveis (*region of difference-RD*) no DNA o principal contribuinte para essas diferenças (FLEISCHMANN et al., 2002; GARNIER et al., 2003). O padrão da presença ou ausência destas RD no genoma dos membros do CMT proporciona uma

assinatura molecular que permite sua discriminação e isto tem sido confirmado por diversos autores (BROSCH et al., 2002; HUARD et al., 2006). Os iniciadores específico para *M. bovis*, usados neste estudo, flanqueiam a região RD4, ausente em *M. bovis* e nas cepas vacinais BCG (SMITH et al., 2006), o que permite a formação de um *amplicom* de 400pb, confirmado nos testes *in silico* (LÁZARO SALES et al., 2014). Bahksi et al. (2005) analisaram a região RD4 e concluíram que todas as suas amostras de *M. bovis* apresentavam a deleção.

Neste estudo, 10 amostras com comprovação histopatológica e resultado negativo para *M. bovis* e para o alvo IS6110 apresentaram amplificação para o gene *Hsp65*, o que sugere a presença de micobactérias não pertencentes ao CMTB. Outros autores já relataram a ocorrência de outras micobactérias em lesões granulomatosas sugestivas de TB (SALAZAR, 2005). Figueiredo et al. (2009) e Souza Figueiredo et al. (2009), relatam a presença de *Mycobacterium* spp. em 11% das culturas micobacterianas previamente identificadas como *M. bovis*. No entanto, em nenhum dos casos foram usadas técnicas para diferenciação das espécies dentro do CMT.

Das dez amostras negativas para *M. bovis* e positivas para o gene *Hsp65*, sete foram positivas para IS6110. O IS6110 é um elemento genético de 1350pb presente em diferentes números de cópias e integrado a vários sítios do genoma das espécies do CMT. Em geral está presente em número de 4-20 de *M. tuberculosis* e em número reduzido em *M. Bovis* (THIERRY et al., 1990; VAN SOOLINGEN, 2001). No entanto, a especificidade das técnicas de amplificação para a IS6110 tem sido questionadas pois elementos semelhantes ou idênticos tem sido descritos em micobactérias não tuberculosas ou mesmo em espécies de outros gêneros (RMC et al., 2006).

Apenas o cultivo e posterior sequenciamento nucleotídico dos isolados poderia esclarecer os agentes não identificados como *M. bovis*. Em caso de confirmação de MNT deverá ser cuidadosamente investigado, em trabalhos posteriores, se a presença destas em biópsias é suficiente para defini-las como agente da TB bubalina e seu impacto nos casos de infecções humanas.

7. CONCLUSÃO

A tuberculose está presente nos rebanhos bubalinos do Estado do Amapá e região da Ilha de Marajó no Estado do Pará, representando um sério risco de saúde pública.

A histopatologia demonstrou ser uma boa ferramenta para o diagnóstico e identificação das diferentes fases de desenvolvimento da lesão tuberculoide, assim justifica sua importância na avaliação epidemiológica da tuberculose em bubalinos.

A detecção de diferentes estágios de evolução da lesão tuberculoide nos animais de estudo indica que a doença em bubalinos criados no Estado do Amapá e de alguns municípios da Ilha de Marajó e abatidos para consumo, tem caráter autoperpetuante.

Para a população de estudo foi demonstrado que os casos de lesão tardia (fase IV da infecção) prevalecem e, por conseguinte, as lesões são mais notáveis, facilitando o trabalho do inspetor veterinário na inspeção.

O resultado da análise imunohistoquímica mostrou eficiente na detecção de micobactérias em lesões granulomatosas de bubalinos abatidos para consumo no Estado do Amapá. Além disso, a presença de animais positivos para micobacteriose indica que o agente está presente nos rebanhos bubalinos na região pesquisada.

Há um elevado percentual de casos de TB não causadas por *M. bovis* entre bubalinos consumidos na Região Amazônica brasileira. Os resultados da análise histopatológica apresentaram boa concordância com os dos dados moleculares para determinação do Gênero *Mycobacterium*, no entanto, os dados obtidos reforçam a necessidade de se discutir a inclusão de técnicas de maior acurácia aos exames realizados pelos Serviços de inspeção no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, P.; RETAMAL, P. Tuberculosis: una zoonosis re-emergente. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v. 23, n. 2, p. 583-594, 2004.

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

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

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Washington: **OPAS**, 2003. 544p.

AHMED, N. Y. Anti-bcg immunohistochemical detection of mycobacteria in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of granulomatous lymphadenitis. **American Journal of Research Communication**, v. 2, n. 9, 2014.

ALBERNAZ, T. T.; OLIVEIRA, C. M. C.; LIMA, D. H. S.; SILVA, N. S.; CARDOSO, D. P.; LOPES, C. T. A.; BRITO, M. F.; SILVA, J. B.; SALVARANI, F. M.; LEITE, R. C.; BARBOSA, J. D. Comparison of the tuberculin test, histopathological examination, and bacterial culture for the diagnosis of tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazil. **Trop Anim Health Prod**. Regular articles, published on line 10 may 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11250-015-0842-3#page-1>, acessado em: 01/07/2015.

ALMEIDA, R. F. C. **Teste diagnósticos in vivo, in vitro e investigação epidemiológicos da tuberculose bovina**. 2004, 56f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. Mato Grosso do Sul. 2004.

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

ALVIM, N. C.; PINHEIRO JÚNIOR, O. A. Incidência e destino de carcaças de bovinos acometidos por brucelose e tuberculose no sul do Pará no período de junho de 2003 a maio de 2004. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, periodicidade semestral, edição número 5, julho, 2005.

ALZAMORA FILHO, F. **Diagnóstico bacteriológico e molecular da tuberculose bovina a partir de lesões de bovinos abatidos no Estado da Bahia**. 2013, 99f. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. Salvador. Bahia.

ALZAMORA FILHO, F.; VANCONCELLOS, 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 Vet. Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 103-108, fevereiro, 2014.

ANDRADE, G.B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P.V.; MENDEZ, M.C.; SCHILD, A.L. Estudo histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 11, n. 3-4, p. 81-86, 1991.

ANDREAZZA, D.; BOOS, G. S.; BOABAID, F. M.; WOUTERS, A. T. B; WOUTERS, F.; SOUZA, S. O.; MENEGAT, M. B.; DRIEMEIER, D. Caracterização histológica e imunohistoquímica das lesões de tuberculose em bovinos e de linfadenite granulomatosa em suínos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35, n. 2, p. 129-136, 2015.

ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *Caprae*. Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov. **Int. J Syst Evol. Microbiol.** 53: 1785-1789. 2003.

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

ARAÚJO, C. P.; LEITE, C Q. F.; PRINCE, K. A.; JORGE, K. D. G.; OSÓRIO, A. L. A. R. *Mycobacterium bovis* identification by a molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst. Oswaldo Cruz.** v.100, n. 7, p. 749-752, 2005.

ARAÚJO, C. P. **Desenvolvimento de nested PCR para a detecção de DNA de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos de bovinos e bubalinos.** 2014, 58f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. MS. 2014.

ARAÚJO, F. R. Embrapa desenvolve teste que promete melhorar o diagnóstico da tuberculose. **Embrapa Gado de corte: MilkPint, Cadeia do leite.** 2p. Abril de 2014b.

ARAÚJO, C. P.; OSORIO, A. L.; JORGE, K. S.; RAMOS, C. A.; FILHO, A. F.; VIDAL, C. E.; ROXO, E.; NISHIBE, C.; ALMEIDA, N. F.; JUNIOR, A. A.; SILVA, M. R.; NETO, J. D.; CERQUEIRA, V. D.; ZUMARRAGA, M. J.; ARAÚJO, F. R. (2014a). Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. **PLoS One**, 9(3), e91023. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091023>.

ARAÚJO, C. P.; OSÓRIO, A. L. A. R.; JORGE, K. S. G.; RAMOS, C. A. N.; SOUZA FILHO, A. F.; VIDAL, C. E. S.; VARGAS, A. P. C.; ROXO, E.; ROCHA, A.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; SILVA, M. R.; NETO, J. D. B.; CERQUEIRA, V. D.; ARAÚJO, F. R. (2014b). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues by nested-PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45(2), 633–640. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000200035>.

ASSIS, N. C. S. et al. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. **J. Bras. Patol. e Med. Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 1-7, fev. 2007.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M. AYRES, L.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 5.4. **Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**: Belém: UFPA, 2008.

BAHKSI, C. et al. 2005. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. **Vet Microbiol**, 109(3-4), pp.211-6. 2005.

BALIAN, S. C.; RIBEIRO, P.; VASCONCELLOS, S. A.; PINEHIRO, S. R.; FERREIRA NETO, J. S.; GUERRA, J. L.; XAVIER, J. G.; MORAIS, Z. M.; TELLES, M. A. S. Linfadenites tuberculoides em suínos abatidos no estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 391-397, 1997.

BANIN, R. L. **Os caminhos da carne de Búfalos. Ênfase no estado do Amapá**. Postado em 27/06/2013. Disponível em: <http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/30954/os-caminhos-da-carne-de-bufalos.-enfase-no-estado-do-amapa.htm>. Acesso em: 12/03/2016.

BARBOSA, I. R.; COSTA, I. C. C. et al. Distribuição espacial dos casos novos de tuberculose no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 37, n. 2, p. 452-459, abril/junho, 2013.

BERENDS, B. R. et al. Efficiency of current meat inspection procedures and some proposed revisions with respect to microbiological safety: a critical review. **Veterinary Research**, v. 133, p. 411-415, 1993.

BEZERRA, D. K. O.; CERQUEIRA, V. D. Avaliação anatomo-patológica, microbiológica e molecular de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose em búfalos abatidos no Município de Macapá, estado do Amapá –AP. In: **XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPA – 2012**. Castanhal – Pará, 2012.

BIBERSTEIN, E.; HIRSH, D.C. Espécies de *Mycobacterium*: os agentes da tuberculose animal. In: HIRSH, D.C. & ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**, 1 ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.149-154, 2003.

BITTENCOURT, C. N. **Pesquisa de *Mycobacterium bovis* em pacientes internados no Hospital Especializado Octávio Mangabeira, Salvador–Ba**. 2009, 78f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº. 30.691 de 29 de março de 1952. **Aprova o regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal** – RIISPOA. Diário Oficial, Rio de Janeiro, abr. 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose (PNCEBT)**. 2001. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em: 02/05/2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA Nº 06, de 08 de janeiro de 2004 – Regulamento PNCEBT**. [Online] 2004. Publicada no DOU Nº 07, de 12 de janeiro de 2004, Seção I, págs. 6-10, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. **Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal – PNCEBT**. Brasília-DF, 184p, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobacterias**. 1ª Edição. Ministério da Saúde, Brasília. 436p. 2008.

BRESS, S. B.; REIMER, N. F.; CHEVILLE, A.; FLORANCE, C. H.; THOEN, C. Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. **J. Vet. Diagn. Inv.**, v. 12, p. 60-63, 2000.

BRIET, F. et al. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). **Veterinary Research**, v.36, p. 411-436, 2005.

BROSCH, R.; GORDON, S.V.; PYM, A.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; COLE, S.T. Comparative genomics of the Mycobacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, p. 143-152, 2000.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. **Proc Natl Acad Sci** 99(6):3684–3689. 2002.

CARDOSO, M. A.; CARDOSO, R. F.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; LEITE, C. Q. F.; SANTOS, A. C. B.; SIQUEIRA, V. L. D.; OKANO, W.; ROCHA, N. S.; LONARDONI, M. V. C. (2009) Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. **Zoonoses Public Health** 56:465–470, 2009.

CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. 2007. **Respiratory system**, p.523-653. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's **Pathology of Domestic Animals**, vol.2, 5th ed. Elsevier, Edinburgh, 2007.

CHARRO, F. D.; OSÓRIO, A. L. A. R. **Diagnóstico da tuberculose bovina por meio de histopatologia**. Trabalho de Iniciação Científica apresentado no X Encontro de Iniciação Científica da UFMS. 2013, disponível em:

<http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=429>. Acesso em: 12/03/2016.

COLLINS, D. M. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. **Vet. Microbiol.** 151:2-7. 2011.

CORNER, L.; MELVILLE, L.; MCCUBBIN, K.; SMALL, K.J.; MCCORMICK, B.S.; WOOD, P.R. Rothel, J.S. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. **Aust. Vet. J.**, v.67, n.11, p.389-92, 1990.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Vet. Microbiol.** 40: 53-63. 1994.

CORNER, L. A. L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. **Veterinary Microbiology**, vol. 112, p. 303 a 312, 2006.

COSTA, A. C. F. **Tuberculose bovina: diagnóstico anatomo-histopatológico, bacteriológico e molecular em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia.** 2008, 46f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia. Salvador. Bahia.

COSTA, G. M. **Controle das Doenças de Bovinos: Brucelose e Tuberculose.** Dissertação (pós-graduação) - Universidade Federal de Lavras - UFLA - Curso de Pós-graduação Lato Sensu Defesa Sanitária Animal, Lavras, 2008b.

COSTA, L. B. **Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia.** 2012, 121f. Dissertação (Mestrado). Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

COUSINS, D. V.; WILTON, S. D.; FRANCIS, B. R. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 187-195, 1991.

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

DUARTE, M. I. S.; PAGLIARI, C. Moléstias Infecciosas. In: ALVES, V. A. F; BACCHI, C E.; VASSALLO, J. **Manual de Imuno - histoquímica.** São Paulo, Sociedade Brasileira de Patologia, p. 195 - 207, 1999.

DUARTE, L. F. C. **Investigação de *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos no município de Feira de Santana, Bahia.** 2010, 61f. Dissertação (Mestrado). Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Salvador. Bahia, 2010.

FARIAS, T. A. **Diagnóstico da tuberculose bovina por ELISA com proteínas recombinantes**. 2009, 68f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2009.

FELINI, R. B. **Bubalinos leiteiros: alternativa para diversificar a propriedade rural**. 2013, p. 47, Trabalho de conclusão de curso superior de tecnologia em desenvolvimento rural, Faculdade de Ciências Econômicas da UFRGS, Cachoeira do Sul, RS.

FIGUEIREDO, E. E. S.; SILVESTRE, F. G.; CAMPOS, W. N.; FURLANETTO, L. V.; MEDEIROS, L.; LILENBAUM, W.; FONSECA, L. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Identification of *Mycobacterium bovis* Isolates by a multiplex PCR. **Braz. J. Microbiol.** 40:231-233. 2009.

FLEISCHMANN, R. D. et al., 2002. Whole-Genome Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical and Laboratory Strains. **Journal of Bacteriology**, 184(19), pp.5479–5490. Available at: <http://jb.asm.org/>.

FRANÇA, L.R. **Diagnóstico anatomopatológico e histológico de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina**. 117f. Dissertação de Mestrado - Centro de ciências agrárias, ambientais e biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2013.

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

FREITAS, J. A.; GUERRA, J. L.; PANETTA, J. C. Características da tuberculose observadas em búfalos abatidos para consumo: aspectos patológicos e identificação de micobactérias. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** São Paulo, v. 38, n. 4, p. 170-176, 2001.

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

FURAK, J.; TROJAN, I.; SZOKE, T.; TISZLAVICZ, L.; BODA, K.; BALOGH, A.; et al. Histological and immunohistochemical structure of pulmonary tuberculous granulomas in untreated cases and cases treated with antitubercular drugs. **Orv Hetil**, v. 144, n. 27, p. 1347-1352, 2003.

FURLANETTO, I. P.; SOUSA, E. B.; BRITO, M. L.; LIMA, G. L. F.; LOPES, M. L.; SILVA, S. H. M.; LIMA, K. V. B. Avaliação de diferentes procedimentos para extração de DNA a partir de esfregaços corados pelo método Ziehl-Neelsen. **Cad Saúde Coletiva**. v. 15, n. 3, p. 401-414, 2007.

FURLANETTO, L. V.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE JÚNIOR, C. A.; CARVALHO, R. C. T.; SILVA, F. G. S.; SILVA, J. T.; LILENBAUM, W.; PASCHOALIN, V. M. F. Uso de

métodos complementares na inspeção post mortem de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v. 32, n. 11, p. 1138-1144, novembro, 2012.

GARBACCIO, S. G.; CATALDI, A.A. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. **Revista Argentina de Microbiología**, v.42, p.247-25, 2010.

GARNIER, T. et al., The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2003. Jun 24; 100(13):7877-82. Epub 2003.

GIMENO, E. J. Fundamentos de imunohistoquímica aplicada a patologia veterinária. In: **Encontro Nacional de Patologia Veterinária**, n. 7, Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte: UFMG/UFV/CBPA, p. 17-51, 1995.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Mycobacterium* spp.** FAVET-UFRGS. 2014. Disponível em: http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Mycobacterium%204-2014-1_0.pdf. Acesso em: 10/06/2015.

GRISI FILHO, J. H. H.; ROSALES, C. A. R.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S. Análise epidemiológica das condenações de bovinos por tuberculose em abatedouros do Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n.2, p.175-181, abr./jun., 2011.

HALDAR, S.; BOSE, M.; CHAKRABARTI, P. et al. Improved laboratory diagnosis of tuberculosis – The Indian experience. **Tuberculosis**, v. 91, p. 414-426, 2011.

HARBOE, M. et al., 1979. Cross-reactions between mycobacteria II Crossed immunoelectrophoresis analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other mycobacteria. **Scand J Immunol**, 9(115-24), 1979.

HEINEMANN, M. B.; MOTA, P.M.P.C.; LOBATO, F.C.F.; LEITE, R.C.; LAGE, A.P. Tuberculose bovina: uma introdução à etiologia, cadeia epidemiológica, patogenia e sinais clínicos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1-12, 2008.

HERRERA-LEON, L.; POZUELO-DIAZ, R.; MOLINA MORENO, T.; VALVERDE COBACHO, A.; SAIZ VEGA, P.; JIMENEZ PAJARES, M.S. Differentiation of species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular techniques. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 9, p. 496-502, 2009.

HUARD, R. et al., 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J Bacteriol**, 188(12), pp.4271–87. 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivos dos rebanhos de grande porte em 31.12, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação - 2013.** Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2013/tabelas_pdf/tab03.pdf. Acesso em: 16/04/2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivos dos rebanhos de grande porte em 31.12, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação - 2014**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default_pdf.shtm. Acesso em: 18/04/2016.

JONES, T. C., HUNT, R. D., KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6.ed., Manole. 1997.

JORDÃO JUNIOR, C. M.; LOPES, F. C. M.; PINTO, M. R. A.; ROXO, E.; LEITE, C. Q. F. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DETECÇÃO DE *Mycobacterium bovis* DIRETAMENTE NO LEITE. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 51-55, jan./mar. 2005.

JULIANO, A. P. **Contribuição ao estudo da tuberculose bovina**. 2007, 65f. Trabalho monográfico (curso de pós-graduação “latu sensu” em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal). Universidade Castelo Branco. São Paulo.

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

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine Tuberculosis in Latin America and the Caribbean: Current Status, Control and Eradication Programs. **Veterinary Microbiology**. v. 40, n. 1-2, p. 5-14, 1994.

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

KANTOR, I. N.; AMBROGGI, M.; POGGI, S.; MORCILLO, N.; TELLES, M. A. S.; RIBEIRO, M. O.; TORRES, M. C. G.; POLO, C. L.; RIBÓN, W.; GARCÍA, V.; KUFFO, D.; ASENCIOS, L.; CAMPOS, L. M. V.; RIVAS, C.; WAARD, J. M. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. **Tuberculosis**. v. 88, p. 358-365. 2008.

KESARWANI, R. C.; PANDEY, A.; MISRA, A. et al. Polymerase chain reaction (PCR): Its comparison with conventional techniques for diagnosis of extrapulmonary tubercular diseases. **Indian Journal Surgery**, v.66, p.84-88, 2004.

KLASTER, P. R.; KUIJPER, S.; VAN INGEN, C.W.; KOLK, A.H.J. Stabilized, freeze-dried PCR mix for detection of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.6, n.6, p. 1798-1800, 1998.

KOHLI, R.; PUNIA, R.S.; KAUSHIK, R.; KUNDU, R.; MOHAN, H. Relative value of immunohistochemistry in detection of mycobacterial antigen in suspected cases of tuberculosis in tissue sections. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 57, n. 4, p. 574-8, 2014.

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

LAISSÉ, C. J.; GAVIER-WIDÉN, D.; RAMIS, G.; BILA, C. G.; MACHADO, A.; QUEREDA, J. J.; AGREN, E. O.; VAN HELDEN, P. D. Characterization of tuberculous lesions in naturally infected African buffalo (*Syncerus caffer*). **J Vet Diagn Invest.**, v. 23, n. 5, p. 1022-7, 2011.

LAVAGNOLI, M. R. et al. Tuberculose em bovinos no Estado do Espírito Santo. **Veterinária e Zootecnia.** v. 17. n. 1. p. 71-78, 2010.

LÁZARO SALES, M. et al. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 5, p. 433-438, 2014.

LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; DOMINGUEZ, L.; MATEOS, A.; GONZÁLES-LLAMAZARES, O.; RODRIGUES-FERRI, E. F.; DOMINGO, M.; VIDAL, D.; COUSINS, D. The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p. 223-233, 2008.

LIMA, S. S. S.; CLEMENTE, W. T.; PALACI, M.; ROSA, R. V.; ANTUNES, C. M. F.; SERUFO, J. C. "Conventional and molecular techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a comparative study," **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, vol. 34, no. 12, pp. 1056–1062, 2008.

LIMA, E. P. **Estudo clínico, morfológico e imuno-histoquímico de série de casos de tuberculose pleural e ganglionar.** 2011, 71p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Pará: Belém. 2011.

LOPES, C. A. R. **Prevalência de brucelose e tuberculose em bovinos abatidos sob inspeção estadual no município de Aracruz - Espírito Santo.** 2008, 34p. Trabalho monográfico do curso de pós-graduação *latu sensu* (Especialização). Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro. 2008.

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 Veterinária. Belo Horizonte: Minas Gerais. 2010.

MACENTE, S. et al. Evaluation of hsp65 Nested PCR-Restriction Analysis (PRA) for Diagnosing Tuberculosis in a High Burden Country. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

MARQUES, C. S. S.; OAIGEN, R. P.; MORAES, C. M.; TAVARES, R. E. B.; LIMA, M. M.; MIRANDA, A. S. Caracterização da Cadeia Produtiva Bubalina no Brasil: Rebanho, Abates e Limitações. In: X Congresso Brasileiro de Buiatria, 2013, Belém. Anais...Belém: **XXXVII Semana do Médico Veterinário do Pará - SEMAVET**, p.173-188, 2013.

MARTÍN-HERNANDO, M.P.; TORRES, M.J.; AZNAR, J.; NEGRO, J.J.; GANDÍA, A.; GORTÁZAR, C. Distribution of lesions in red and fallow deer naturally infected with *Mycobacterium bovis*. **J Comp Pathol.**, v. 142, n. 1, p. 43-50, 2010.

MARTINEZ-BURNES, J.; CASTILLO-MARTINEZ, O.; SOLANO-TERREROS, D.; DE LA CRUZ-HERNANDEZ, N.I.; CAMPUZANO-GRANADOS, J.; BARRIOS-GARCIA, H.; SNYDELAAR HARDWICKE, A.; ALMAZAN-GARCIA, C.; GUIZARNOTE GUIBLANCO, J.A.; RAMOS-VARA, J. Development and Validation of an Immunohistochemical Method for Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. **J of Anim and Vet Adv Year**, v. 11, n. 16, p. 2856-2860, 2012.

MEIKLE, V. et al. Individual Animals of a Cattle Herd Infected with the Same *Mycobacterium bovis* Genotype Shows Important Variations in Bacteriological, Histopathological and Immune Response Parameters. **Zoonoses and Veterinary Public Health**. v. 54, p.86–93, 2007.

MENIN, A.; FLEITH, R.; RECK, C.; MARLOW, M.; FERNANDES, P.; PILATI, C.; BAFICA, A. Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. **PLOS ONE**, v 8, n. 1, 2013.

MONTEIRO, F. J. C. **Impactos ambientais causados pelos búfalos asselvajados nos campos inundáveis da Estação Ecológica de Maracá-Jipioca (Costa Atlântica do Amapá)**. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amapá – UNIFAP. AP. 2009.

MORATO, F. **Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos utilizando a técnica de cultivo em camada de Agar Middlebrook 7H11**. 2007, 84f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP. SP, 2007.

MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 1-2, p. 153-177, 1994.

MOTA, P. M. P. C., NAKAJIMA, M. Tuberculose bovina. In: CHARLES, T. P., FURLONG, J. (Ed.). **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, p.97-121, 1992.

MOTA, F. **Tuberculose bovina: aspectos gerais da doença, situação no Brasil e ações dos órgãos de defesa sanitária animal**. 2008. 32p. Trabalho monográfico (Especialização *Latu Sensu* em Defesa e Vigilância Sanitária Animal). Universidade Castelo Branco. São Paulo.

MUSTAFA, T.; WIKER, H. G.; MFINANGA, S. G.; MORKVE, O.; SVILAND, L. Immuno histochemistry using a *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis. **Modern Pathology**, v. 19, p.1606-1614, 2006.

NEONAKIS, I. K.; GITTI, Z.; KRAMBOVITIS, E.; SPANDIDOS, D. A. “Molecular diagnostic tools in mycobacteriology,” **Journal of Microbiological Methods**, vol. 75, no. 1, pp. 1–11, 2008.

NEILL, S. D. et al. 1994. Pathogenesis of Mycobacterium bovis infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 41- 52, 1994.

NEIVA, E. Búfalos: **Apesar do segundo maior rebanho. Amapá ainda sofre com baixa produtividade.** Jornal Folha do Progresso. 02/06/2010. Disponível em: <http://www.folhadoprogresso.com.br/folha3br2/modules/news/article.php?storyid=1576>. Acesso em: 12/03/2016.

NORONHA, G. 2015. **Cadeia produtiva da pecuária de corte do município de Tailândia, estado do Pará: estrutura e caracterização sanitária dos abates.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Universidade Federal do Pará – UFPA. 2015

OIE. - **Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines**, 2000; http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00050.htm. Acessado em: 15/10/2015.

OIE. World Organisation for Animal Health. **Bovine Tuberculosis.** In: Terrestrial Manual. Paris: OIE, 2009. Chap2.4.7, p. 1-16, 2009.

OLIVEIRA, V. M.; FONSECA, A. H.; PEREIRA, M. J. S.; CARNEIRO, A. V.; JESUS, V. L. T.; ALVES, P. A. M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3; p. 574-579, 2008.

OLIVEIRA, A. C. S.; PEDROSO, S. C. S.; FERREIRA, G. V. L.; ROOS, T. B.; MORAES, C. M. Detecção de fraude por substituição de carne bovina por carne moída bubalina através da PCR *multiplex* em amostras de carne moída comercializada no município de Macapá, estado do Amapá, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, Edição Especial, VII Congresso Latino-americano e XIII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, Búzios – Rio de Janeiro, 28/04 a 01/05/2015.

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

PACOLA, A. **Tuberculose bovina.** Monografia apresentada como requisito da disciplina: Trabalho de conclusão de curso, do curso de Medicina Veterinária. Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos, São João da Boa Vista, SP. p. 26 e 27, 1998.

PAGLIS, J. R. **Processamento de tecidos em micro-ondas para o diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico rápido de lesões em linfonodos de suínos na inspeção sanitária.** 70 f. Dissertação - Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, 2013.

PAIXÃO, T. A.; NETA, A. V. C. **Tuberculose bovina: diagnóstico à campo. 2006.** Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/tuberculosebovina->

diagnostico-a-campo-30647/?actA=7&areaID=60&secaoID=183. Acesso em: 10 agosto, 2015.

PALMER, M.V.; WATERS, W.R.; THACKER, T.C. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Vet. Pathol.**, v. 44, p. 863-874, 2007.

PARREIRAS, P. M. **Tipificação de *Mycobacterium bovis* utilizando spoligotyping e MIRU-VNTR e avaliação da sensibilidade à quimioterápicos de estirpes isoladas em Minas Gerais e de outras regiões brasileiras.** 2003, 39f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. Minas Gerais.

PEREIRA, H. M., et al. Ocorrência de tuberculose em rebanho bubalino (*Bubalus bubalis* var. *Bubalis-linneus*, 1758) em uma propriedade do município de Arari, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, p.546-550, 2009.

PINTO, P. S. A.; FARIA, J. E.; VILORIA, M. I. V. Bevilacqua P.D. 2002. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção post-mortem de bovinos. **Rev. Bras. Saúde Prod. Ani.** 3 (1):10-15. 2002.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v.99, p.357-399, 1988.

PUROHIT, M. R.; MUSTAFA, T.; WIKER, H. G.; MORKVE, O.; SVILAND, L. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen MPT64. **Diagnostic Pathology**, v. 2, n. 36, 2007.

QUINN, P. J.; DONNELLY, W. J. C.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.** Porto Alegre, 2005.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária – um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737p, 2002.

RAMOS, D. F. **Caracterização molecular de isolados de *Mycobacterium bovis* de rebanhos de diferentes regiões do Brasil.** 2012, 108f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas: Rio Grande do Sul, 2012.

RHYAN, J. C.; SAARI, D. A. A comparative study of the histopathologic features of bovine tuberculosis in cattle, fallow deer (*Dama dama*), sika deer (*Cervus nippon*), and red deer and elk (*Cervus elaphus*), **Vet. Pathol.**, v. 32, n. 3, p. 215-220, 1995.

RIBEIRO, A. C. C. L. **Diagnóstico da tuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*).** 2003. 34f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RIBEIRO, D. D. S. et al. Serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the region of Viana, Maranhão, Brazil. **Jornal Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, p. 839-841, 2011.

RIET-CORREA, F.; GARCIA, M. Tuberculose. In: RIET- CORREA, F.; SHILD, A.L.; MENDEZ, M.C; LEMOS, R.A.A. (Eds). **Doenças de Ruminantes e Equinos**. vol.1, São Paulo: Varela, p.351-361, 2001.

RMC, S. et al., 2006. Evaluation of polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in indigenous and non-indigenous patients* Evaluation of polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in indigenous and non-indigenous patients 235. **J Bras Pneumol. J Bras Pneumol**, 3232(33), pp.234-40234. 2006.

ROCHA, V. C. M. **Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pelas técnicas de Spoligotyping, MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas**. 2009, 97f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP. São Paulo: São Paulo, 2009.

RORING, S.; HUGHES, M. S.; SKUCE, R. A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.227-236, 2000.

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

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

RUGGIERO, A. P. et al., 2007. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arq. Inst. Biol**, 74(1), pp.55-65. 2007.

SAKAMOTO, S. M.; HEINEMANN, M. B.; TELLES, M. A. S.; ROXO, E.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA NETO, J. S. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.66, n.2, p.44-58, 1999.

SALAZAR, F. H. P. **Ocorrência de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis* em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil**. 2005. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2005.

SALES, M. L. **Identificação do *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* por PCR**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Universidade Federa de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte. 2012.

SALES, M. L. et al. Evaluation of molecular markers for the diagnosis of *Mycobacterium bovis*. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 5, p. 433-438, 2014.

SANTO, T. E. **Amapá tem o segundo maior rebanho de bubalino do país**. 2013, Jornal O Tribuna Amapaense. Postado em: 13/08/2013. Disponível em: <http://tribunaamapaense.blogspot.com.br/2013/08/amapa-tem-o-segundo-maior-rebanho-de.html>. Acesso em: 29/04/2016.

SANTOS, A. S. O. **Lesões, isolamento e expressão imuno-histoquímica do *Mycobacterium bovis* no granuloma da tuberculose em bovinos do norte fluminense**. 2004. 73f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 2004.

SARWAR, A.; HAQUE, A.; AFTAB, S.; MUSTAFA, M.; MOATASIM, A.; SIDDIQUE, S. et al. Spectrum of Morphological Changes in Tuberculous Lymphadenitis. **Int J of Pathol**, v. 2, p. 85-89, 2004.

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

SEVA, J. et al., 2002. Caprine tuberculosis eradication program: an immunohistochemical study. **Small Ruminant Research**, v. 46, p. 107-114, 2002.

SILVA, F. L.; NOGUEIRA, R. H. G. Imunohistoquímica em Patologia Veterinária. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 38, p. 44-53, 2002.

SILVA, W. **Amapá é um dos maiores produtores de bubalinos do Brasil: Estado é pioneiro em técnicas de reprodução de bubalinos em áreas de várzea**. 2010, Secretaria de Estado da Comunicação. 2010. Disponível em: <http://www.amapadigital.net/noticias/2010/geral/novembro/30-11-10-geral20.html>. Acesso em: 09/05/2015.

SILVA, M. C. A.; MENDONÇA, G. A.; SOARES, D. B.; BUENO, J. P. R. Alterações anatomopatológicas identificadas na inspeção *post mortem* em bovinos no abatedouro frigorífico no município de Uberlândia – MG. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.9, n.17, p. 82, 2013.

SILVA, L. B. A.; ESTEVES, C.; FARIA, P. B.; TEIXEIRA, J. T.; ARAÚJO, T. S. Prevalência de lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos no Amapá, Brasil. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 8, n. 12, ed. 261, art. 1732, Londrina, junho, 2014.

SILVA, D. A. V.; BURGER, K. P.; MARTINS, A. M. C. V.; PROVIDELLO, A. Identificação de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 08, n. 2, p. 149-160, abr-jun, 2014b.

SILVA, J. A.; BERBET, M. L. D. G.; SANTOS, S. C.; PAUPITZ, J. A. socioeconomia e o setor florestal do Estado do Amapá (Diagnóstico). Governo do Estado do Amapá (SDR, IEF, SEMA, IMAP). **Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, FAPUR**. 76f. 2014c.

SILVA, D. A. V. **Comparação entre métodos diagnósticos da tuberculose em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos do Estado de São Paulo**. 2015. 56 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.

SIMÕES, J. R. **Prevalência da tuberculose bovina no Estado da Paraíba no período de 2008 a 2009**. 2011. 32f. Monografia (Especialização). Universidade Federal Rural do Semiárido - UFRSA. Recife, Pernambuco, 2011.

SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna de grandes animais – volume 1**. São Paulo: Manole, 900p. 1993.

SMITH, N. et al., 2006. Ecotypes of the Mycobacterium tuberculosis complex. **J Theor Biol**, 239(2), pp.220–5. 2006.

SOINI, H.; MUSSER, J. M. (2001). Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clinical Chemistry**, 47(5), 809–814. 2001.

SOUZA, A. V., SOUZA, C. F. A, SOUZA, R. M., RIBEIRO, R. M. P., OLIVEIRA, A. L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene Alimentar**, v.13, n.59, p.22-26, jan./fev. 1999.

SOUZA, M. A. **Este fato é muito importante, pois alguns produtores de gado de corte, com altos índices de condenação por tuberculose, enviam seus animais para serem abatidos em locais sem controle sanitário**. 2013, 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

SOUZA FIGUEIREDO, E. E. et al., 2009. Identification of Mycobacterium bovis Isolates by a multiplex PCR. **Braz J Microbiol**. Apr-Jun; 40(2): 231-233. 2009.

TABOSA, I. M.; TRINDADE, V. M.; VALE, G. M. G.; DANTAS, A. F. M.; VIEIRA, J. M.; MEDEIROS, M. B. A.; AZEVEDO, E. O.; MELO, M. A.; ANDRADE, M. G.; SOUZA, S. B.; MEDEIROS, L. S.; RODRIGUES, R. D.; XAVIER, S. D. Ocorrência de tuberculose em bovinos abatidos no matadouro municipal de Patos- PB- Brasil. **R. Bras. Vet.**, v. 7, n. 1, p. 61-62, 2000.

TAYLOR, G. M.; WORTH, D. R.; PALMER, S.; JAHANS, K.; HEWINSON, R. G. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Veterinary Research**, v. 3, n. 12, 2007.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M.E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 323-334, 2007.

TELENTI, A. et al., 1993. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, pp.175–178. 1993.

THIERRY, D. et al., 1990. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 28(12), pp.2668–2673. 1990.

ULRICHS, T.; LEFMANN, M.; REICH, M.; MORAWIETZ, L.; ROTH, A.; BRINKMANN, V.; et al. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative Mycobacterium tuberculosis organisms and their precise localization in human tissue. **Journal Pathol**, v. 205, n. 5, p. 633-640, 2005.

ULRICHS, T.; KAUFMANN, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. **Journal Pathol**, v.208, n.2, p.261-269, 2006.

VAN SOOLINGEN, D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: Main methodologies and achievements. **Journal of Internal Medicine**. Jan; 249(1):1-26. 2001.

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA, E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, n.2, p.164-169, 2008.

VITALE, F.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S. Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Cattle by PCR Using Milk, Lymph Node Aspirates, and Nasal Swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1050-1055, 1998.

VURAL, S. A.; ALCIGIR, M. E. Detection of pathomorphological and immunohistochemical findings of tuberculosis in cattle slaughtered in Ankara and its surroundings. **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, v. 57, p. 253-257, 2010.

WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. Advanced granulomatous lesions in Mycobacterium bovis - infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gd (WC1+) T cells and CD 68+ cells. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p.223- 234, 2005.

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

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

ZAKHAM, F.; BAZOUI, H.; AKRIM, M. et al. Evaluation of conventional molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from Morocco. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.6, p.40-45, 2012.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T. P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIOVARANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopses and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, p.749-752, 2001.

ZANINI, M. S. **Polimorfismo de DNA em *Mycobacterium bovis* e sensibilidade à isoniazida no Brasil**. 2002, 59 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, Belo Horizonte: Minas Gerais.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T. P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIORAVANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymph node biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 809-813, 2002.