

Brucelose e Tuberculose Bovina

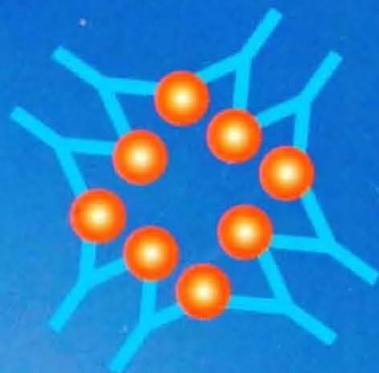
Epidemiologia,
controle e
diagnóstico

Editores Técnicos

Robson Ferrelra Cavalcante de Almeida

Cleber Oliveira Soares

Flábio Ribeiro de Araújo

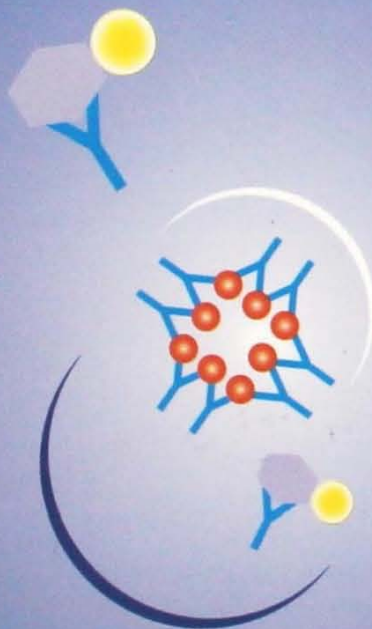


Embrapa



Este livro aborda as enfermidades do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Bovina – PNCEBT –, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e foi estruturado em quatro capítulos, um glossário com termos, siglas e abreviações e um índice remissivo.

Nos capítulos 1 e 3, são abordadas as questões relativas à epidemiologia e ao controle da brucelose e da tuberculose bovina, respectivamente. Versam sobre sua situação no Brasil e tecem comentários sobre a situação mundial, além de abordar alguns aspectos biológicos, morfológicos e patológicos dos agentes etiológicos envolvidos nessas enfermidades, e essas enfermidades como zoonose.



Brucelose e Tuberculose Bovina

**Epidemiologia,
controle e diagnóstico**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Luís Fernando Rigato Vasconcellos
Membros

Diretoria-Executiva

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Gado de Leite

Kepler Euclides Filho
Chefe-Geral

Embrapa Informação Tecnológica

Fernando do Amaral Pereira
Gerente-Geral

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Brucelose e Tuberculose Bovina

**Epidemiologia,
controle e diagnóstico**

Editores Técnicos

*Robson Ferreira Cavalcante de Almeida
Cleber Oliveira Soares
Flávio Ribeiro de Araújo*

*Embrapa Informação Tecnológica
Brasília, DF
2004*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W3 Norte (final)
Caixa Postal 040315
CEP 70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 448-4236
Fax: (61) 340-2753
vendas@sct.embrapa.br
www.sct.embrapa.br

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262, Km 4
Caixa Postal 154
79002-970 Campo Grande, MS
Fone: (67) 368 2064
Fax: (67) 368 2180
www.cnp gc.embrapa.br
sac@cnp gc.embrapa.br

Embrapa Informação Tecnológica

Coordenação editorial: *Edson Junqueira Leite e Lucilene Maria de Andrade*
Tratamento editorial: *Raquel Siqueira de Lemos*
Projeto gráfico e editoração eletrônica: *José Batista Dantas*

Embrapa Gado de Corte

Supervisão editorial e padronização eletrônica
dos originais: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*
Revisão de texto: *Lúcia Helena de Paula do Canto*
Normalização bibliográfica: *Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra*
Capa: *Luiz Antonio Dias Leal*
Fotos da capa
Vaca holandesa: *Marilda Zampieri Vieira*
Vacas nelores: *Luiz Antonio Dias Leal*

1ª edição

1ª impressão (2004): 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP
Embrapa Gado de Corte

Brucelose e tuberculose bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico
/ editores técnicos: Robson Ferreira Cavalcante de Almeida ...
[et al.]. – Brasília : Embrapa Informação Tecnológica, 2004.
95p. : 22 cm.

ISBN 85-7383-266-5

1. Bovino - Doença. 2. Brucelose. 3. Tuberculose. 4. Sanidade animal. I. Almeida, Robson Ferreira Cavalcante de. II. Soares, Cleber Oliveira. III. Araújo, Flávio Ribeiro. IV. Título.

CDD 636.208 969 (21. ed.)

© Embrapa 2004

Autores

Ana Luiza Alves Rosa Osório – Médica-Veterinária, D.Sc., professora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Departamento de Medicina Veterinária, Caixa Postal 549, CEP 79070-900 Campo Grande, MS. E-mail: analudmv@nin.ufms.br

Cláudio Roberto Madruga – Médico-Veterinário, Ph.D., pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262 Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS.
E-mail: madruga@cnpqg.embrapa.br

Cleber Oliveira Soares – Médico-Veterinário, Ph.D., pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262 Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. E-mail: cleber@cnpqg.embrapa.br

Flávio Ribeiro Araújo – Médico-Veterinário, M.Sc., pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262 Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS.
E-mail: flabio@cnpqg.embrapa.br

Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge – Médica-Veterinária, M.Sc., professora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Departamento de Morfofisiologia, Caixa Postal 549, CEP 79070-900 Campo Grande, MS. E-mail: ksantos@nin.ufms.br

Letícia Almeida R. C. Monteiro – Médica-Veterinária, Agência Estadual de Defesa Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul – Iagro, Av. Senador Filinto Müller, 1.146, CEP 79070-900 Campo Grande, MS.
E-mail: leticiacmonteiro@bol.com.br

Robson Ferreira Cavalcante de Almeida – Médico-Veterinário, mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Caixa Postal 549, CEP 79070-900 Campo Grande, MS.
E-mail: rfcalmeida@hotmail.com

Apresentação

Uma nova ordem mundial, conseqüente à globalização da economia, vem sistematicamente alterando as relações comerciais entre as nações, estabelecendo interações dos diversos sistemas de produção e consumo. Essas interações, por decorrência, promovem a quebra de paradigmas alfandegários, e determinam que tão-somente sejam admissíveis salvaguardas de ordem sanitária às questões mercantis internacionais dos produtos primários, sob a égide da promoção e da manutenção da saúde das culturas agrícolas e dos rebanhos. A diversidade das condições sanitárias entre os países do mundo lhes impõe, além da vocação para a produção de alimentos, a existência de condições satisfatórias de competitividade em consonância com as inúmeras condicionantes sanitárias vigentes. Soma-se a essa situação a promoção da saúde pública, por meio do consumo de alimentos hígidos, a saúde ambiental e a dos indivíduos.

Além das invejáveis condições naturais brasileiras para a produção agropastoril, já vislumbrando a ocupação de merecido destaque no contexto das nações produtoras de alimentos, o Brasil vem exercitando, há algum tempo, o aprimoramento de nossa produção pecuária. O fato de possuímos o maior rebanho bovino comercial do planeta assume significância ímpar em razão, além de sua quantidade, da qualidade genética e das tecnologias empregadas na produção. Por si só tais vantagens não configuram, entretanto, a certeza de mercados.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, consciente de suas responsabilidades pela promoção e manutenção da saúde de nossos rebanhos, vem logrando êxito em seus programas de combate às enfermidades dos animais. Tal sucesso é conseqüência da adoção de políticas sanitárias claras, amplamente debatidas com o setor produtivo, buscando, nas diversas opiniões, a definição de propósitos e objetivos, compartilhando decisões e responsabilidades, envolvendo, enfim, todos os elos da cadeia produtiva em um exercício de cidadania, com respeito e maturidade.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT) não foge desse paradigma. A desejável parti-

cipação dos diversos pares que atuam nesse segmento da cadeia produtiva é, sem dúvida, o alicerce do Programa. O engajamento profissional dos médicos-veterinários, norteado por princípios éticos e científicos, está sendo constantemente estimulado e promovido, e nesse propósito é imperiosa a participação dos organismos de ensino e pesquisa agropecuária, de maneira a propiciar, nos termos definidos pelo Programa, conhecimentos teóricos e práticos, atualizados e suficientes ao bom desenvolvimento das atividades e à consecução dos objetivos do Programa.

Como em outras tantas ocasiões em que fora demandada, a Embrapa Gado de Corte estreitou parceria com a Delegacia Federal de Agricultura em Mato Grosso do Sul e o Departamento de Defesa Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, habilitando-se desde o início como entidade apta a promover os cursos de capacitação ao credenciamento dos médicos-veterinários envolvidos no PNCEBT.

Para o suporte didático dessa ação, a Embrapa Gado de Corte pôs-se a dividir seus conhecimentos, multiplicando e potencializando seus efeitos pela publicação do livro *Brucelose e Tuberculose Bovina: epidemiologia, controle e diagnóstico*. Obra de fácil leitura e entendimento, ricamente ilustrada, que consolida os mais recentes ensinamentos da literatura científica sobre o assunto, ela com certeza será um marco referencial do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. As abordagens claras e atualizadas dos assuntos denotam o esmero e o zelo com que o livro foi produzido, envaidecendo não apenas os seus autores e a Embrapa Gado de Corte, como também a Medicina Veterinária Sul-Mato-Grossense.

Heitor Walter de Lima

Chefe do Serviço de Defesa Agropecuária
Delegacia Federal de Agricultura em Mato Grosso do Sul

Prefácio

Em 2001 foi instituído, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Bovina (PNCEBT), com os objetivos principais de reduzir a prevalência da brucelose e da tuberculose e criar um número significativo de propriedades certificadas como livres dessas enfermidades. Antes do Brasil, outros países já haviam iniciado campanhas de controle e erradicação dessas doenças. Alguns atingiram os seus objetivos, enquanto outros persistem em alcançá-los. A organização do programa e os vários fatores inerentes aos agentes etiológicos, às condições ambientais e de localização geográfica podem ter sido determinantes para o sucesso das campanhas.

O diagnóstico e a prevenção são as principais ferramentas existentes para o controle da brucelose e da tuberculose bovina. Ainda que tenham sido criados novos métodos de diagnóstico para essas enfermidades, e de imunização contra a brucelose, as tecnologias tradicionais continuam a ser utilizadas em vários países. Isso porque as técnicas tradicionais são as únicas disponíveis, e, portanto, garantem a execução das campanhas além de serem economicamente viáveis.

A brucelose e a tuberculose bovina são doenças infecciosas de grande impacto para a cadeia produtiva da pecuária bovina no Brasil e no mundo, pois, além de determinarem sérios prejuízos diretos e indiretos ao sistema produtivo, constituem importantes zoonoses, cujas distribuição e dispersão têm aumentado a cada ano. Como forma de minimizar os prejuízos e os impactos negativos determinados pela **brucelose e tuberculose bovina**, é necessária também a transferência de conhecimentos, tecnologias e soluções no âmbito das questões de **epidemiologia, controle e diagnóstico** dessas enfermidades, com o propósito de contribuir para o seu controle e sua erradicação.

O presente livro foi estruturado em duas partes: uma contempla a enfermidade **brucelose bovina** e a outra versa sobre a **tuberculose bovina**. Para cada enfermidade, há um capítulo relativo aos aspectos da

epidemiologia e do controle, e outro que trata do *diagnóstico*. Esta obra não pretende ser um tratado sobre brucelose ou tuberculose, mas, simplesmente, tem por objetivo proporcionar informação atualizada da epidemiologia, dos métodos de diagnóstico tradicionais e modernos, e de alternativas de controle dessas enfermidades. Como consequência dessas informações, espera-se criar uma análise crítica sobre a necessidade de participação efetiva dos profissionais médicos-veterinários no PNCEBT, e de uma organização coordenada e integrada de apoio a esse programa entre o Mapa, as instituições de pesquisa e as de ensino e a iniciativa privada. Dessa forma, será possível gerar, adaptar, validar e disponibilizar soluções tecnológicas para o estabelecimento de sistemas de diagnóstico e de prevenção mais eficientes, à medida que o programa for desenvolvido, para que a erradicação e o controle dessas doenças ocorram com o menor custo possível e de forma eficaz. Assim, todas as críticas e sugestões dos leitores serão bem-vindas, pois poderão contribuir para o aprimoramento da obra e o conseqüente aumento da produtividade da cadeia produtiva da pecuária bovina brasileira.

Os Editores

Sumário

Capítulo 1

Brucelose bovina: Epidemiologia e controle	13
--	----

Capítulo 2

Brucelose bovina: Diagnóstico	25
-------------------------------------	----

Capítulo 3

Tuberculose bovina: Epidemiologia e controle	45
--	----

Capítulo 4

Tuberculose bovina: Diagnóstico	61
---------------------------------------	----

Glossário	81
-----------------	----

Índice remissivo	89
------------------------	----

Epidemiologia e controle

Robson Ferreira Cavalcante de Almeida

Ana Luiza Alves Rosa Osório

Cláudio Roberto Madruga

Flávio Ribeiro de Araújo

Cleber Oliveira Soares

Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge

Resumo

A brucelose bovina é uma enfermidade infectocontagiosa, causada pela bactéria *Brucella abortus*, encontrada em diversas partes do mundo. É caracterizada por aborto no terço final da gestação e infertilidade. Constitui, ainda, uma importante zoonose, que ocorre especialmente em profissionais envolvidos com atividades pecuárias. A transmissão entre animais dá-se por ingestão de pasto e/ou água contaminados com secreções e restos de parto ou aborto de animais infectados. A vacinação é a forma mais eficiente de prevenção da brucelose e, no Brasil, a única vacina oficialmente disponível utiliza a cepa atenuada B19 de *B. abortus*.

Palavras-chave: brucelose, *Brucella abortus*, bovino, controle, epidemiologia, doença.

Abstract

Bovine brucellosis is a worldwide spread infectious and contagious disease caused by the bacteria *Brucella abortus*. This disease is characterized by lack of fertility and late pregnancy abortion. Brucellosis is an important zoonosis that affects professionals especially those involved with livestock. The transmission among animals occurs mainly by ingestion of forage or water contaminated with secretions of parturition or abortion wastes from infected animals. Vaccination is the most efficient method to prevent brucellosis. In Brazil, the only available vaccine is made with attenuated B19 strain of *B. abortus*.

Key-words: brucellosis, *Brucella abortus*, cattle, control, epidemiology, disease.

Introdução

A brucelose bovina é causada pela bactéria *Brucella abortus*, que provoca problemas reprodutivos, tais como aborto e infertilidade. As perdas com a enfermidade refletem diretamente na lucratividade da exploração pecuária, causando sérios prejuízos econômicos e produtivos ao agronegócio da bovinocultura.

Apesar da ausência de levantamentos oficiais, estima-se que a brucelose determina um prejuízo anual de, aproximadamente, 600 milhões de dólares na América Latina (Vieira, 2002). Na década de 1970, estudos assinalaram perdas da ordem de 230 milhões de dólares, em 11 países do continente americano (Serrão, 2001). No Brasil, em um estudo realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa –, em 1971, estimou-se a cifra de 32 milhões de dólares/ano com perdas econômicas acarretadas pela brucelose, considerando-se apenas os abortos (Brasil, 2001).

Adicionalmente, a susceptibilidade do homem ao agente etiológico tem relevante importância. Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS –, estima-se que a cada ano surgem 500 mil novos casos de brucelose humana, afetando principalmente pessoas envolvidas com a bovinocultura (OMS, 2001).

Os dados de notificações oficiais, no território brasileiro, indicam que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5% no período de 1988 a 1998. Em 1999, foram liberados pelo Mapa 5,5 milhões de doses de vacina contra brucelose, das quais 2,5 milhões foram consumidas no Estado de Minas Gerais, em virtude de esse Estado já ter implantado um programa de vacinação obrigatória (Brasil, 2001).

Além das perdas decorrentes da menor produtividade dos bovinos e da redução da capacidade de trabalho dos seres humanos infectados, há risco do fechamento do comércio de carne bovina para exportação. Isso afetaria a balança comercial do Brasil, pois a pecuária participa com uma porcentagem relevante do PIB, e ocorreria uma paralisação da tendência de conquista de novos mercados internacionais como tem ocorrido nos últimos anos.

Em virtude da importância da enfermidade, os órgãos oficiais, a comunidade científica e os pecuaristas concluíram que havia necessidade de se implantar um programa de controle.

O Mapa, por meio da Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001, institucionalizou e implementou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT. O objetivo desse programa é baixar a prevalência e a incidência de casos de brucelose e tuberculose, bem como criar um número significativo de propriedades certificadas como livres dessas infecções para que possam oferecer ao consumidor produtos de baixo risco sanitário. Para tanto, foram estabelecidas as seguintes propostas técnicas:

- Vacinação contra brucelose.
- Certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose.
- Certificação de propriedades monitoradas para brucelose e tuberculose.
- Controle do trânsito de reprodutores e normas sanitárias para participação em exposições, feiras, leilões e outras aglomerações de animais.
- Credenciamento de médicos-veterinários.
- Diagnóstico e apoio laboratorial.
- Participação do serviço oficial.
- Educação sanitária.

Características biológicas e morfológicas de *Brucella* sp.

A brucelose é uma enfermidade que acomete animais domésticos e silvestres. *Brucella* foi considerado um gênero monotípico com espécie *Brucella melitensis* e os biovars *abortus*, *canis*, *neotomae*, *ovis* e *suis* (ICSB, 1988). No entanto, para melhor compreensão, será adotada a nomenclatura tradicional. Existem seis espécies do gênero *Brucella* que estão associadas a hospedeiros específicos ou preferenciais: *Brucella abortus* (bovinos), *Brucella suis* (suínos), *Brucella melitensis* (caprinos), *Brucella neotomae* (murinos), *Brucella ovis* (ovinos) e *Brucella canis* (caninos).

B. melitensis é a espécie que tem sido mais relatada infectando o homem, entretanto, outras espécies caracterizam a brucelose como zoonose. *Brucella* sp. é parasito intracelular facultativo, estando a patogenia e a natureza da resposta imune fortemente relacionadas com esse fato (Schurig, 2000).

Essa bactéria é um cocobacilo gram-negativo, sem cápsula, imóvel e não esporulado. Pode apresentar, em cultivo primário, morfologia colonial lisa, rugosa ou mucóide. A membrana celular é composta de lipopolissacarídeos e contém um polissacarídeo (cadeia O) que possui um importante papel no diagnóstico sorológico da brucelose, pois é um antígeno imunodominante. A maioria dos testes sorológicos é baseada na detecção de anticorpos contra a cadeia O de *Brucella* sp. (Schurig, 2000).

Epidemiologia e patologia

A enfermidade ocorre em diversos países do mundo e encontra-se amplamente distribuída. Consiste num grave problema de saúde humana, que acomete principalmente pessoas que manipulam carcaças contaminadas ou que ingerem leite não pasteurizado (Radostits et al., 1994).

Sérios prejuízos econômicos são causados em função, principalmente, de abortos, em geral no terço final da gestação, com retenção de placenta e descargas uterinas, e conseqüente eliminação de brucelas por via vaginal. Isso contribui para a infecção dos animais que entram em contato com essas secreções. Nos machos, em menor extensão, causa orquite-epididimite e infecção das glândulas anexas. Em ambos os sexos, determina infertilidade (Radostits et al., 1994).

A susceptibilidade de bovinos a *B. abortus* é influenciada pela idade, sexo e estágio reprodutivo do animal. Animais sexualmente maduros e vacas prenhes são mais sensíveis à infecção do que animais imaturos de qualquer sexo, sendo a brucelose, portanto, mais relacionada com a maturidade sexual do que com a idade. A susceptibilidade aumenta com a gestação, principalmente em seu terço final. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da concentração de eritritol no útero com o avançar da gestação, que desempenha um papel importante no tropismo da bactéria para esse órgão (Keppie et al., 1965; Samartino & Enright, 1992; Radostits et al., 1994).

Em todas as espécies de animais, inclusive no homem, as principais portas de entrada do agente são a pele e as mucosas digestória e conjuntiva. Pastos, cochos de alimentos e águas contaminadas pelas secreções, membranas fetais, fetos abortados ou bezerros recém-nascidos acometidos pela doença são considerados os principais meios de disseminação. A mucosa genital também pode ser uma porta de entrada, principalmente quando utiliza o sêmen contaminado na inseminação artificial (Radostits et al., 1994), pois este é depositado diretamente no interior do útero, onde a bactéria encontra condições ideais para sua multiplicação. A escolha do material a ser empregado na inseminação deve ser criteriosa quanto à sua procedência, pois a aquisição de sêmen oriundo de reprodutores infectados consiste em fonte de contaminação para as vacas do rebanho.

Uma vez transpostas essas barreiras naturais, as brucelas são usualmente drenadas para gânglios linfáticos regionais, os quais aumentam de volume por causa da hiperplasia linfática e retículo-endotelial e da inflamação. A partir da via linfática ou sangue, dissemina-se por todo o organismo, colonizando órgãos ou tecidos ricos em células do sistema retículo-endotelial, como o útero (Thoen et al., 1983; Vasconcelos et al., 1987).

O estabelecimento da infecção depende do inóculo, da virulência da bactéria e da resistência do hospedeiro, a qual é determinada por mecanismos imunológicos inatos e específicos (Kreutz et al., 2001). A resistência natural é determinada por diversos genes. Estima-se que cerca de 20% dos bovinos são naturalmente resistentes à infecção por *B. abortus*. Nessa resistência há a participação de genes como o Nramp, cuja função não é totalmente conhecida, mas é sugerida, com relação à produção de óxido nítrico (Tizard, 1996). Fenotipicamente, a resistência é manifestada pela habilidade dos macrófagos limitarem a replicação de *B. abortus* (Price et al., 1990).

Bezerros nascidos de mães infectadas apresentam no início títulos de anticorpos altos contra *B. abortus*, por causa da ingestão de colostro (imunidade passiva). Esses títulos diminuem entre quatro e seis semanas após o nascimento. Tal fato é, em geral, interpretado como uma evidência de que a infecção não se estabeleceu, porque os bovinos estão em idade pré-pubescente, sendo naturalmente resistentes. No entanto, foi verificado o isolamento de *B. abortus* em bezerros sorologicamente negativos,

entre quatro e seis semanas de idade, nascidos de mães infectadas. Sabe-se, todavia, que em circunstâncias naturais, esses animais são detectados como positivos quando atingem a puberdade. Provavelmente, as infecções de bezerros passam a ocorrer no útero ou logo após o nascimento, permanecendo então em estado latente, até a maturidade sexual. As provas sorológicas convencionais nesses animais resultam negativas até oito semanas antes do parto (Sutherland, 1980).

Deve-se suspeitar da ocorrência de brucelose em rebanhos sempre que ocorrerem abortos, principalmente, nos estágios finais de gestação. Entretanto, o aborto em bovinos pode ter várias causas, necessitando, portanto, da realização de diagnóstico diferencial. Após a constatação da brucelose bovina, o controle da enfermidade baseia-se na separação imediata dos animais positivos do restante do rebanho e na vacinação das fêmeas entre três e oito meses. A vacina utilizada no Brasil é a elaborada com a amostra 19 de *B. abortus* – B19.

Segundo o Departamento de Defesa Animal – DDA – do Mapa, o último diagnóstico nacional de situação da brucelose bovina foi realizado em 1975 (Brasil, 2001), quando se estimou a prevalência de animais soropositivos (Tabela 1).

Posteriormente, outros levantamentos sorológicos por amostragem, realizados em alguns Estados (RS, SC, MS, MG, PR), revelaram variações na prevalência de brucelose, a partir do ano de 1975 (Brasil, 2001). A análise desses dados revela a tendência do decréscimo ou estabilidade da prevalência da enfermidade nesses Estados (Fig. 1).

Tabela 1. Prevalência de bovinos soropositivos para brucelose no Brasil, de acordo com a região, no ano de 1975.

Região	Prevalência (%)
Sul	4,00
Sudeste	7,50
Centro-Oeste	6,80
Nordeste	2,50
Norte	4,10

Fonte: Brasil, 2001.

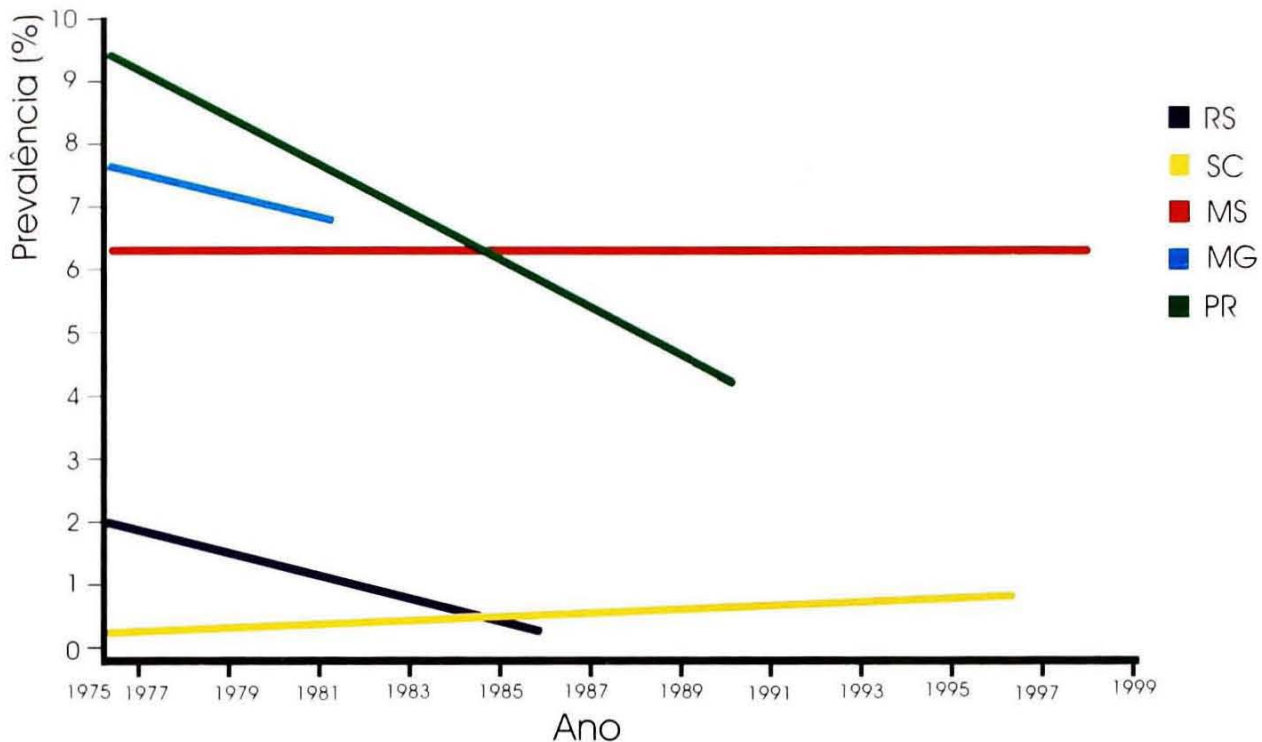


Fig. 1. Dinâmica da prevalência de brucelose bovina em alguns estados brasileiros, de 1975 até o ano de 1998.

Fonte: Brasil, 2001.

Vacinação

A brucelose bovina pode ser controlada com um programa efetivo de vacinação. A vacina utilizada no Brasil é elaborada com a amostra 19 de *B. abortus* – B19 – (Tabela 2). O esquema consiste na vacinação de fêmeas entre três e oito meses de idade. Uma única dose da vacina administrada aos cinco meses de idade geralmente confere imunidade por toda vida do animal, embora todas as fêmeas vacinadas percam seus títulos de anticorpos entre 16 e 18 meses. Por causa da interferência dos anticorpos colostrais, a vacinação de animais até quatro meses não é totalmente eficiente como após os cinco meses de idade (Bishope et al., 1994).

Os animais que desenvolvem uma resposta imune eficiente mediante a vacinação tornam-se resistentes à infecção, entretanto, essa proteção é conferida em aproximadamente 70% dos animais (Nicoletti, 1990).

Em rebanhos contaminados foi empregada a vacinação de animais adultos com doses reduzidas da vacina B19, cerca de 1/20 da dose normal,

que contém 10×10^9 organismos. Normalmente há prevenção de abortos, reduzindo dessa forma o efeito da enfermidade na produtividade do rebanho. Entretanto, esse procedimento apresenta desvantagens, tais como o controle da dose vacinal, porque o veterinário de campo não tem condições de realizar a contagem de colônias. Adicionalmente, persiste o título residual dos anticorpos vacinais que confundem as provas sorológicas mesmo que a brucela tenha sido eliminada (Davies et al., 1980; Radostits et al., 1994). Por essa razão, esse procedimento não é recomendado pelo Mapa.

A vacinação é de vital importância e deve-se proceder com cautela, pois a vacina contém um agente vivo e deve ser manipulada com cuidado para se obter um resultado satisfatório. A vacina deve ser conservada sob refrigeração e reconstituída apenas quando necessária por médico-veterinário. O material não utilizado deve ser descartado em local onde não exista risco de contaminação.

Outra vacina que tem merecido atenção é a preparada com a amostra rugosa de *B. abortus*, denominada RB51 (Tabela 2). Essa vacina foi de-

Tabela 2. Principais propriedades das vacinas utilizadas na imunização de bovinos contra a brucelose.

Propriedades	Vacinas	
	B19 ⁽¹⁾	RB51
Características	Colônia lisa, agente vivo, pouco atenuada, alta virulência	Colônia rugosa, altamente atenuada e estável, menor virulência
Vantagens	Imunidade relativa por toda a vida do animal, prevenção do aborto, resistência à infecção	Imunidade relativa por toda a vida do animal, proteção contra abortos, resistência à infecção, não induz à infecção, não é virulenta para humanos, ausência de títulos vacinais residuais em provas sorológicas
Desvantagens	Títulos vacinais residuais, potencial risco de aborto na vacinação de animais adultos, virulenta para humanos	Ausência de informações a respeito de sua utilização prática e real eficiência nas condições brasileiras

⁽¹⁾ Vacina oficialmente reconhecida e disponível no mercado brasileiro.

envolvida por Schurig et al. (1991), que, após criterioso método de seleção, obtiveram, por multiplicação de uma amostra lisa e virulenta em meio de cultura contendo rifampicina, uma amostra sem a cadeia O, portanto rugosa, altamente atenuada e estável. Após imunização com a vacina RB51, provas como o *card test*, aglutinação em tubos, rivanol, soroaglutinação lenta com 2-mercaptoetanol – SAL-2ME –, fixação de complemento – FC –, imunoadsorção enzimática – ELISA – e fluorescência polarizada – FPA – permaneceram negativas, independente da idade e tempo pós-vacinação dos animais, local de inoculação, dose e frequência das imunizações (Cheville et al., 1993). Segundo Cheville et al. (1993), essa vacina também protege contra o aborto; é uma vacina estável e menos virulenta que a B19; não induz infecções placentárias quando administrada a animais gestantes e não é virulenta para o homem. Esta vacina ainda não é comercializada no Brasil, pois no momento está sob avaliação do Mapa.

Considerações finais

É difícil estabelecer estratégias de controle ou erradicação para a brucelose bovina, pois os procedimentos a serem adotados variam, podendo se encontrar rebanho com animais positivos por causa da infecção natural, ou rebanhos não infectados que apresentam reações positivas por causa dos anticorpos vacinais, ou reações cruzadas com outros microrganismos, principalmente *Yersinia enterocolitica*. Entretanto, alguns pontos são muito importantes, como a adoção de técnicas de diagnóstico viáveis e eficientes, cooperação e esforço conjunto entre médicos-veterinários e laboratórios de diagnóstico, registros precisos do rebanho nas propriedades, educação dos pecuaristas e da comunidade, estabelecimento de medidas de manejo da enfermidade, controle do movimento de animais na propriedade, eliminação permanente dos animais infectados, controle do sêmen a ser utilizado na inseminação artificial e vacinação das fêmeas entre três e oito meses de idade, como principal medida (Cavallero, 1998).

A vacinação com a B19 tem como principal fundamento a proteção dos animais sadios que vivem em ambiente contaminado, propiciando que os animais infectados sejam eliminados gradativamente. A vacinação não pode erradicar a brucelose, mas pode ser um ponto de partida

para tal objetivo. A erradicação requer que o animal infectado seja identificado pela sorologia, considerado como uma fonte de infecção e eliminado do rebanho.

Com o controle e a erradicação da brucelose, aumenta-se o ciclo produtivo da pecuária bovina, além da credibilidade da qualidade do produto final, gerando uma maior aceitação pelos consumidores do mercado interno e externo, incrementando a lucratividade da pecuária bovina brasileira.

Referências

BISHOPE, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. *Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa*. Cape Town: Oxford University Press, 1994. v. 1, p. 1054-1066.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose*. Brasil, 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 05 abr. 2002.

CAVALLERO, J. C. M. Enfermidades causadoras de aborto: brucelose. In: LEMOS, R. A. A. *Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico*. Campo Grande: UFMS, 1998. p. 408-441.

CHEVILLE, N. F.; STEVENS, M. G.; JENSEN, A. E.; TATUM, F. M.; HALLING, S. M. Immune response and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 54, p. 1591-1597, 1993.

DAVIES, G.; COCKS, E.; HERBERT, N. *Brucella abortus* (strain 19) vaccine: protective dose in cattle. *Developments in Biological Standardization*, Basel, v. 8, p. 165-168, 1980.

ICSB. Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Report of the Meeting, 5 september 1986, Manchester, England. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Manchester, v. 38, p. 450-452, 1988.

KEPPIE, J.; WILLIAMS, A. E.; WITT, K.; SMITH, H. The role of erythritol in tissue localization of the *Brucellae*. *British Journal of Experimental Pathology*, New York, v. 46, p. 104-108, 1965.

KREUTZ, L. C.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R. Imunidade contra bactérias. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p. 47-71.

NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 28-300.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Doença: brucelose*. 2001. Disponível em: <http://www.who.int/int.fs/fact.heep.html>. Acesso em: 18 nov. 2001.

PRICE, R. E.; TEMPLETON, J. W.; SMITH, R. I.; ADAMS, L. G. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control *in vitro* intracellular survival of *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 58, p. 879-886, 1990.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine**. 8. ed. London: Balieri Tindall, 1994. 1736 p.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Interaction of bovine chorioallantonic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 53, p. 359-363, 1992.

SCHURIG, G. G. *Brucella abortus vaccines: smooth and rough strains*. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine. Blacksburg: Brunet Publications, 2000. Disponível em: <http://progress.box.co.11/brunet/public.html>. Acesso em: 09 fev. 2000.

SCHURIG, G. G.; ROOP, R. M.; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, D.; SRIRANGATHAN, N. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 28, p. 171-188, 1991.

SERRÃO, U. M. Situação da brucelose animal nas Américas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 230-231, 2001.

SUTHERLAND, S. S. Immunology of bovine brucellosis. **The Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 50, p. 359-367, 1980.

THOEN, C.; BRUNER, J. A.; LUCHSINGER, D. W.; PIETZ, D. E. Detection of brucella antibodies of different immunoglobulin classes in cow milk by enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, n. 44, p. 306-308, 1983.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction**. 5.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1996. 523 p.

VASCONCELOS, S. A.; ITO, F. H.; CÔRTEZ, J. A. Bases para prevenção da brucelose animal. *Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, São Paulo. v. 11, p. 25-36, 1987.

VIEIRA, J. C. Saúde animal: brucelose bovina. *Tecnologia de gestão pecuária*, São Paulo. n. 4, p. 14-17, 2002.

Diagnóstico

Cláudio Roberto Madruga

Cleber Oliveira Soares

Robson Ferreira Cavalcante de Almeida

Ana Luiza Alves Rosa Osório

Flávio Ribeiro de Araújo

Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge

Letícia Almeida R. C. Monteiro

Resumo

Os métodos de diagnóstico da brucelose são divididos em diretos e indiretos. Os métodos diretos consistem no isolamento e identificação da bactéria *Brucella abortus* a partir de tecidos ou secreções de animais infectados. A reação da polimerase em cadeia – PCR – tem sido desenvolvida para identificação do gênero *Brucella* ou suas diversas espécies. Os métodos indiretos ou sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos, produzidos perante a infecção bacteriana. Os testes de aglutinação, dentre eles o rosa-de-bengala, soroaglutinação lenta com 2-mercaptoetanol e o teste presuntivo rápido automatizado, nos quais ocorre a formação de complexos imunes insolúveis, são bastante utilizados para o diagnóstico da brucelose bovina. A fixação de complemento é considerada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento – Mapa – como o único teste sorológico conclusivo para a brucelose bovina no Brasil. Outros testes como os imunoenzimáticos e o ensaio homogêneo de fluorescência polarizada apresentam elevada sensibilidade, e são recomendados pela Organização Internacional de Epizootias – OIE – para serem utilizados em campanhas de controle da brucelose.

Palavras-chave: brucelose, *Brucella abortus*, diagnóstico, sorologia.

Abstract

The methods of diagnosis of brucellosis may be direct or indirect. The direct methods are based on the isolation and identification of the bacteria *Brucella abortus* from tissues and secretions of infected animals. The indirect or serological

methods are based on the detection of antibodies to *B. abortus*, which are produced in response to the bacterial infection. The agglutination tests, such as the 2-mercaptoethanol test and the rapid automated presumptive test, based on the production of insoluble immunocomplexes, are frequently utilized in the diagnosis of bovine brucellosis. The immunoenzymatic tests and the fluorescence polarization assay are utilized to increase the speediness and efficacy of the brucellosis diagnosis, due to the high capability of detection of seropositive animals. The complement fixation is considered by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply – Mapa – as the unique conclusive serological test for bovine brucellosis in Brazil.

Key words: brucellosis, *Brucella abortus*, diagnosis, serology.

Introdução

A brucelose bovina é caracterizada por abortos, principalmente no terço final de gestação e por elevados índices de infertilidade. Deste modo, sempre que esses acontecimentos ocorrerem na propriedade deve-se suspeitar de brucelose. Trata-se de uma doença infectocontagiosa, de ampla distribuição geográfica, determinada pela bactéria *Brucella abortus*.

A confirmação da ocorrência da enfermidade é realizada em laboratório por meio de métodos diretos de diagnóstico, nos quais se objetiva o isolamento e a identificação do agente etiológico a partir de material obtido do animal suspeito. O material desses animais deve ser coletado por técnicos e enviado, sob refrigeração, ao laboratório para ser processado. Apesar de dispendioso e lento, esses métodos são inequívocos e, sempre que possível, devem ser os métodos de eleição.

Os métodos indiretos baseados na detecção de anticorpos, principalmente no soro, contra *B. abortus* constituem a alternativa mais usual para o diagnóstico da brucelose bovina.

Existem diversas provas sorológicas para o diagnóstico da brucelose, no entanto nenhuma é absolutamente precisa. Ademais, existem níveis variáveis de sensibilidade e de especificidade, isso quando se comparam os resultados das provas sorológicas com os obtidos por diagnóstico direto. Assim, deve-se buscar o teste que tenha alta sensibilidade e especificidade relativas, isto é, que apresente uma percentagem de 100% ou próxima de soros com reação positiva de animais comprovadamente

infectados e 0% ou aproximadamente de reações falso-positivas em animais reconhecidamente sem infecção.

O diagnóstico laboratorial é dividido em métodos diretos e indiretos. O método direto baseia-se no isolamento do agente a partir de tecidos de fetos abortados, placenta, exudatos vaginais, gânglios, leite e sêmen (Poester, 1997). Os métodos indiretos ou sorológicos consistem na detecção de anticorpos no soro, no leite, no plasma seminal ou no muco vaginal, e são mais utilizados.

Diagnóstico sorológico

O diagnóstico indireto da brucelose pode ser realizado por meio de vários testes, dentre eles o de rosa-de-bengala, prova da soroaglutinação lenta com 2-mercaptoetanol – SAL-2ME, teste presuntivo rápido automatizado – *rap test*, ensaios de imunoadsorção enzimática – ELISAs, ensaio homogêneo de fluorescência polarizada – FPA – e a fixação de complemento – FC.

O diagnóstico sorológico não deve ser realizado entre duas e quatro semanas antes e após o parto ou aborto, pois ocorrerá um significativo aumento dos resultados falso-negativos. Este incremento deve-se, provavelmente, à mobilização de anticorpos para o colostro e também para os líquidos fetais (Poester et al., 1998).

Rosa-de-bengala

Os testes de aglutinação são largamente empregados no diagnóstico das infecções bacterianas, em particular as que envolvem bactérias gram-negativas, tais como *Brucella* sp. O teste rosa-de-bengala, método que utiliza o antígeno acidificado tamponado, é rápido e prático, sendo de alta sensibilidade, mas de menor especificidade quando comparado às outras provas (Vasconcelos et al., 1987).

O antígeno é uma suspensão de *B. abortus* amostra 1119-3 inativada, corada pelo rosa-de-bengala e diluída a 8% em solução-tampão pH 3,65. Esse antígeno é padronizado por comparação com antígeno padrão de referência do Mapa. Produz resultados satisfatórios como método diferencial em soros de animais não vacinados e suspeitos ao exame clínico, em decorrência de seu pH ácido, que inibe algumas aglutininas inespecíficas (Vasconcelos et al., 1987).

O método consiste na aglutinação direta de anticorpo com o antígeno particulado (bactéria), resultando na formação de complexos insolúveis. A aglutinação das partículas indica a presença de anticorpos específicos para o antígeno (Fig. 1).

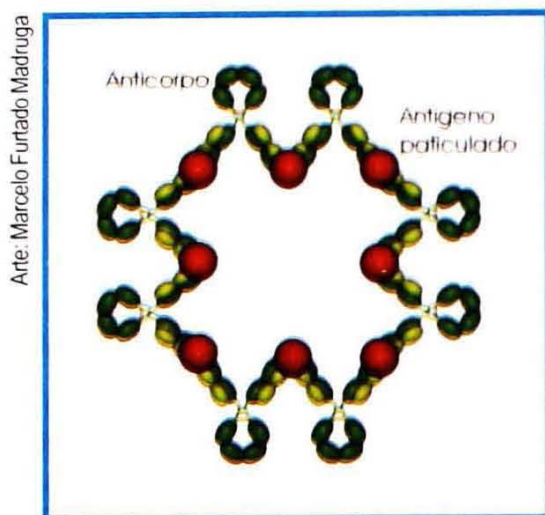


Fig. 1. Representação esquemática da reação de aglutinação direta.

A acidificação da suspensão antigênica tem se mostrado eficiente na redução da reatividade da imunoglobulina da classe M – IgM – e, simultânea, no aumento da capacidade aglutinante da IgG1. Desta forma, em pH 3,65, a IgM é relativamente inativa, enquanto a IgG1 é efetiva (Vasconcelos et al., 1987).

Muitos países utilizam essa prova para o diagnóstico da brucelose bovina por causa do seu baixo custo, facilidade e rapidez na execução do teste e também por evidenciar a infecção precocemente (Radostits et al., 1994).

Nesse teste, podem ocorrer reações positivas em animais não infectados, por causa de anticorpos vacinais e do colostro. Reações falso-positivas também ocorrem por causa de erros laboratoriais ou reações cruzadas com outras bactérias gram-negativas. A infecção por *Yersinia enterocolitica* sorotipo 09 representa a mais importante fonte de reação falso-positiva no diagnóstico da brucelose animal (Ferraz, 1999). Experiências realizadas com anticorpos monoclonais revelaram que o sorotipo 09 de *Y. enterocolitica* possui uma cadeia de lipopolissacarídeo O idêntica à de *B. abortus*, fator este responsável pela ocorrência das reações cruzadas (Kittelberg et al., 1998; Garin-Bastuji et al., 1999).

Para a execução do teste, as amostras de soro são examinadas usando-se o antígeno acidificado tamponado¹, corado com rosa-de-bengala. São misturados 30 µL do soro a ser testado com 30 µL de antígeno, em placa de vidro reticulada, com quadrados de aproximadamente 2 cm². A mistura deve ser levemente homogeneizada durante 4 minutos, em temperatura ambiente, para se observar a aglutinação. Os animais cujas amostras não apresentarem aglutinação, são considerados soronegativos (Fig. 2A), e as amostras que apresentarem reações visíveis de aglutinação, em qualquer intensidade, são consideradas positivas (Fig. 2B) (Araújo et al., 2001).

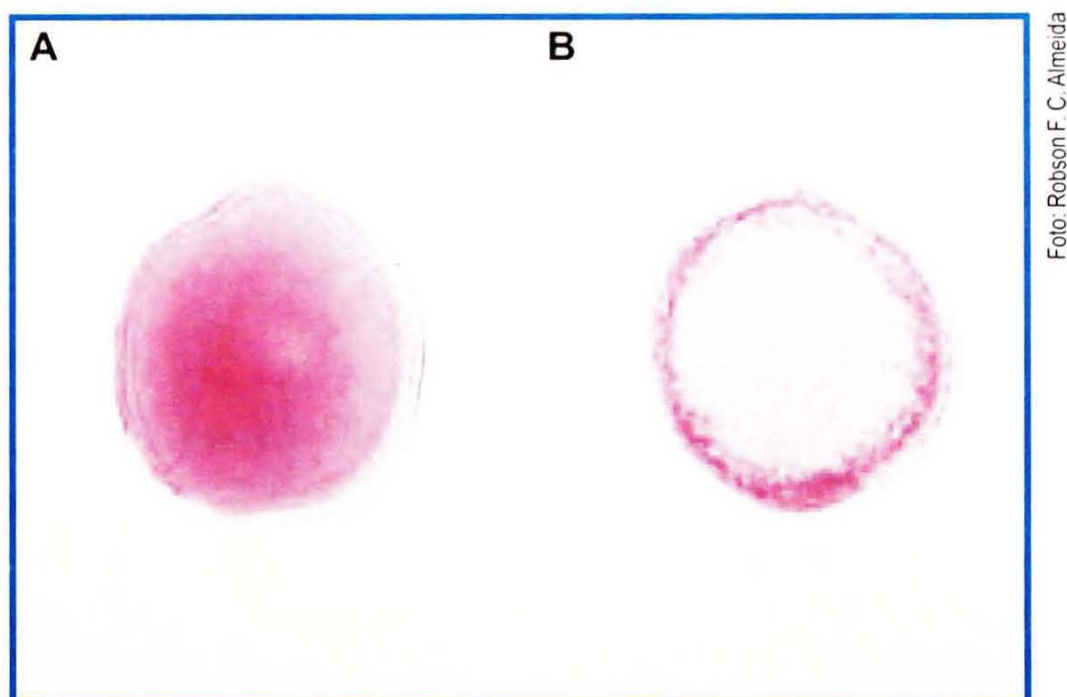


Fig. 2. Reação de aglutinação direta pelo teste rosa-de-bengala para detecção de anticorpos contra *Brucella abortus*: A) amostra negativa; B) amostra positiva.

Soroaglutinação lenta com 2-mercaptoetanol

A soroaglutinação lenta com 2-mercaptoetanol – SAL-2ME – é usada como teste confirmatório da enfermidade. Esse teste baseia-se no tratamento prévio do soro com uma solução que contém 2-mercaptoetanol, que destrói os anticorpos da classe IgM, mas não atua sobre a IgG, inativando-a de forma significativa (Poester, 1997). Os resultados positivos obtidos por este teste estão relacionados com a infecção, porém os resul-

¹ TECPAR - Instituto de Tecnologia do Paraná.

tados negativos devem ser definidos por outras provas de elevada especificidade, sendo no Brasil indicada a fixação de complemento (Carrilho, 1984; Brasil, 2001).

Alguns inconvenientes encontrados na preparação da prova da SAL-2ME consistem na necessidade da utilização de grande número de tubos de ensaios e estantes para estes, e na demora em estabelecer os resultados (48 horas de incubação). Um outro problema do teste está na toxicidade do 2-mercaptoetanol para o laboratorista, que deve trabalhar em capela de exaustão e com máscara (Samartino et al., 1999a, 2000).

Para a realização do teste, devem-se colocar os soros em tubos de ensaio, com auxílio da pipeta de Bang, nos volumes de 0,08, 0,04, 0,02, 0,01 e 0,005 mL. Em seguida adiciona-se, a cada tubo, 1 mL de uma solução de 2-mercaptoetanol diluída a 0,806% em salina. Após homogeneização, a mistura é incubada por uma hora em temperatura ambiente e, em seguida, adiciona-se 1 mL de solução do antígeno para soroaglutinação lenta, diluído a 2% em salina. Incuba-se a mistura a 37°C durante 48 horas. Os volumes de soro e antígeno descritos correspondem às diluições de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400.

A leitura é realizada contra um fundo escuro, com o auxílio de uma fonte de luz. Considera-se a reação completa ou positiva quando ocorre aglutinação completa no fundo do tubo, a qual não se dissolve sob agitação, e o restante da coluna está límpido; reação incompleta, quando ocorre aglutinação parcial no fundo do tubo, e reação negativa, quando a coluna fica turva e os depósitos são dissolvidos mais facilmente. Os soros com títulos iguais ou superiores a 25 são considerados positivos, para fêmeas com idade superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade; e para fêmeas não vacinadas e machos com idade superior a oito meses (Araújo et al., 2001).

Os resultados dessa prova como confirmatório para dois testes de triagem (rosa-de-bengala e o *rap test*), em experimento realizado na Embrapa Gado de Corte, são apresentados na Tabela 1.

A diferença no percentual de positividade no rosa-de-bengala e no *rap test* em relação a SAL-2ME pode ter ocorrido por causa de uma eventual participação de imunoglobulinas da classe IgM nos dois primeiros testes sorológicos.

Tabela 1. Aplicação da SAL-2ME como teste confirmatório em 99 amostras positivas nos testes rosa-de-bengala e *rap test* ou em pelo menos um dos ensaios.

Avaliação	Testes		
	Rosa-de-bengala	Rap test	SAL-2ME
Animais soropositivos por prova / Total de animais soropositivos	85/99	89/99	69/99
Animais soropositivos por prova (%)	85,8	89,9	69,9

Fonte: Almeida, 2001.

Teste presuntivo rápido automatizado

Para a realização do teste presuntivo rápido automatizado – *rap test*, utiliza-se do mesmo antígeno acidificado tamponado descrito para o teste rosa-de-bengala. Portanto, o *rap test* está passível de sofrer os mesmos inconvenientes que a prova rosa-de-bengala, descrita anteriormente.

Um problema comum nos ensaios sorológicos é a qualidade das amostras, porque muitas chegam ao laboratório hemolisadas e podem formar aglutinações inespecíficas (Vasconcelos et al., 1987). No caso do *rap test*, a interferência da hemólise nos resultados é mais evidenciada, pois ao adicionar o antígeno, a viscosidade e a coloração da reação intensificam-se, o que aumenta a porcentagem de reações falso-positivas. Isso ocorre porque o resultado é obtido por meio de leitura da diferença de absorbância (Almeida, 2001). Outro inconveniente para a implantação do *rap test* é o seu alto custo inicial, pois a sua aplicação requer a aquisição de equipamentos, como o homogeneizador², o espectrofotômetro³ para microplacas, as microplacas de 96 orifícios com fundo em “U” e o microcomputador. Por isso, esta prova dificilmente poderá ser realizada no campo.

As vantagens do *rap test* estão na automação (Fig. 3) e na possibilidade de analisar um grande número de amostras ao mesmo tempo e eliminar erros técnicos na interpretação dos resultados.

² Modelo Autolex Model 2342 Rotator, Bio Tek.

³ Modelo ELx 808 Microplate Reader, Bio Tek.

Para execução desse exame, desenha-se o mapa da microplaca de 96 orifícios no computador, para definir a localização das amostras-teste (Fig. 4). Colocam-se 30 μ L de cada amostra de soro nos orifícios das linhas A a H, colunas de 1 a 10, da microplaca. A coluna 11 permanece vazia e a coluna 12 será usada com os sorocontroles negativo e positivo (Fig. 5), conforme padronização prévia no programa. Em seguida, pipetam-se 30 μ L do sorocontrole negativo no centro dos orifícios 12A, 12B e 12C, fazendo da mesma forma com o controle positivo nos orifícios 12D, 12E e 12F (Fig. 4). Utilizando uma micropipeta multicanal, acrescentam-se 20 μ L do antígeno em cada orifício com as amostras e os controles. De imediato, introduz-se a microplaca no espectrofotômetro para a leitura inicial, sob filtro de 690 nm, a qual ficará armazenada na memória. Após, coloca-se a microplaca no homogeneizador por 10 minutos, permitindo que a aglutinação se concentre no centro do orifício. Passado o tempo, coloca-se a placa em superfície plana e, em 20 minutos, o programa vai requisitá-la para a leitura final.

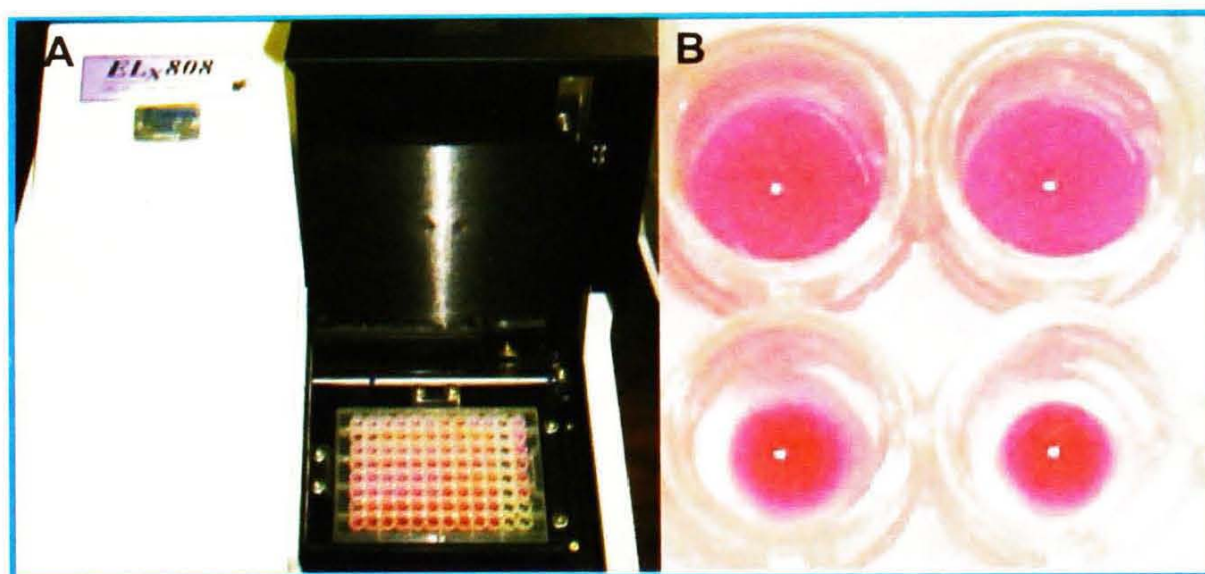
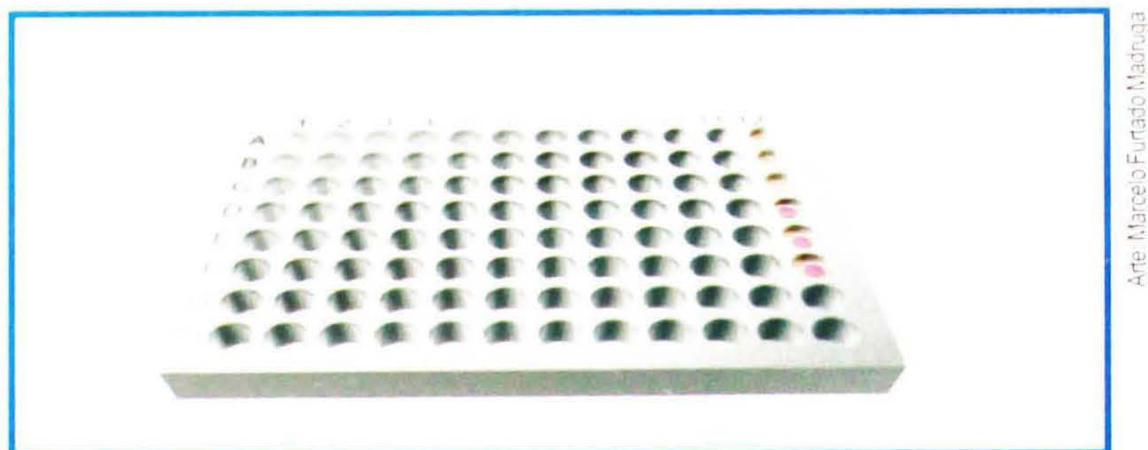


Foto: Robson F. C. Almeida

Fig. 3. A) espectrofotômetro para microplacas utilizado na leitura do ensaio *rap test*; B) detalhe para a microplaca com reações negativas (= orifícios superiores) e reações positivas (= orifícios inferiores).

A determinação dos soros positivos e negativos é obtida pela comparação da porcentagem do grau de aglutinação com os valores de referência armazenados no banco de dados do programa. A variação entre a primeira e a segunda leitura indicará a porcentagem de aglutinação: as amostras com 5% ou mais de aglutinação são consideradas positivas, e as amostras abaixo de 5% são negativas.



Arte: Marcelo Furtado Madruga

Fig. 4. Representação esquemática de uma microplaca de 96 orifícios utilizada no rap test, com o mapa da alocação dos sorocontroles (coluna 12): negativos (orifícios 12A, 12B e 12C) e positivos (orifícios 12D, 12E e 12F).



Arte: Marcelo Furtado Madruga

Fig. 5. Representação esquemática de um ensaio de imunoadsorção enzimática indireta para pesquisa de anticorpos contra *Brucella abortus*.

Em um estudo realizado na Embrapa Gado de Corte com soros de 989 vacas, comparando o teste rosa-de-bengala e o *rap test*, encontraram-se 8,6% (85/989) e 9% (89/989) de animais soropositivos, respectivamente (Almeida, 2001). A ausência de uma diferença significativa entre os dois testes deve ser levada em consideração na escolha de utilização dos mesmos. Deve-se optar por aquele que melhor se adapte às condições em que será implantado, analisando o número de exames a serem realizados e o custo, pois os testes apresentam performance similar.

Apesar de a prova com o antígeno acidificado tamponado apresentar alta sensibilidade, esta pode apresentar, em rebanhos onde a infecção ocorre em níveis reduzidos, prevalências maiores do que a real, por cau-

sa da baixa especificidade da prova. Nessa situação, os animais devem ser submetidos a um teste confirmatório (Radostits et al., 1994).

Ensaio de imunoadsorção enzimática

Os ensaios de imunoadsorção enzimática – ELISAs – podem ser utilizados como provas de rastreamento suplementar durante um programa de erradicação (Radostits et al., 1994; Poester et al., 1998). Duas modalidades de ELISAs são utilizadas no diagnóstico da brucelose bovina: o ELISA Indireto – IELISA – e o ELISA competitivo – cELISA.

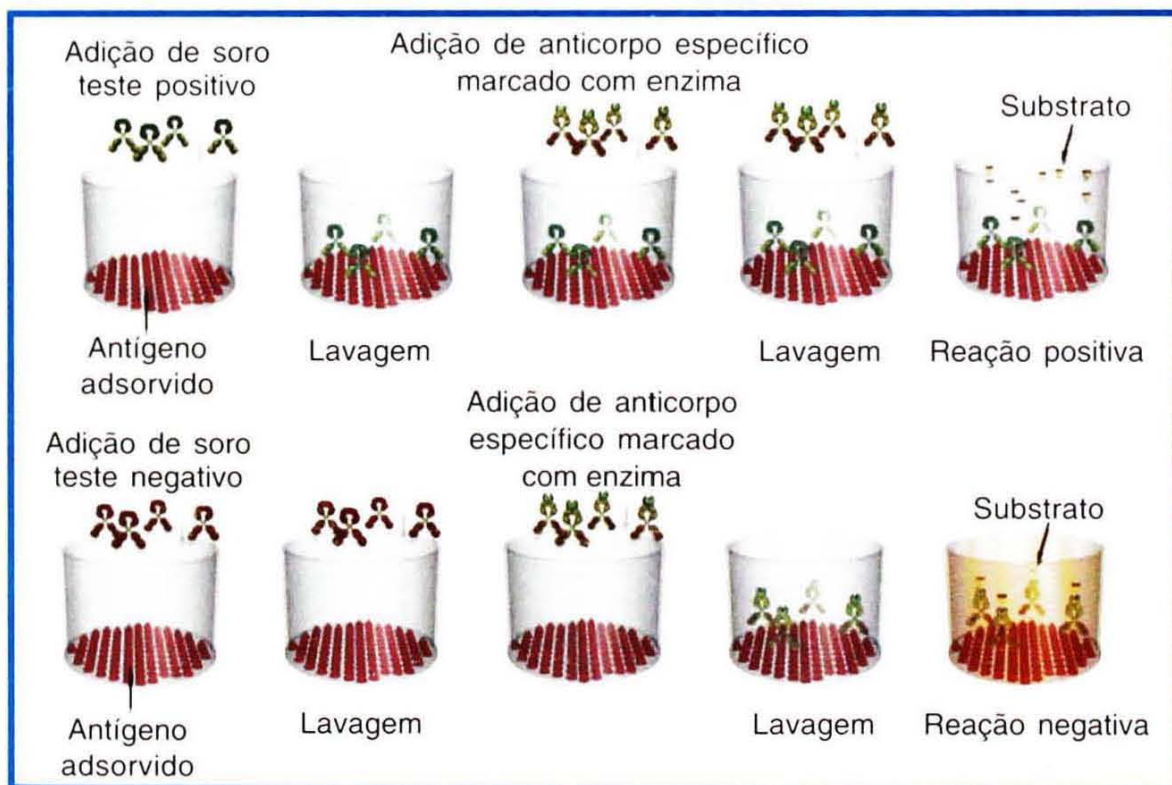
A) ELISA indireto

O ELISA Indireto – IELISA – é uma prova na qual o antígeno (lipopolissacarídeo – LPS) é Imobilizado (Fig. 5) passivamente sobre uma microplaca de poliestireno de 96 orifícios. Tal procedimento é chamado de adsorção (Nielsen & Kwok, 1995). Posteriormente, a microplaca é incubada por um período de 18 a 20 horas, em temperatura ambiente, e depois é lavada com uma solução isotônica, usualmente tampão salino fosfatado – PBS –, uma série de vezes para remoção dos materiais inespecíficos. A seguir, adicionam-se os soros a serem testados e os controles negativos e positivos, previamente diluídos, e incuba-se novamente por um determinado tempo a 37°C. Depois, lava-se a microplaca. Se o soro testado contém anticorpos contra *B. abortus*, forma-se um complexo, que será detectado pela adição de uma antiimunoglobulina conjugada a uma enzima. O conjugado mais utilizado é um anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgG bovina, marcado com a enzima peroxidase. Entretanto, pode também ser usado um anticorpo de coelho anti-IgG1 bovina, marcado com a mesma enzima. Adicionado o conjugado, procede-se nova incubação a 37°C e, em seguida, a fase de lavagem. Deve-se então agregar o cromógeno ácido 2,2 - azino dimetilbenzotiazolino sulfônico – ABTS –, o qual muda de cor quando o substrato – H_2O_2 – é catalisado (Fig. 5). A intensidade de cor é medida automaticamente por um espectrofotômetro, sob filtro de 414 nm, e os resultados são obtidos por meio da análise da densidade óptica (Saravi et al., 1995; Poester et al., 1998).

A intensidade de cor reflete a concentração de anticorpos específicos no soro, assim esse teste não tem a capacidade de diferenciar anticorpos vacinais daqueles provocados por uma infecção natural (Poester et al., 1998).

B) ELISA competitivo

Esta é uma prova baseada na competição entre duas populações de anticorpos por um número limitado de determinantes antigênicos. Nesse tipo de ensaio, o antígeno é imobilizado na placa e o soro a ser testado é colocado junto com um soro de especificidade conhecida. Após um período de incubação, se o soro for positivo, terá a preferência para combinar-se com o antígeno, dando como resultado um menor desenvolvimento de cor (Fig. 6). O grau de competição é diretamente proporcional à concentração de anticorpos no soro, que será mensurada mediante a adição de um soro caprino anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A ausência de cor indica a presença de anticorpos contra brucela no soro (Fig. 6) (Nielsen & Gall, 1998). Samartino et al. (1999a) analisaram 500 amostras de soro de um rebanho de animais negativos, por cELISA e iELISA e obtiveram especificidades de 99,8% e 96,6%, respectivamente. Também analisaram 1.000 amostras de animais vacinados com a cepa B19 e obtiveram especificidade de 97,5% para o cELISA e 95,8% para o iELISA. Ao avaliarem a sensibilidade, utilizaram 1.000 amostras de animais infectados e obtiveram 97,5% e 98,2% para o cELISA e iELISA, respectivamente.



Arte: Marcelo Furtado Madruga

Fig. 6. Representação esquemática de um ensaio de imunoadsorção enzimática competitivo para pesquisa de anticorpos contra *Brucella abortus*.

Os testes imunoenzimáticos, por sua elevada sensibilidade e especificidade, são provas que poderão ser ferramentas importantes para uma rápida redução da prevalência de *B. abortus* nos rebanhos com alto índice de infecção, ou para serem utilizados nas fases avançadas do programa de controle, quando as prevalências estiverem baixas. A preparação de anticorpos monoclonais tem incrementado a especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos.

É importante salientar que no Brasil as provas imunoenzimáticas não são oficialmente reconhecidas no diagnóstico da brucelose bovina, estando seu uso restrito apenas à pesquisa, embora sejam provas oficiais da OIE.

Ensaio homogêneo de fluorescência polarizada

O ensaio homogêneo de fluorescência polarizada – FPA – foi desenvolvido para a detecção de numerosas substâncias, incluindo drogas ilícitas e hormônios (Clark et al., 1992; Cody & Schwartzkopf, 1993), e várias macromoléculas (Urios & Cittanova, 1990). Nielsen et al. (1996) adaptaram o FPA para o mensuramento de anticorpos produzidos contra *B. abortus*.

O FPA descrito para diagnosticar a brucelose necessita de um leitor ou analisador de fluorescência polarizada conectado a um microcomputador (Fig. 7). A análise automática dos dados, a leitura e o cálculo dos resultados são obtidos em unidades de milipolarização – mP –, sendo adaptada para realização da prova em campo, incrementando o diagnóstico rápido e eficiente da brucelose bovina (Nielsen et al., 2001).

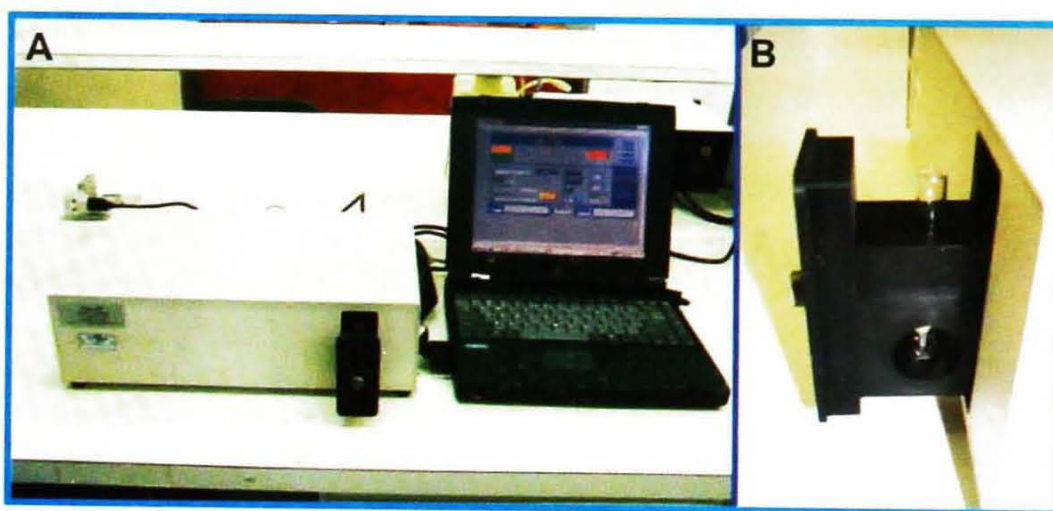


Foto: Robson F. C. Almeida

Fig. 7. A) leitor de fluorescência polarizada conectado ao computador; B) detalhe para tubo de amostra em seu local de inserção para leitura.

A premissa do FPA é que uma molécula em solução sofre rotação aleatória em uma taxa inversamente proporcional ao seu tamanho. A taxa de rotação pode ser medida nos planos vertical e horizontal usando um marcador fluorescente e luz polarizada. Quando moléculas fluorescentes são excitadas com luz polarizada em um plano, elas emitem luz no mesmo plano polarizado, contanto que a molécula permaneça estacionária durante a fase de excitação. Entretanto, se a molécula excitada sofrer rotação, a luz é emitida em um plano diferente daquela da excitação inicial. Se uma luz é emitida verticalmente para excitar um fluoróforo, a intensidade de luz emitida pode ser monitorada tanto no plano vertical original quanto no horizontal.

O grau com que a intensidade de emissão muda do plano vertical para o horizontal está relacionada com a mobilidade da molécula marcada com o fluoróforo. Se as moléculas marcadas com o fluoróforo são muito grandes, elas se movem pouco durante o intervalo de excitação, e a luz emitida permanece altamente polarizada quanto ao plano de excitação. Se as moléculas marcadas com fluoróforo são pequenas, elas sofrem rotação mais rapidamente, e a emissão de luz resultante é despolarizada com relação à fase de excitação. A taxa de rotação de um pequeno antígeno marcado sofre alteração se um anticorpo está ligado a ele e essa mudança na rotação pode ser medida (Fig. 8) (Araújo et al., 2001).

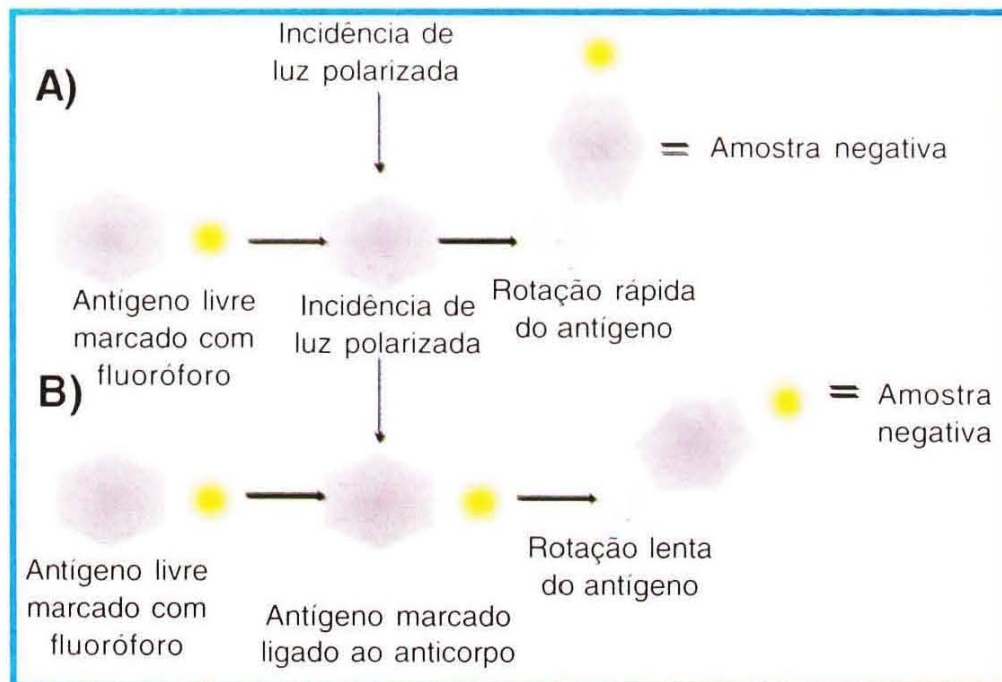


Fig. 8. Representação esquemática de um ensaio de fluorescência polarizada para pesquisa de anticorpos contra *Brucella abortus*: A) reação negativa; B) reação positiva.

Fonte: Araújo et al., 2001.

Para a execução do ensaio, utiliza-se o antígeno de brucela (polissacarídeo-O) marcado com Isotiocianato de fluoresceína. O peso molecular médio do polissacarídeo-O é de 22,5 kDa, portanto pequeno. O controle branco e os padrões de baixa e alta polarização são medidos previamente por meio de um leitor de fluorescência polarizada. Os padrões de baixa e alta polarização devem estar com índices entre 23 e 27 mP e acima de 360 mP, respectivamente. O antígeno é adicionado (10 µL) a um tubo onde se diluíram 20 µL do soro a ser testado em 1 mL de uma solução-tampão (0,01 M tris-HCl, pH 7,2, contendo 0,15 M de NaCl, 10 mM de EDTA e 0,05% de IGEPAL 630). Depois da adição do antígeno, qualquer anticorpo contra *B. abortus* reagirá com ele, aumentando o tamanho da molécula, fazendo com que o antígeno marcado gire mais lentamente. A diferença entre a medida da fluorescência nativa antes e depois de misturado ao soro indica a concentração de anticorpos da amostra (Samartino et al., 1999b, Nielsen et al., 2001).

Nielsen et al. (1996) avaliaram a sensibilidade e a especificidade do ensaio antes e depois de decifradas as amostras dos soros a serem testados e chegaram aos seguintes resultados: usando um *cut-off* de 107,2 mP, o ponto estimado de sensibilidade e especificidade, depois de testadas todas as amostras, foi de $98,2 \pm 1\%$ e $99,8 \pm 0,9\%$, respectivamente. Depois de diagnosticadas e retestadas as amostras positivas, o valor de sensibilidade aumentou para $98,5 \pm 1\%$.

Na análise de 560 amostras de soro bovino, provenientes do México, utilizando um *cut-off* de 89,9 mP, encontraram-se valores de sensibilidade e especificidade de 99% e 96,9%, respectivamente (Dajer et al., 1999).

A avaliação de 81 amostras de soros positivas para anticorpos contra *B. abortus* nos testes rosa-de-bengala e *rap test*, pelos testes da SAL-2ME e FPA, na Embrapa Gado de Corte, demonstrou os resultados apresentados na Tabela 2.

A elevada capacidade de detecção dos animais soropositivos nos testes de triagem, rosa-de-bengala e *rap test*, pelo FPA, deixa este em posição de destaque no diagnóstico da brucelose bovina. Por causa da praticidade, simplicidade e rapidez na execução, o FPA pode ser um importante aliado em programas de controle da doença. Ressalta-se que, no referido trabalho, os três animais negativos no FPA também foram negativos na SAL-2ME.

Tabela 2. Comparação entre os resultados do FPA e SAL-2ME, em 81 amostras positivas nos testes do rosa-de-bengala e *rap test*.

Avaliação	Testes	
	FPA	SAL-2ME
Animais soropositivos por prova / Total de animais soropositivos	78/81	69/81
Animais soropositivos por prova (%)	96,3	85,2

O FPA tem demonstrado ser um ensaio altamente preciso para detecção de anticorpos contra *B. abortus*, executado em apenas 5 minutos, podendo ser realizado em condições de campo (Samartino et al., 1999b).

Fixação de complemento

A prova de fixação de complemento – FC – é muito sensível e específica, raramente apresenta reações cruzadas e pode auxiliar na diferenciação entre títulos vacinais daqueles causados pela infecção. Os títulos de anticorpos na FC não diminuem à medida que a doença se torna crônica e, com frequência, após uma infecção natural, o teste demonstra níveis diagnósticos mais rapidamente que os testes de aglutinação em placas ou tubos. A crescente utilização da automação para o diagnóstico da enfermidade tem permitido maior rapidez e precisão para executar a FC. Esta é considerada a prova que melhor associação tem com os animais infectados por *B. abortus*, sendo o teste mais próximo de ser definitivo (Radostits et al., 1994).

A FC vem sofrendo algumas modificações e tem sido padronizada e adaptada ao sistema de microplacas. Entretanto, possui a desvantagem de não estar padronizada internacionalmente (Bishope et al., 1994).

O Mapa considera a FC como o único teste sorológico conclusivo para a brucelose bovina. Também é o mais indicado como teste confirmatório no caso de animais vacinados aos 18 meses de idade (Mathias et al., 2001).

Considerações finais

Os testes disponíveis permitem estabelecer uma estratégia de utilização das diferentes técnicas de diagnóstico sorológico com o objetivo de controle e erradicação da brucelose. Por tratar-se de um trabalho com rebanhos de bovinos, a avaliação Inicial deve ser realizada por um teste de baixo custo, de fácil execução, rápido para obtenção dos resultados, com sensibilidade elevada e uma boa especificidade. Assim, o teste com antígeno acidificado tamponado preenche estes requisitos. A automação deste teste, como é o caso do *rap test*, seria uma alternativa a ser utilizada em laboratórios com alta demanda de análise, por causa da rapidez de execução de um grande número de soros.

Existem vários testes confirmatórios, como descritos neste capítulo. A opção por um deles deve ser baseada naquele que apresentar a melhor especificidade. Entretanto, fatores econômicos e a disponibilidade do teste devem ser considerados, e por isso, possivelmente, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT – tenha optado pelo teste de aglutinação lenta com 2-ME. Outros testes, como a imunoadsorção enzimática indireta e competitiva e a fluorescência polarizada, apresentam elevada sensibilidade e maior rapidez na obtenção dos resultados. Particularmente, o último teste pode ser realizado no campo, sem a necessidade de estrutura de laboratório, e o resultado é obtido em apenas 2 minutos.

No Brasil, a PCR não tem ainda uma ampla aplicação, mas, como pode ser utilizada para o diagnóstico da brucelose e para caracterização de isolados, o que é de relevante importância epidemiológica, esta técnica poderia ser implantada nos laboratórios de referência. A principal justificativa para isso é a relativa rapidez com que são obtidos os resultados, quando comparados com o isolamento e caracterização da *Brucella* sp. por meio do cultivo *In vitro*.

A estratégia Inicial do PNCEBT está correta, entretanto, há necessidade de construir uma base de conhecimento e disponibilidade de métodos de diagnóstico que torne a campanha mais eficiente após a fase Inicial.

Referências

- ALMEIDA, R. F. C. ***Diagnóstico da brucelose e tuberculose bovina***. 2001. 30 p. Monografia como pré-requisito para conclusão do curso de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2001.
- ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R. Protocolos de técnicas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. ***Imunodiagnóstico em medicina veterinária***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p. 177-341.
- BISHOPE, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. ***Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa***. Cape Town: Oxford University Press, 1994. v. 1, p. 1054-1066.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Departamento de Defesa Animal. ***Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose***. Brasil, 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 05 abr. 2002.
- CARRILHO, C. G. Diagnóstico de la brucelosis. ***Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo***. São Paulo, v. 8, p. 189-191, 1984.
- CLARK, G.; ROSENZWERG, I.; RAISYS, V.; CALAHAN, C.; GRANT, T.; STREISSGUTH, A. The analysis of cocaine and benzoylecgonine in meconium. ***Journal of Analytical Toxicology***, Illinois, v. 16, p. 261, 1992.
- CODY, J.; SCHWARTZKOPF, R. Fluorescent polarization Immunoassay detection of amphetamine, methamphetamine and illicit amphetamine analogues. ***Journal of Analytical Toxicology***, Illinois, v. 17, p. 26, 1993.
- DAJER, A.; LUNA-MARTYNEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGASA, S.; GUTIERREZ, E.; PEN, G.; GURRÍ, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. ***Preventive Veterinary Medicine***, Amsterdam, n. 40, p. 67-73, 1999.
- FERRAZ, I. B. F. Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina. ***Revista Brasileira de Reprodução Animal***, Belo Horizonte, v. 22, p. 504-508, 1999.

GARIN-BASTUJI, B.; HUMMELA, N.; GERBIERB, G.; CAUA, C.; POUILLLOTB, R.; COSTA, M.; FONTAINE, J. Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* O:9. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 66, p. 223-233, 1999.

KITTELBERG, R; BUNDESEN, P. G.; CLOECKAERT, A.; GREISER-WILKE, I.; LETESSON, J. J. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9: IV. Evaluation of the M and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 60, p. 45-57, 1998.

MATHIAS, L. A.; CHAVES, L. F.; CHEN, A. A.; GIRIO, R. J. S.; NETO, W. V. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *B. abortus* amostra B 19. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 139-142, 2001.

NIELSEN, K.; KWOK, A. Reuse of 96 well plates for indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus*. **Archivos de Medicina Veterinária**, Santiago, n. 27, p. 39-43, 1995.

NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for the detection of antibody to *Brucella abortus*. **Journal of Immunology Methods**, Amsterdam, v. 195, p. 161, 1996.

NIELSEN, K.; GALL, D. Summary of fields trials using the indirect and competitive enzyme Immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus*. **International Atomic Energy Agency**, Vienna, IAEA-TECDOC-1055, p. 107-111, 1998.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MOHER, P.; CONOR, J. O.; WALSH, B; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PERES, B.; WEILFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L. E.; DAYER, A.; LUNA-MARTINEZ, L. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 80, p. 163-170, 2001.

POESTER, F. P. Brucelose animal. In: SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 2., 1997, Caxambú. **Anais...** Caxambú: PFIZER, 1997. p. 54-59.

POESTER, F. P.; RAMOS, E. T.; THIESEN, S. V. Application of enzyme linked-immunosorbent assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Rio Grande do Sul - Brasil. **International Atomic Energy Agency**, Vienna, IAEA-TECDOC-1055, p. 63-68, 1998.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine**. 8. ed. London: Balier Tindall, 1994. 1736 p.

SAMARTINO, L.; GREGORET, R.; GALL, D.; NIELSEN, K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 70, p. 193-200, 1999a.

SAMARTINO, L.; GALL, D.; GREGORET, R.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **Journal of Immunoassay**, New York, v. 20, p. 115-126, 1999b.

SAMARTINO, L. E.; BUFFONI, L.; CONDE, S.; GREGORET, R. Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v. 82, p. 90-94, 2000.

SARAVI, M. A.; WRIGHT, P. F.; GREGORET, R. J.; GALL, D. E. J. Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assay in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 27, p. 93-97, 1995.

URIOS, P.; CITTANOVA, N. Adaptation of fluorescence polarization immunoassay to the assay for macromolecules. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 185, p. 308, 1990.

VASCONCELOS, S. A.; ITO, F. H.; CORTES, J. A. Bases para prevenção da brucelose bovina. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 11, p. 25-36, 1987.

Epidemiologia e controle

Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge
Robson Ferreira Cavalcante de Almeida
Cleber Oliveira Soares
Flávio Ribeiro de Araújo
Cláudio Roberto Madruga
Ana Luiza Alves Rosa Osório

Resumo

A tuberculose bovina é uma enfermidade disseminada em várias partes do mundo, causada por *Mycobacterium bovis*, um bacilo álcool-ácido resistente, de crescimento lento. Os principais hospedeiros de *M. bovis* são os bovinos, os suínos, os cervídeos e o homem. Em bovinos, a transmissão ocorre principalmente pela via respiratória e em rebanhos com alta densidade populacional. A transmissão de bovinos para o homem ocorre pela ingestão de leite cru de vacas infectadas. Após a infecção pela via respiratória, os pulmões e os linfonodos drenantes são os primeiros órgãos a serem afetados. Quando a infecção se dá por via digestória, as lesões iniciais são encontradas no sítio de entrada dos bacilos, principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. Entretanto, a tuberculose pode afetar qualquer órgão. No foco inicial da infecção, uma infiltração de macrófagos com morfologia diferenciada, denominados células epitelióides, circundados por linfócitos, monócitos e outras células sanguíneas, é visível. As células epitelióides, em geral, fundem suas membranas, formando células gigantes multinucleadas. Com a evolução da lesão, uma área de necrose caseosa central e fibrose periférica é formada. Esse tubérculo pode frequentemente estar calcificado. No Brasil, o controle da tuberculose bovina é feito por uma série de medidas, que incluem a certificação de rebanhos livres, treinamento de médicos-veterinários para diagnóstico em campo, certificação de laboratórios de diagnóstico e campanhas públicas de educação sanitária.

Palavras-chaves: tuberculose, bovino, *Mycobacterium bovis*, epidemiologia, controle.

Abstract

Bovine tuberculosis is a widespread disease caused by *Mycobacterium bovis*, an alcohol-acid resistant, slow growing bacillus. The main hosts of *M. bovis* are bovine, swine, deers and humans. In cattle, the transmission occurs mainly via the respiratory track, especially in high population density herds. Transmission from cattle to man occurs mainly by ingestion of raw milk from infected cows. Following the infection by the respiratory track, the lungs and the draining lymph nodes are the first organs affected. When the infection occurs via the digestive tract, the first lesions are found at the entrance site of the bacilli, mainly in the pharyngeal and mesenteric lymph nodes. In generalized tuberculosis, the lesions can be found in any organ. At the initial focus of the infection, an infiltration of morphological distinct macrophages, called epithelioid cells, surrounded by lymphocytes, monocytes and other blood cells, is frequently visible. The epithelioid cells often fuse their membranes to form a giant multinucleated cell. With the evolution of the lesion, a central caseous necrotic area and peripheral fibrosis is formed. This tubercle can often be calcified. In Brazil, the control of bovine tuberculosis involves a series of measures, including certification of free herds, training of veterinary surgeons for field diagnosis, certification of laboratories for diagnosis and public health education campaigns.

Key words: tuberculosis, cattle, *Mycobacterium bovis*, epidemiology, control.

Introdução

A tuberculose é uma enfermidade infecciosa e crônica de bovinos, que acomete outras espécies de animais de exploração zootécnica, animais silvestres livres ou em cativeiro, e também o homem. É caracterizada por uma evolução inicial, em geral subclínica, evidenciando sintomas apenas quando os órgãos atingidos apresentarem comprometimentos (Gutiérrez et al., 1998).

As micobactérias causadoras da tuberculose em mamíferos fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, um grupo de quatro espécies inter-relacionadas, constituído por *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium microti* (Wards et al., 1995). *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose humana, enquanto que os bovinos desenvolvem a tuberculose quando infectados por *M. bovis*. Os bovinos não adoecem quando infectados pelas outras micobactérias patogênicas para mamíferos (Moda et al., 1996).

A tuberculose bovina, como a humana, reassumiu grande importância em todo o mundo, com destaque os países em desenvolvimento, alcançando índices acima de 1% (Roxo, 1997). A Organização Mundial da Saúde declarou a tuberculose como “emergência global”, tendo em vista as mais de 30 milhões de mortes em humanos causadas por essa enfermidade na última década. Dez milhões dessas mortes tinham a associação de tuberculose com a síndrome da imunodeficiência adquirida – AIDS – (Associação Brasileira de Buiatria, 2002a). O surgimento da AIDS colaborou para o aumento no número de novos casos de tuberculose e no risco de manifestações da doença em humanos, tanto por *M. tuberculosis* como por *M. bovis* (O’Reilley & Daborn, 1995; Roxo, 1997).

O número de casos de tuberculose em humanos no Brasil, em 1996, atingiu 80.000. Estima-se em 5% a porcentagem de casos de tuberculose em humanos de origem bovina para países em desenvolvimento. Desta forma, 4.000 casos de tuberculose em humanos eram de origem bovina (Associação Brasileira de Buiatria, 2002a).

Segundo dados de 1991 da Organização Pan-Americana de Saúde, 7.000 novos casos anuais de tuberculose humana na América Latina foram causados por *M. bovis* (Scorpio et al., 1997). Estimou-se para o ano 2000 a morte, por tuberculose, de cerca de três milhões e quinhentas mil pessoas em todo o mundo, um aumento de 39% em relação a 1990 (Scorpio et al., 1997). Na ocasião, *M. tuberculosis* era apontado como o principal responsável pelos novos casos de tuberculose e mortes, porém uma desconhecida e importante proporção seria causada por *M. bovis* (Cosivi et al., 1998).

No entanto, é muito difícil precisar o número de casos de tuberculose de origem bovina em humanos, pois há grande desinformação da classe médica a respeito do potencial zoonótico da tuberculose bovina. Um outro agravante é que o diagnóstico de rotina em humanos não permite diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*; mesmo quando realizado o cultivo, tendo em vista que não é usual o emprego dos meios de cultura adequados para *M. bovis* (Associação Brasileira de Buiatria, 2001, 2002a).

Mesmo sendo a prevalência da tuberculose causada por *M. bovis* na população humana pouco conhecida, e raramente quantificada, é sabido que a participação desse agente é relevante para o surgimento de novos casos. Esse crescimento tem maior importância em regiões onde a ocorrência de tuberculose bovina é alta e o consumo de leite e derivados é realizado na forma *in natura* (Jorge, 2001).

Em relação ao agronegócio, o controle e a erradicação da tuberculose bovina são justificados pelo impacto negativo da doença na produtividade pecuária e pela necessidade de se manter o comércio de carne e produtos de origem animal com outros países. Para tanto, entrou em vigor no Brasil, a partir de 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT –, cuja proposta é diminuir a prevalência e a incidência dessa enfermidade, atingindo um número significativo de propriedades certificadas como livres da doença.

Características biológicas e morfológicas de *Mycobacterium* sp.

As micobactérias são classificadas taxonomicamente como membros da ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium*, com 71 espécies descritas. Apresentam-se como bacilos pequenos e sem mobilidade, aeróbios, não esporulados, não capsulados e não flagelados. São bacilos álcool-ácidos resistentes – BAAR –, isto é, quando corados pela fuccina a quente, resistem à descoloração com álcool-ácido (coloração de Ziehl-Neelsen), sendo esta sua característica mais comum. Na baciloscopia, *M. bovis* aparece como cocobacilo de coloração vermelho intensa, medindo de 0,3 a 0,6 μm de largura por 1 a 4 μm de comprimento (Corner, 1994).

As micobactérias apresentam uma parede celular complexa, constituída por 60% de lipídeos, como ácidos micólicos e micosídeos, e por polipeptídios. A parede celular é formada pela membrana citoplasmática em sua face interna, uma camada intermediária de peptidoglicanos e uma camada externa de ácidos micólicos específicos ligados ao açúcar arabinogalactano, formando o complexo micolilarabinogalactano. Esse complexo impermeabiliza a superfície da micobactéria, tornando-a bastante resistente a compostos hidrofílicos e à dessecação, além de dificultar a captação de nutrientes, retardando o seu crescimento (Corner, 1994).

Mycobacterium sp. cresce em meios especiais compostos de ovos e amido enriquecidos com asparagina e contendo malaquita para inibir contaminantes. O glicerol dificulta o crescimento de *M. bovis*, mas favorece o crescimento de todos os outros microrganismos do gênero. Em meios

de cultura à base de ovos, é típico o crescimento de colônias pequenas, arredondadas, de coloração amarelo-pálida, com borda irregular e superfície granular. Em meios à base de ágar, as colônias são brancas, finas, ásperas e planas; exceto no centro, onde são mais volumosas (Corner, 1994).

As micobactérias patogênicas apresentam crescimento lento, a partir de cerca de 28 dias, e o cultivo deve ser observado por 90 dias, só devendo ser desprezado como negativo após a realização da baciloscopia. Cerca de 10% das amostras de *M. bovis* apresentam colônias visíveis após 60 dias de cultivo (Corrêa & Corrêa, 1992).

As micobactérias são pouco resistentes ao calor, morrem sob pasteurização, pelo aquecimento até a fervura e, em poucos minutos, pela ação da luz solar direta em ambiente seco. Agentes desinfetantes, fenólicos, formólicos, álcoois e hipoclorito de sódio, são bastante eficientes no combate ao bacilo. No entanto, sua ação pode ser afetada pela concentração do produto, tempo de exposição, temperatura e presença de matéria orgânica. Em condições de umidade, temperatura e ao abrigo da luz solar, nos estábulos, aviários, pastos e em matéria orgânica em estado de putrefação, essas bactérias podem sobreviver por períodos de seis meses até quatro anos (Corrêa & Corrêa, 1992; Roxo, 1997).

Epidemiologia

Hospedeiros

A tuberculose tem sido relatada em uma extensa lista de espécies de mamíferos domésticos e silvestres, incluindo-se os primatas e uma ampla variedade de espécies exóticas de vida livre ou de cativeiro (Lepper & Corner, 1983; Thoen et al., 1984; Pritchard, 1988). Muitos autores afirmam que a enfermidade é rara em animais selvagens, exceto naqueles que estejam ou tenham estado em contato com bovinos ou com o homem infectados por *M. bovis* (Neill et al., 1994). Entretanto, um estudo realizado na Irlanda mostrou que espécies silvestres são hospedeiras que atuam na manutenção da infecção. Dessa forma, contribuem para a persistência e difusão da enfermidade, e interferem na eficácia de programas de erradicação da tuberculose em rebanhos bovinos (Gormley & Collins, 2000). Exemplo disso ocorre na Nova Zelândia, onde a presença de reservatórios

silvestres de *M. bovis* tem retardado a erradicação da tuberculose bovina. Em algumas áreas, geograficamente definidas, nas quais os rebanhos bovinos tornaram-se reinfected após a aplicação do sistema de “teste e abate” dos animais positivos, houve evidências epidemiológicas de que *Trichosurus vulpecula*, uma espécie de marsupial silvestre, foi o principal vetor da tuberculose para os bovinos (Tweddle & Livingstone, 1994).

Nos Estados Unidos, os cervídeos infectados por *M. bovis* também representam fonte de infecção para animais domésticos (Griffin & Buchan, 1994). Na Europa, o texugo, um mamífero silvestre, transmite *M. bovis* para bovinos, conforme foi comprovado por experimentos (Nolan & Wilesmith, 1994).

Entre as espécies de animais domésticos, os bovinos e os suínos são os principais hospedeiros de *M. bovis* (Morris et al., 1994). No Brasil e na Argentina, onde a tuberculose bovina é um problema importante, a infecção de porcos domésticos por *M. bovis* é comum e representa um reservatório adicional da doença (Morris et al., 1994; Gutiérrez et al., 1998).

Transmissão

A tuberculose bovina é uma zoonose, em contraste com a tuberculose humana, cujo agente *M. tuberculosis* é patogênico para o homem, mas não o é para os bovinos (Moda et al., 1996).

Mesmo antes de desenvolver lesões teciduais, o bovino infectado já é capaz de disseminar *M. bovis*, por descarga nasal, leite, fezes, urina, pelas secreções nasal, vaginal, uterina e sêmen, constituindo, ele próprio, a principal fonte de infecção.

As vias pelas quais os bovinos são infectados por *M. bovis* são influenciadas por diversos fatores, tais como idade, meio ambiente e práticas de manejo adotadas. A via orofaríngea é o principal meio de contaminação para bezerros jovens que se alimentam de leite materno contaminado por *M. bovis*, proveniente de vacas tuberculosas (Neill et al., 1994).

A transmissão da tuberculose bovina pela via respiratória é facilitada pela convivência natural, em especial em rebanhos com alta densidade animal e substancial movimento deles dentro da propriedade, entre propriedades e por meio de eventos agropecuários (feiras, leilões e outros).

A distribuição das lesões tuberculosas, encontradas em bovinos que foram naturalmente infectados, mostra que 80% a 90% desses animais são infectados pela via respiratória (Morris et al., 1994). Isso porque um único bacilo transportado no interior de uma gotícula é suficiente para estabelecer a infecção no pulmão do bovino (Menzies & Neill, 2000).

A ocorrência de tuberculose humana causada por *M. bovis* normalmente é resultado da freqüente ingestão de leite contaminado. No entanto, ela também pode ser decorrente do manuseio do leite ou de carcaças provenientes de bovinos tuberculosos, assumindo, nesses casos, um caráter profissional. Na Argentina, em estudo realizado no período de 1982 a 1984, a tuberculose humana em adultos causada por *M. bovis* representou 0,36% dos casos diagnosticados por meio do cultivo, e era restrita à população de alto risco, tais como trabalhadores rurais ou magarefes (Barrera & Kantor, 1986). No período de 1984 a 1989, *M. bovis* foi responsável por 2,4% a 6,2% dos casos de tuberculose humana, e 64% desses pacientes eram trabalhadores rurais ou magarefes (Latini et al., 1990).

Embora a transmissão da tuberculose bovina tenha predominância pelas vias digestória e respiratória, outras vias menos usuais têm sido relatadas. A infecção cutânea requer contaminação de uma lesão primária pelo bacilo da tuberculose. Nos casos de infecção congênita, a transmissão se dá a partir do útero contaminado da mãe, por meio dos vasos umbilicais. Em raras ocasiões, quando o sêmen e os órgãos sexuais do macho ou da fêmea estão infectados, pode ocorrer transmissão genital. O uso de soluções contaminadas na glândula mamária resulta em transmissão iatrogênica (Neill et al., 1994). Uma grande quantidade de bacilos é eliminada para o meio ambiente pelas fezes e pela urina, porém, pastos e alimentos contaminados são de menor importância na transmissão da doença (Morris et al., 1994).

No Texas, onde ocorre a maior incidência de tuberculose bovina nos Estados Unidos, realizou-se um estudo com doze rebanhos bovinos tuberculosos e dois não afetados pela doença. Nenhuma das 670 amostras coletadas dos mamíferos, aves e do meio ambiente (solo, água e ar), relacionados com esses rebanhos, apresentou cultivo positivo quanto à presença de *M. bovis* (Pillai et al., 2000). O mesmo ocorreu com 119 amostras de urina provenientes dos trabalhadores envolvidos com os rebanhos bovinos já mencionados. Esses resultados indicaram que os reservatórios não-

bovinos não foram um fator de risco na transmissão da tuberculose bovina no Texas. Os próprios bovinos ainda parecem ser os únicos reservatórios conhecidos de *M. bovis* naquela região (Pillai et al., 2000).

Distribuição

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

A América do Sul detém a maior população bovina e também a maior incidência de tuberculose nesses animais, embora variável entre os diversos países.

Na América Latina e no Caribe, a população bovina é constituída de 300 milhões de cabeças, das quais apenas 80 milhões encontram-se em países com taxas muito baixas ou inexistentes de tuberculose (Kantor & Ritacco, 1994). A prevalência estimada de bovinos infectados é de 0,005% no Uruguai e 0,37% na Venezuela. Na Colômbia, a infecção ainda ocorre em áreas geograficamente circunscritas, enquanto que no Suriname não tem sido detectada desde 1985 (Kantor & Ritacco, 1994). Os 220 milhões de bovinos restantes encontram-se em grande parte em países com prevalência moderada ou alta de tuberculose, como no Brasil, Argentina, Chile, Paraguai e Peru, ou em países nos quais não existe informação recente sobre a doença (Kantor & Ritacco, 1994).

No Brasil, que possui um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, com mais de 165 milhões de cabeças, dados oficiais revelam que cerca de 1,3% do rebanho bovino nacional esteja infectado por *M. bovis*.

Estima-se em 60% a população humana da América Latina e do Caribe que vive em países nos quais a tuberculose bovina tem apenas controle parcial ou não sofre controle algum (Cosivi et al., 1998), o que contribui para o avanço dessa zoonose.

Nos países industrializados, a tuberculose encontra-se em fase avançada de controle ou erradicação, como se observa nos Estados Unidos e no Canadá, onde a incidência da doença é muito baixa, contando inclusive com áreas livres de tuberculose bovina (Essey & Koller, 1994).

Os países membros da Comunidade Européia, segundo levantamento realizado em 1991, apresentavam prevalências variadas de tuberculose bovina. A Dinamarca, Luxemburgo e os Países Baixos eram considerados áreas livres; Alemanha, Bélgica, Portugal e Grã-Bretanha tinham taxas muito baixas, 0,0024%, 0,01%, 0,12% e 0,15%, respectivamente; Grécia e França, com casos esporádicos da doença; Irlanda com 8,8% de casos de tuberculose bovina e Itália com 3,71% ainda não haviam alcançado a erradicação. Na Espanha, onde o programa nacional de erradicação havia recém-iniciado, a infecção atingia 10% do rebanho bovino (Caffrey, 1994).

Patogenia

A tuberculose bovina, apesar de ser definida como uma doença crônica e debilitante, também pode assumir um caráter agudo. Os sintomas da doença nos animais podem não estar presentes em infecções recentes; porém, com a evolução da infecção, podem aparecer sinais característicos como emaciação progressiva, aumento de volume dos linfonodos e, em alguns casos, tosse, dispnéia e episódios de diarreia intercalados com constipação (Haagsma, 1995; Roxo, 1997).

O foco de infecção da tuberculose é estabelecido após a interação do hospedeiro com o patógeno. Quando a infecção se dá pela via respiratória, o pulmão é o primeiro órgão atingido, assim como os linfonodos regionais. Sendo o trato digestório a via de infecção, a lesão se desenvolve, no início, no sítio de entrada, principalmente nos linfonodos faríngeos e mesentéricos. Quando da generalização do processo, a lesão pode atingir todos os órgãos (Roxo, 1997).

No foco inicial da lesão, ocorre uma infiltração celular formada de macrófagos, os quais assumem com frequência uma aparência distinta e são denominados "células epitelióides". Células gigantes também são formadas por causa da junção de macrófagos que, ao se fundirem, têm as suas membranas celulares abertas que se unem formando uma grande célula multinucleada. Um conjunto de células gigantes e células epitelióides forma, então, o centro do tubérculo jovem, que é circundado por uma zona de linfócitos, monócitos e outras células sangüíneas. Com a progressão da lesão, o tubérculo desenvolve necrose de caseificação central, resultante da reação de hipersensibilidade do tipo tardia, e fibrose periférica com circunscrição da lesão, que pode evoluir para resolução e calcificação.

Na lesão pulmonar primária, os bacilos alojam-se no tecido, promovendo uma reação inflamatória caracterizada como um foco de broncopneumonia, o qual pode progredir muito rápido ou permanecer latente durante vários anos. A doença instala-se basicamente nos pulmões, formando nódulos caseosos de diversos tamanhos, em muitos casos, confluentes, tomando todo o parênquima pulmonar e causando lesões cavitárias, com expectoração de material bacilífero. Quando a resistência orgânica é baixa, pode ocorrer uma reinfecção exógena ou endógena. Nesse caso, há recrudescência da lesão necrosada, podendo atingir os tecidos vizinhos e se disseminar por todo o organismo. A disseminação do agente a partir do parênquima pulmonar se dá pela via aérea ou hematógena, atingindo o linfonodo regional e formando metástases em outros órgãos (Roxo, 1997). A presença de um nódulo pulmonar calcificado, junto com a lesão no linfonodo regional, denomina-se “complexo primário” (Morris et al., 1994; Neill et al., 1994; Roxo, 1997).

As lesões primárias podem ser simples ou múltiplas, unilaterais ou bilaterais. Verificou-se que 90% das lesões pulmonares são encontradas no terço distal do lobo caudal do pulmão (McIlroy et al., 1986). As lesões de aspecto caseoso, características da doença, são encontradas com mais frequência nos linfonodos da cabeça, do pescoço, mediastínicos e mesentéricos, nos pulmões, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio, embora qualquer tecido possa ser afetado.

Importância e controle

A tuberculose bovina tem assumido importância cada vez maior no Brasil e em outras partes do mundo. Na cadeia da pecuária bovina, a tuberculose é responsável por perdas significativas principalmente na produção leiteira, além da queda da eficiência reprodutiva de machos e fêmeas, e baixo aproveitamento da carcaça, o que causa prejuízos irreversíveis ao produtor.

O processo de desenvolvimento e intensificação dos sistemas de produção pecuária tem contribuído para o aumento do aparecimento de novos casos da tuberculose bovina, principalmente em rebanhos leiteiros. Isso deve-se ao confinamento e ao maior contato entre os animais, aumentando a predisposição à infecção. Rebanhos de corte não estão livres, podendo ocorrer casos em que o trânsito e o comércio de bovinos são

praticados de forma intensiva, propiciando maior contato entre os animais, ou onde exista proximidade de rebanhos de corte e rebanhos de leite com bovinos portadores da doença.

A crescente exigência em relação ao manejo sanitário dos animais, feita pelos países desenvolvidos, torna provável o fechamento do mercado para exportações de países da América Latina (Kantor & Ritacco, 1994).

Campanhas de erradicação da tuberculose bovina em países desenvolvidos, como ocorre na Inglaterra, têm levado a uma grande redução na incidência de tuberculose humana causada por *M. bovis* (Grange & Yates, 1994).

Na América do Norte, a erradicação da tuberculose bovina encontra-se em estágio avançado. O programa federal de controle da tuberculose bovina foi implantado em 1917 nos Estados Unidos e, em 1994, a prevalência da infecção foi estimada em 0,003% do rebanho bovino nacional. Nessa ocasião, não havia registro de tuberculose humana causada por *M. bovis* em indivíduos residentes, exceto aqueles recém-emigrados para os Estados Unidos provenientes de países com alta prevalência de tuberculose (Essey & Koller, 1994).

O programa canadense de erradicação da tuberculose bovina foi estabelecido em 1923. Em 1994, oito das dez províncias que constituem o Canadá já eram consideradas áreas livres de tuberculose bovina, e a erradicação total da enfermidade nos bovinos estava prevista para os próximos anos (Essey & Koller, 1994).

Considerações finais

A erradicação da tuberculose bovina é um processo longo e dispendioso, por causa das limitações dos métodos de diagnóstico, custo e prolongado tratamento à base de isoniazida, principal droga utilizada. Além desses aspectos técnicos, as ações fraudulentas também contribuem negativamente para um controle mais efetivo ou erradicação (Associação Brasileira de Buiatria, 2002b).

A detecção dos animais positivos e posterior abate destes (sistema "teste e abate") tem se mostrado eficiente na erradicação da tuberculose bovina. Todos os países que tiveram avanços consideráveis na erradicação

utilizaram esse método. Entretanto, existe uma resistência dos proprietários em aderirem ao sistema “teste e abate”, sobretudo em situações de alta prevalência, e pela falta de uma política de ressarcimento financeiro aos produtores. Todavia, com a erradicação da tuberculose bovina, os ganhos com agregação de valor ao produto nacional e ao aumento nas exportações dos produtos de origem animal tornam essa política, em longo prazo, viável economicamente.

Objetivando a erradicação da enfermidade, o PNCEBT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa –, instituído pela Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001, estabeleceu a realização do diagnóstico dessa zoonose e regulamentou as medidas de controle (Brasil, 2001). As propostas técnicas do PNCEBT abordam os seguintes tópicos para tuberculose: certificação de propriedades livres; controle de trânsito de animais e normas sanitárias para participação em exposições, feiras, leilões e outras aglomerações de animais; credenciamento e capacitação de médicos-veterinários; diagnóstico e apoio laboratorial; participação do serviço social; e educação sanitária.

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BUIATRIA. TbBovNet. *Dados oficiais sobre a tuberculose bovina no Brasil*. 2001. Disponível em: <http://www.technovet.com.br/buiatria/tbbovnet>. Acesso em: 20 de fev. 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BUIATRIA. TbBovNet. *A tuberculose bovina como zoonose*. 2002a. Disponível em: <http://www.technovet.com.br/buiatria/tbbovnet/tbzoon.htm>. Acesso em: 19 de fev. 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BUIATRIA. TbBovNet. *Tratamento da tuberculose bovina*. 2002b. Disponível em: <http://www.technovet.com.br/buiatria/tbbovnet/tratament.htm>. Acesso em: 19 de fev. 2002.

BARRERA, L.; KANTOR, I. N. Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Tropical and Geographical Medicine*, Oxford, p. 222-227, 1986.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Departamento de Defesa Animal. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da*

Tuberculose. Brasil, 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 05 abr. 2002.

CAFFREY, J. P. Status of tuberculosis eradication programmes in Europe. ***Veterinary Microbiology***, Amsterdam, n. 40, p. 1-4, 1994.

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

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. ***Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos***, Varela, São Paulo. 1992. 843 p.

COSIVI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMEYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. ***Emerging Infectious Diseases***, Atlanta, n. 4, p. 59-70, 1998.

ESSEY, M. A.; KOLLER, M. A. Status of bovine tuberculosis in North America. ***Veterinary Microbiology***, Amsterdam, n. 40, p. 15-22, 1994.

GORMLEY, E.; COLLINS, J. D. The development of wildlife control strategies for eradication of tuberculosis in cattle in Ireland. ***Tubercle and Lung Disease***, Edinburg, n. 80, p. 229-236, 2000.

GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. ***Veterinary Microbiology***, Amsterdam, n. 40, p. 137-151, 1994.

GRIFFIN, J. F. T.; BUCHAN, G. S. A. Etiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. ***Veterinary Microbiology***, Amsterdam, n. 40, p. 193-205, 1994.

GUTIÉRREZ, M.; TELLECHEA, J.; MARÍN, J. F. G. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis* – infected goats. ***Veterinary Microbiology***, Amsterdam, n. 62, p. 281-290, 1998.

HAAGSMA, J. *Bovine tuberculosis*. Paris: OIE, 1995, 11 p. (OIE Manual).

JORGE, K. S. G. ***Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil***. 2001. 73 f. Dissertação (Mestrado) - FIOCRUZ / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2001.

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

LATINI, M. D. S.; LATINI, O. A.; LOPEZ, M. L.; CECCONI, J. O. Tuberculosis bovina en seres humanos. *Revista Argentina Torax*, Buenos Aires, n. 51, p. 13-16, 1990.

LEPPER, A. W. D.; CORNER, L. A. Naturally occurring mycobacteriosis of animals. In: RATLEDGE, C.; STANFORD, J. *The biology of the Mycobacteria II*. London: Academic Press, 1983. p. 418-521.

McILROY, S. G.; NEILL, S. D.; MCCracken, R. M. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Veterinary Record*, London, v. 118, p. 718-721, 1986.

MENZIES, F. D.; NEILL, S. D. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, n. 160, p. 92-106, 2000.

MODA, G.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M.; COSIVI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Disease*, Edinburg, n. 77, p. 103-108, 1996.

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

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

NOLAN, A.; WILESMITH, J. W. Tuberculosis in badgers (*Meles meles*). *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, n. 40, p. 179-191, 1994.

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

PILLAI, S. D.; WIDMER, K. W.; IVEY, L. J.; COKER, C. K.; NEWMAN, E.; LINGSWEILER, S.; BACA, D.; KELLEY, M.; DAVIS, D. S.; SILVY, N. J.; ADAMS, L. G. Failure to identify non-bovine reservoirs of *Mycobacterium bovis* in a region with a history of infected dairy-cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, n. 43, p. 53-62, 2000.

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

ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, n. 18, p. 101-108, 1997.

SCORPIO, A.; COLLINS, D.; WHIPPLE, D.; CAVE, D.; BATES, J.; ZHANG, Y. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation

in the bovine pyrazinamidase gene. *Journal of Clinical Microbiology*, New York, n. 35, p. 106-110, 1997.

THOEN, C. O.; KARLSON, A. G.; HIMES, E. M. *Mycobacterium tuberculosis* complex. In: KUBRICA, G. P.; WAYNE, L. G. *The Mycobacteria - A sourcebook Part B*. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 1209-1235.

TWEDDLE, N. E.; LIVINGSTONE, P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, n. 40, p. 23-39, 1994.

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

Diagnóstico

Klaudia dos Santos Gonçalves Jorge

Ana Luiza Alves Rosa Osório

Flávio Ribeiro de Araújo

Cleber Oliveira Soares

Cláudio Roberto Madruga

Robson Ferreira Cavalcante de Almeida

Resumo

A tuberculose bovina é diagnosticada *in vivo* por meio do exame clínico, das provas de tuberculinizações intradérmicas e pelo ensaio para a detecção do interferon-gama bovino. Após a morte do animal, o diagnóstico presuntivo é realizado por exame histopatológico de órgãos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. O diagnóstico definitivo, ou diagnóstico denominado padrão ouro, é realizado pelo isolamento da micobactéria de lesões ou secreções de animais suspeitos ou positivos para tuberculose. As provas bioquímicas, a reação da polimerase em cadeia – PCR – e a análise dos ácidos micólicos são técnicas utilizadas para a identificação das espécies de *Mycobacterium*.

Palavras-chave: tuberculose, *Mycobacterium bovis*, diagnóstico, sorologia.

Abstract

Bovine tuberculosis is diagnosed *in vivo* by clinical examination, intradermal tuberculinization and by detection of bovine interferon-gamma by antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. Post-mortem presumptive diagnosis is made by the histopathological examination of organs with macroscopic lesions suggestive of tuberculosis. The conclusive diagnosis or gold standard diagnosis is made by the isolation of mycobacteria from lesions or secretions from animals suspected of or positive for tuberculosis. Biochemical assays, polymerase chain reaction – PCR – and analyses of mycolic acids are used in the for identification of *Mycobacterium* species.

Key words: tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, diagnosis, serology.

Introdução

A tuberculose bovina é uma enfermidade infectocontagiosa determinada por *Mycobacterium bovis*. É diagnosticada *in vivo* pelo exame clínico e pelas provas intradérmicas simples e comparativa. O exame clínico inclui auscultação, percussão, termometria e palpação de linfonodos superficiais e das glândulas mamárias. Nesses exames são observados a sensibilidade à dor e o aumento de volume visceral. A presença de tosse, secreção nasal, dispnéia e cansaço também são sinais importantes que devem ser considerados.

As provas intradérmicas caudal e cervical simples são utilizadas para triagem. O segundo teste, quando realizado de forma comparativa, possibilita a diferenciação entre *M. bovis* e *Mycobacterium avium* que é considerado não patogênico para bovinos; entretanto, nem todas as reações inespecíficas são eliminadas (Collins et al., 1994). As provas intradérmicas simples utilizam como antígeno um derivado protéico purificado – PPD – extraído de colônias de *Mycobacterium bovis* e a prova comparativa, PPDs extraídos de colônias de *M. bovis* e *M. avium*, que provocam no local de inoculação uma reação imunocelular nos animais portadores da infecção.

A prova de detecção da produção de interferon-gama – IFN- γ – é um ensaio que tem sido amplamente utilizado em alguns países, e baseia-se na estimulação das amostras com PPDs de *M. bovis* e *M. avium* e posterior mensuração da produção do IFN- γ .

O diagnóstico *post-mortem* é realizado pelo exame dos órgãos na necropsia ou achados de abate, e os órgãos que apresentarem lesões suspeitas são encaminhados para o exame histopatológico para verificação da presença de granuloma. A baciloscopia direta não é tão importante no diagnóstico da tuberculose bovina como o é para a tuberculose humana, uma vez que, em órgãos com alterações macroscópicas, podem não ser observados bacilos álcool-ácido resistentes – BAAR – no exame direto (Kantor, 1979).

O diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento do agente micobacteriano de lesões ou de secreções de animais suspeitos. A identificação do agente é feita por meio de provas bioquímicas, técnicas de biologia molecular, como a reação da polimerase em cadeia – PCR –, ou análise química de diferentes grupos funcionais de ácidos micólicos (I, II, III, IV, V e VI), presentes na parede das micobactérias.

Diagnóstico da tuberculose bovina

O método mais confiável e inequívoco, para o diagnóstico de doenças determinadas por bactérias, é o isolamento e a identificação do agente etiológico. No entanto, essa prática torna-se pouco viável para o uso rotineiro no diagnóstico da tuberculose bovina, por causa da dificuldade na obtenção de amostras e da demora no crescimento do patógeno. Assim, apenas em uma pequena porcentagem de animais suspeitos ou positivos para a enfermidade realiza-se o diagnóstico definitivo. Desta forma, para o diagnóstico da infecção, os métodos indiretos, baseados na resposta imunocelular, são os mais utilizados para o controle da enfermidade. Outros testes auxiliares ou complementares, como a PCR, isolamento e provas bioquímicas podem ser utilizados para confirmar o diagnóstico.

Prova tuberculínica intradérmica

A prova tuberculínica tem sido utilizada para o diagnóstico da tuberculose bovina há mais de 100 anos. Esse teste baseia-se na avaliação da resposta do animal ao inóculo de tuberculina, cuja descrição clássica é uma reação de hipersensibilidade tardia com reação inflamatória intensa, edema discreto, infiltração de grande quantidade de células mononucleares no tecido, e que atinge sua intensidade máxima somente no terceiro dia após a inoculação. Esse tipo de reação é deflagrado em animais previamente expostos ao bacilo da tuberculose (Monaghan et al., 1994; Barbuto, 2001). No caso da prova intradérmica simples, a reação à tuberculina bovina caracteriza-se pela presença de uma endureção ou inchaço da pele em local anteriormente demarcado, na prega ano-caudal (prova intradérmica caudal) ou no terço médio do pescoço (prova intradérmica cervical simples), correspondente à área em que a tuberculina foi aplicada.

Na tuberculinização cervical comparativa, as injeções de tuberculina aviária e bovina são feitas no terço médio do pescoço, antecedidas de uma primeira mensuração da pele, em milímetros (Fig. 1). Após 72 horas, a leitura do resultado é feita com nova mensuração da pele (Fig. 1) para verificação da presença da endureção (Monaghan et al., 1994). O aumento da espessura da pele é determinado pelo infiltrado de células mononucleares e o edema formado (Neill et al., 1994), cuja amplitude determinará o resultado do teste. Os resultados em bovinos serão interpreta-

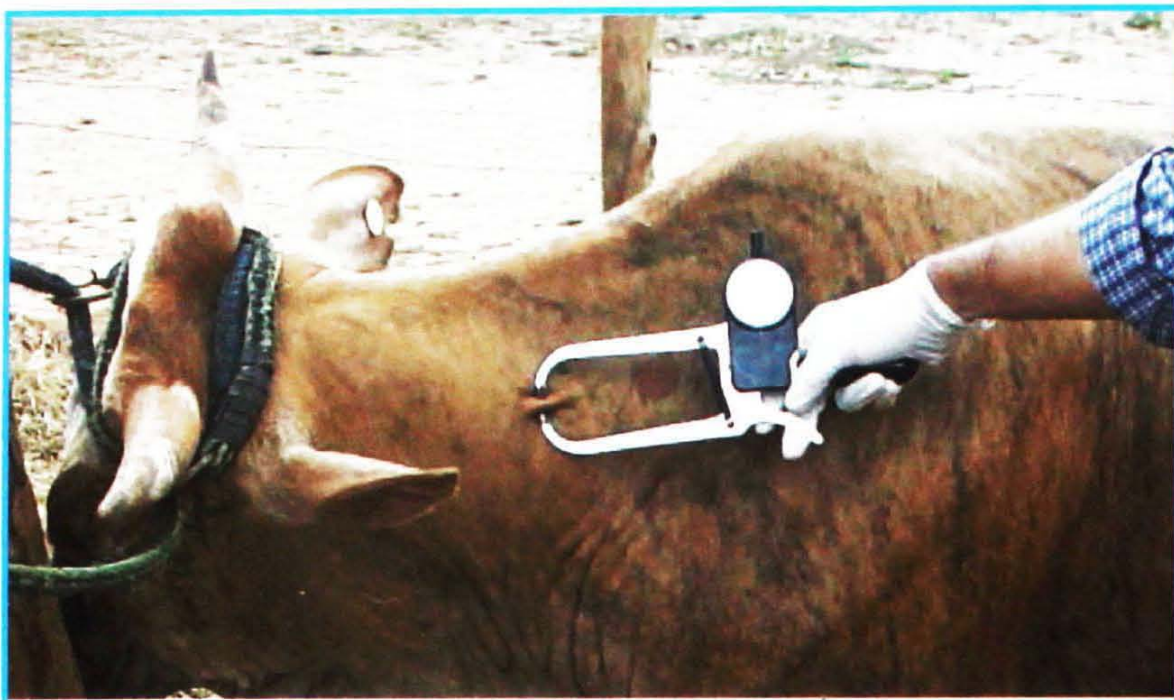


Foto Cleber O. Soares

Fig. 1. Local de eleição para a tuberculinização cervical, detalhe para a mensuração da dobra da pele da região cervical de um bovino.

dos (Tabelas 1 e 2) de acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT – (Brasil, 2001).

O PNCEBT estabelece como provas de triagem a tuberculinização na prega ano-caudal para bovinos de corte e a tuberculinização cervical simples para bovinos de leite (Fig. 1). A prova cervical comparativa é um teste confirmatório, embora possa ser usado para triagem em rebanhos com histórico de reações inespecíficas (Brasil, 2001).

Após a tuberculinização, os animais tornam-se dessensibilizados, isto é, apresentam capacidade diminuída para responder a um novo teste, a qual é recuperada após um período de 42 a 60 dias (Monaghan et al., 1994; Roxo, 1997).

Os testes de tuberculinização podem ocasionar resultados falso-negativos. O fenômeno da anergia, que é caracterizado pela falta de reatividade ao teste cutâneo, é responsável por algumas situações, principalmente quando se têm infecções recentes por *M. bovis* (30 a 50 dias), final da gestação ou pós-parto, desnutrição e uso inadequado de drogas imunossupressoras. Além disso, variações inerentes ao teste, tais como dose, conservação e a própria tuberculina utilizada, somadas às possíveis variações na execução, leitura e interpretação do teste, podem contribuir para o aumento de resultados falso-negativos (Monaghan et al., 1994).

Tabela 1. Interpretação do teste intradérmico cervical simples em bovinos

Tuberculinização simples				
Característica da reação				
Diferença (mm)	Sensibilidade	Consistência	Outras alterações	Interpretação
0 a 1,9	-	-	-	Negativo
2 a 3,9	Pouca dor	Endurecida	Delimitada	Inconclusivo
2 a 3,9	Muita dor	Macia	Exsudato, necrose	Positivo
≥ 4	-	-	-	Positivo

Fonte: Brasil, 2001.

Tabela 2. Interpretação do teste intradérmico cervical comparativo em bovinos.

Tuberculinização comparativa		
Sensibilidade	Diferença (mm)	Interpretação
⁽¹⁾ PPDbv < 2	-	Negativo
PPDbv < PPDav	< 0	Negativo
PPDbv ≥ PPDav	0 a 1,9	Negativo
PPDbv > PPDav	2 a 3,9	Inconclusivo
PPDbv > PPDav	≥ 4	Suspeito

⁽¹⁾ PPDbv, proteína purificada derivativa de *Mycobacterium bovis*; PPDav, proteína purificada derivativa de *Mycobacterium avium*.

Fonte: Brasil, 2001.

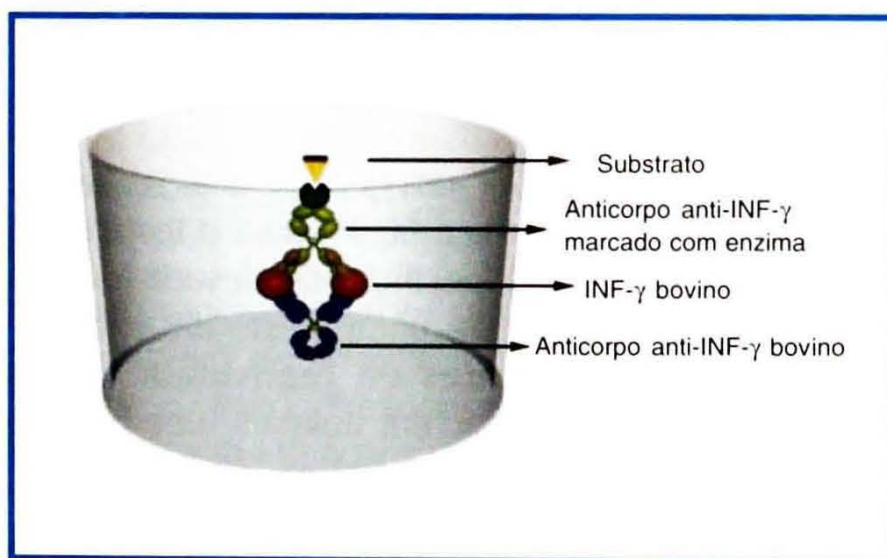
A especificidade desses testes, em geral, é alta. Leslie et al. (1975) registraram especificidade entre 96% e 98,8% para o teste caudal e 99% para o teste cutâneo comparativo. Especificidade elevada foi também descrita por Francis et al. (1978) para este último teste (98,8%). No entanto, reações inespecíficas provenientes da reatividade cruzada com micobactérias atípicas podem ocorrer em animais tuberculinizados, gerando resultados falso-positivos (Wood & Rothel, 1994).

A sensibilidade atribuída aos testes tuberculínicos é variável. Desta forma, foram encontrados valores de 65,6% para o teste cutâneo cervical simples (Wood & Rothel, 1994) e 80,4% a 84,4% para o teste caudal (Whipple et al., 1995).

A tuberculinização tem sido utilizada como principal procedimento em programas de erradicação, nos quais os animais positivos para tuberculose bovina são encaminhados ao abate ("sistema teste e abate"). Esse sistema permitiu a erradicação da doença em muitas partes do mundo (Monaghan et al., 1994). Entretanto, o detalhamento do exame *post-mortem* nesses animais é imprescindível para a confirmação da infecção.

Teste para detecção de interferon-gama – IFN- γ – bovino

O teste para detecção de IFN- γ bovino é um ensaio, *in vitro*, para detecção de imunidade celular específica em resposta à infecção por *M. bovis*. O ensaio baseia-se na quantificação de IFN-g produzido em amostras sanguíneas de animais infectados, após estimulação com PPD bovino (Wood & Rothel, 1997). Isto acontece pela capacidade dos linfócitos do sangue de animais infectados por *M. bovis* em reconhecerem antígenos micobacterianos espécie-específicos presentes no PPD bovino. O IFN-g produzido por estas células é detectado por ensaio de imunoadsorção enzimática - ELISA -, no qual são utilizados anticorpos monoclonais anti-IFN-g bovino (Fig. 2) (Jones et al., 1992). Sabe-se que linfócitos de bovinos não infectados por *M. bovis* não produzem IFN-g em resposta ao PPD, portanto, a detecção dessa citocina está relacionada com a presença da infecção.



Arte: Marcelo Furtado Madruga

Fig. 2. Representação esquemática de um ensaio de imunoadsorção enzimática tipo *sandwich* para detecção de interferon-gama bovino.

Esse diagnóstico indireto da tuberculose bovina tem a vantagem de não ser um procedimento invasivo, não interferir na resposta fisiológica do animal e permitir a realização repetidas vezes e em qualquer intervalo de tempo. No entanto, reações falso-positivas ocorrem por causa do PPD, que não é um antígeno totalmente purificado, e as reações cruzadas com antígenos de micobactérias inespecíficas, com as quais o animal possa ter entrado em contato, podem produzir resultados falso-positivos. A realização de um ensaio paralelo, no qual se quantifica a produção de IFN- γ por linfócitos T de sangue total estimulado com PPD aviário, reduz a incidência desses resultados.

Para a realização do ensaio, coleta-se sangue dos animais a serem testados em tubos contendo heparina. Estes são enviados ao laboratório, sob temperatura ambiente, em um prazo máximo de oito horas. Essa amostra de sangue é dividida em três alíquotas, colocadas em placa apropriada para cultura celular. Uma alíquota é estimulada com PPD bovino, uma com PPD aviária e a outra com tampão salino fosfatado – PBS. Após, incuba-se durante 16 a 24 horas a 37°C, com 5% de CO₂. Os antígenos do PPD são apresentados aos linfócitos e, se o animal estiver infectado com *M. bovis*, suas células T produzem o IFN- γ , que ficará suspenso no plasma (Jones et al., 1992).

Para quantificar o IFN- γ no plasma, realiza-se um ELISA tipo *sandwich* (Fig. 2), onde se tem uma placa previamente adsorvida com anticorpo anti-IFN- γ bovino na qual se adicionam o plasma e, em seguida, o conjugado (anti-IFN- γ bovino marcado com peroxidase), respeitando-se os períodos de incubação e lavagem. A reação é revelada pela adição do substrato cromógeno (tetra-metilbenzidina - TMB) + H₂O₂ e procede-se a leitura em espectrofotômetro para microplacas sob filtro de 450 nm (Araújo et al., 2001).

Na interpretação dos resultados, devem-se considerar positivos, portanto infectados com *M. bovis*, aqueles animais que apresentarem valores médios de absorbância da amostra estimulada com PPD bovino maiores do que os valores das amostras estimuladas com PPD aviário e PBS.

Comparando-se o ensaio de detecção do IFN- γ bovino e o teste intradérmico, em rebanhos com aparecimento recente de tuberculose, constatou-se que o primeiro identificou os animais positivos mais precocemente (Domingo et al., 1995). Reforçando tal conceito, Lilenbaum et al.

(1999) relataram que esse ensaio identificou os animais positivos 90 a 150 dias antes do teste intradérmico. Esse fato é importante na epidemiologia da doença, principalmente em regiões onde a prevalência é alta e a disseminação da enfermidade se dá de maneira muito rápida.

Em rebanho com histórico de tuberculose, certificado pelo teste intradérmico ano-caudal, demonstrou-se positividade de 9,5% e 4,8% no ensaio para detecção de IFN- γ e na prova cervical comparativa, respectivamente (Almeida, 2001). No entanto, só é possível estabelecer a sensibilidade real dos testes, quando estes são realizados em animais comprovadamente positivos por meio do isolamento de *M. bovis*.

Inspeção sanitária

O exame post-mortem realizado na inspeção sanitária é fundamental para o diagnóstico da tuberculose bovina. A detecção das lesões da tuberculose depende do tempo decorrido do abate e do detalhamento com o qual o inspetor procede ao exame. A preocupação da inspeção sanitária durante o abate não é a de detectar doenças específicas, mas de verificar se o produto está apropriado ou não para o consumo humano. Em países onde rigorosas normas de inspeção *post-mortem* são empregadas, o monitoramento do abate detecta quase a totalidade das lesões presentes na carcaça, uma vez que os tecidos são minuciosamente examinados (Corner, 1994).

No Brasil, a Divisão de Normas Técnicas do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA –, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa –, é responsável pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. O RIISPOA foi aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, e alterado pelos Decretos nº 1.255, de 26 de junho de 1962, nº 1.236, de 2 de setembro de 1994, nº 1.812, de 8 de fevereiro de 1996, e nº 2.244, de 4 de junho de 1997, e contém a legislação vigente.

Na inspeção post-mortem, todos os órgãos são examinados na sala de matança, imediatamente após a sua remoção da carcaça. Os linfonodos inguinais, ilíacos, pré-crurais, pré-escapuladores e pré-peitorais devem ser examinados sempre após sua incisão (Brasil, 1997). Toda a carcaça, parte dela, ou órgãos com anormalidades, que possam torná-los impró-

prios para o consumo, devem ser assinalados pela Inspeção Federal e conduzida ao Departamento de Inspeção Final – DIF –, onde são julgadas quanto ao seu destino após o exame minucioso de toda a carcaça.

Lesões nodulares de diferentes tamanhos, de coloração amarelada e aspecto caseoso, caseo-calcificado ou calcificado (Fig. 3) são sugestivas de tuberculose (Reis et al., 1996). Essas lesões localizam-se, principalmente, nos linfonodos mediastínicos, no terço distal do lobo caudal do pulmão (Fig. 3) ou distribuídas em diversos órgãos. O artigo 196 da seção I do capítulo III do RIISPOA trata do destino dado às carcaças e órgãos que apresentam lesões sugestivas de tuberculose. A condenação total da carcaça é determinada quando das seguintes situações:

- Além das lesões tuberculosas, o animal apresentou-se febril no exame *ante-mortem* ou apresenta-se anêmico ou caquético.
- Presença de alterações tuberculosas nos músculos, ossos, articulações e linfonodos correspondentes.
- Presença de lesões caseosas concomitantes em órgãos torácicos e abdominais com alteração das serosas.
- Lesões miliares de parênquimas ou serosas.
- Presença de lesões acompanhadas de inflamação aguda, necrose de liquefação ou presença de tubérculos jovens.
- Em casos de tuberculose generalizada, isto é, quando além das lesões dos aparelhos respiratório, digestório e seus linfonodos, são encontradas lesões em um outro órgão, como baço, rins, útero, ovários, testículos, cápsulas supra-renais, cérebro, medula espinhal ou suas membranas. E ainda em casos de tubérculos numerosos distribuídos uniformemente em ambos os pulmões.

A rejeição parcial da carcaça é feita quando das seguintes situações:

- Partes dela ou órgãos apresentam lesões de tuberculose.
- Presença de lesões tuberculosas na pleura e peritônio parietais.
- Contaminação acidental de partes da carcaça ou órgãos por material tuberculoso.

- Lesões tuberculosas na cabeça.
- Condenação de órgãos cujo linfonodo correspondente apresente lesões tuberculosas.
- Condenação de intestinos e mesentério com lesões extensas que comprometam o órgão.

Foto Klaudia dos S. G. Jorge



Fig. 3. Lesões nodulares no pulmão de um bovino, com coloração amarelada e aspecto caseoso e caseo-calcificado.

Em alguns casos, como carcaças com lesões tuberculosas discretas, localizadas, calcificadas ou encapsuladas limitadas a linfonodos e órgãos, sem evidências de invasão recente pelo bacilo da tuberculose via corrente circulatória, são feitas a remoção e a condenação das partes atingidas. Essas carcaças podem ser aproveitadas após esterilização pelo calor.

O abate de bovinos positivos para tuberculose nas provas intradérmicas (abate sanitário) deve ser realizado em salas especiais, separado e no final da matança. Com esses animais deve-se proceder à necropsia detalhada, examinando-se os linfonodos mandibulares, parotidianos, retrofaríngeos e tonsilas na cabeça; linfonodos mediastínicos, traqueobrônquicos e pulmões no tórax; fígado, linfonodos hepáticos e mesentéricos, baço e rins no abdome; linfonodos cervicais, subilíacos, ilíacos, isquiáticos, sacrais e inguinais (supramamários ou escrotais) na carcaça; além de úbere, conteúdo escrotal e vesículas seminais (Corner, 1994).

Corner (1994), examinando lesões macroscópicas de 374 bovinos tuberculosos, verificou que 31,8% encontravam-se na região da cabeça, 56% na região torácica, 2,9% na região abdominal e 3,6% na região da carcaça. Jorge (2001) observou que linfonodos com lesões suspeitas de tuberculose, provenientes de matadouros-frigoríficos, distribuíam-se da seguinte maneira: 22,5% na região da cabeça, 42,9% no tórax, 4,1% no abdome e 30,6% na carcaça. Da mesma forma, Whipple et al. (1996) encontraram maior incidência dessas lesões em linfonodos da região torácica. Essa incidência, associada à carcaça, pode ser justificada pelo fato de ser obrigatório o exame no linfonodo cervical superficial após incisão pelo inspetor (Brasil, 1997).

Exame histopatológico

Em órgãos que apresentarem lesões compatíveis de tuberculose, devem-se coletar fragmentos delas, com espessura de até 1,5 cm, preferencialmente abrangendo a zona de transição entre a área lesada e a área com aparência normal. Os fragmentos colhidos devem ser acondicionados em frascos de boca larga contendo formol a 10% em volume 10 a 20 vezes maior que o do material a ser fixado (Lemos et al., 1998). Todo o material colhido deve ser identificado antes de ser enviado ao laboratório. As colorações com corantes específicos para micobactérias, as quais utilizam fuccina modificada (método de Kinyoun), facilitam o diagnóstico da tuberculose, por ser possível visualizar os bacilos nos tecidos.

O exame histopatológico constitui um método de diagnóstico presuntivo para a tuberculose bovina, por meio do qual se detecta o granuloma, lesão característica dessa patologia, e pode ser satisfatório em regiões nas quais a prevalência da doença é elevada, mas não deve ser confiável em todas as situações (Corner, 1994). Em estudo realizado por Jorge (2001), no Estado de Mato Grosso do Sul, 80,5% das lesões analisadas apresentavam granuloma ao exame histológico.

Cultivo

Dos diferentes métodos utilizados para o diagnóstico da tuberculose bovina, o isolamento de *M. bovis* é o método definitivo. O entrave no diagnóstico bacteriológico é o longo período requerido para o isolamento

e a identificação de *M. bovis*. Mais de 12 semanas podem ser necessárias para o crescimento dessa micobactéria e a confirmação da infecção.

Os principais fatores que influenciam no sucesso do primo-isolamento de *M. bovis* são a escolha do meio de cultura, os procedimentos de descontaminação e as condições de incubação. *M. bovis* é uma bactéria que requer meios enriquecidos para o seu crescimento e isolamento primário. O Stonebrink, um meio de cultura à base de ovos, é o mais recomendado. Meios à base de ágar enriquecidos com soro ou sangue, como o meio de Middlebrook modificado ou 7H11, e o meio ágar sangue tuberculose ou B83, também, são indicados. Nos meios de cultura à base de ágar, o crescimento é mais rápido, e a primeira colônia reconhecível aparece em torno de 27 dias no B83 e 28 dias no 7H11, comparados com 36 dias no Stonebrink. No entanto, estes são mais susceptíveis ao crescimento de contaminantes, mesmo que a amostra a ser cultivada tenha sido previamente descontaminada (Corner, 1994).

Amostras de leite e de lesões necessitam sofrer descontaminação para permitir o crescimento de *M. bovis*. No entanto, nos casos em que a amostra é coletada assepticamente, como o aspirado de linfonodo, ela pode ser cultivada sem descontaminação prévia. Nessa etapa, o maior problema que se encontra, para a seleção de um descontaminante, é o efeito adverso que a maioria dos reagentes tem sobre *M. bovis*. Vários métodos de descontaminação disponíveis podem ser utilizados, como os do cloreto de hexadecilpiridínio, do ácido oxálico, do cloreto de benzalcônio e de Petroff.

O cultivo de *M. bovis* é feito em tubo com meio inclinado (Fig. 4), e mantido em estufa a 37°C. A inclusão de 5% de CO₂ na atmosfera de incubação não tem efeito sobre a taxa de crescimento e o número de colônias de *M. bovis* em primo-isolamento, enquanto que concentrações superiores a 5% de CO₂ inibem o seu crescimento (Corner, 1994).

Em um estudo realizado na Austrália, foi demonstrado que 62% dos isolados obtidos de lesões em bovinos, suspeitas de tuberculose, são *M. bovis*, contra 4,5% de outras micobactérias (Claxton et al., 1979). No Brasil, Jorge (2001) encontrou 11,1% de agentes do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium microti*) em cultivo de linfonodos com lesões macroscópicas e microscópicas suspeitas de tuberculose.

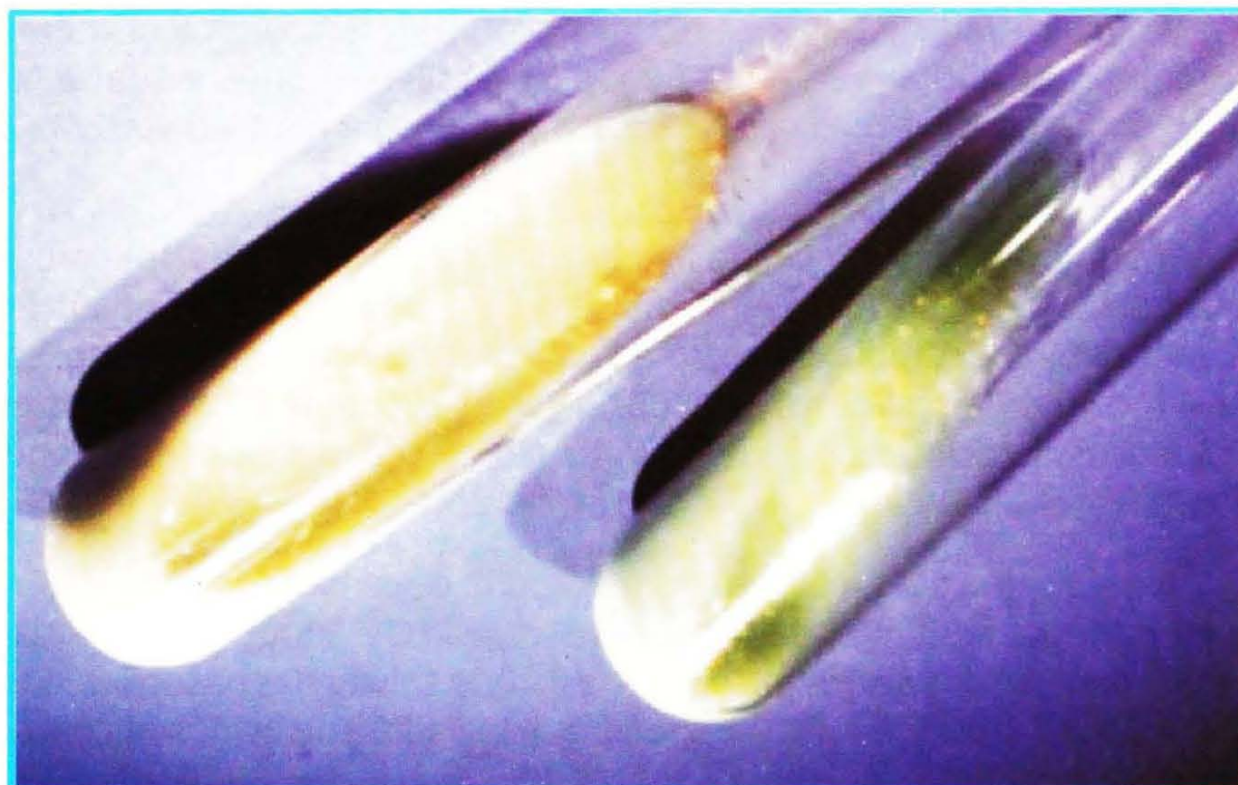


Foto Klaudia dos S. G. Jorge

Fig. 4. Crescimento de bacilo álcool-ácido resistente (em 70 dias de cultivo) de lesão macroscópica de linfonodo de bovino (tubo superior) e *Mycobacterium bovis* AN-5 (tubo inferior), meio de cultura de Stonebrink.

Identificação

As provas básicas para a identificação de agentes do complexo *M. tuberculosis* incluem as características do cultivo, tais como o crescimento em meio de cultura, onde se verifica o tipo de meio utilizado; a temperatura; o tempo de crescimento e o aspecto das colônias; a pigmentação das colônias e a observação da fotorreatividade. Além dessas, provas bioquímicas, como acúmulo de niacina, redução de nitrato a nitrito e produção de catalase, permitem uma seleção prévia da micobactéria.

As provas bioquímicas complementares podem refinar a identificação da micobactéria. A hidrólise do *tween* separa o complexo MAIS (*M. avium*, *Mycobacterium intracellulare* e *Mycobacterium scrofulaceum*) de outras micobactérias ambientais. A prova da redução do telurito de potássio separa o complexo *M. avium-intracellulare* da maioria das outras espécies não-cromogênicas, enquanto o teste de sensibilidade ao antibiótico pirazinamida separa *M. bovis* de *M. tuberculosis* (Brasil, 1994).

Técnicas tradicionais de identificação requerem um crescimento abundante de cultura pura e madura, e necessitam de três a quatro semanas para sua total realização, após o primo-isolamento de *M. bovis* (Collins et al., 1994).

Métodos imunológicos e biomoleculares, como o uso de anticorpos monoclonais e a PCR, permitem também a identificação e a separação dos membros do complexo *M. tuberculosis* (Wards et al., 1995). No entanto, recomenda-se que os isolados sejam submetidos aos testes bioquímicos tradicionais para a confirmação de sua identidade na espécie (Collins et al., 1994).

Algumas técnicas, como a cromatografia de camada delgada – TLC – e a cromatografia líquida de alta pressão – HPLC –, podem ser usadas para a separação dos ácidos micólicos da parede celular das micobactérias, o que permite a sua identificação por meio do padrão de ácidos micólicos apresentado (Leite et al., 1998).

Reação da polimerase em cadeia – PCR

O princípio da PCR baseia-se na síntese enzimática do ácido desoxirribonucleico – DNA –, orientada por oligonucleotídeos iniciadores, que são pequenas cadeias de nucleotídeos sintéticos (Fig. 5).

Os fragmentos iniciadores da síntese de DNA correspondem a uma parte conhecida da seqüência do DNA que se pretende sintetizar e amplificar. Esse processo ocorre em uma reação cíclica que envolve três etapas: desnaturação térmica da dupla fita de DNA bacteriano; hibridização ou anelamento das fitas com o par de oligonucleotídeos iniciadores e extensão destes com o auxílio da enzima polimerase (Fig. 5).

O método de aquecimento das amostras de micobactérias, em banho-maria fervente para romper a parede celular bacteriana e liberar o DNA, foi comparado com a lise enzimática da bactéria e extração do DNA com fenol-clorofórmio. O aquecimento das amostras foi o melhor método com a sensibilidade de aproximadamente 10 microrganismos. Um total de 78 amostras de escarro preparadas pelo aquecimento foi examinado por PCR e os resultados foram comparados com os de baciloscopia, cultura e dados clínicos de pacientes humanos. *M. tuberculosis* foi detectado pela PCR em todos os casos de amostras com baciloscopia e cultura positiva e de baciloscopia negativa com cultura positiva. A PCR também

foi capaz de detectar quatro de nove casos clinicamente suspeitos de tuberculose, nos quais a baciloscopia e a cultura foram negativas (Kocagöz et al., 1993).

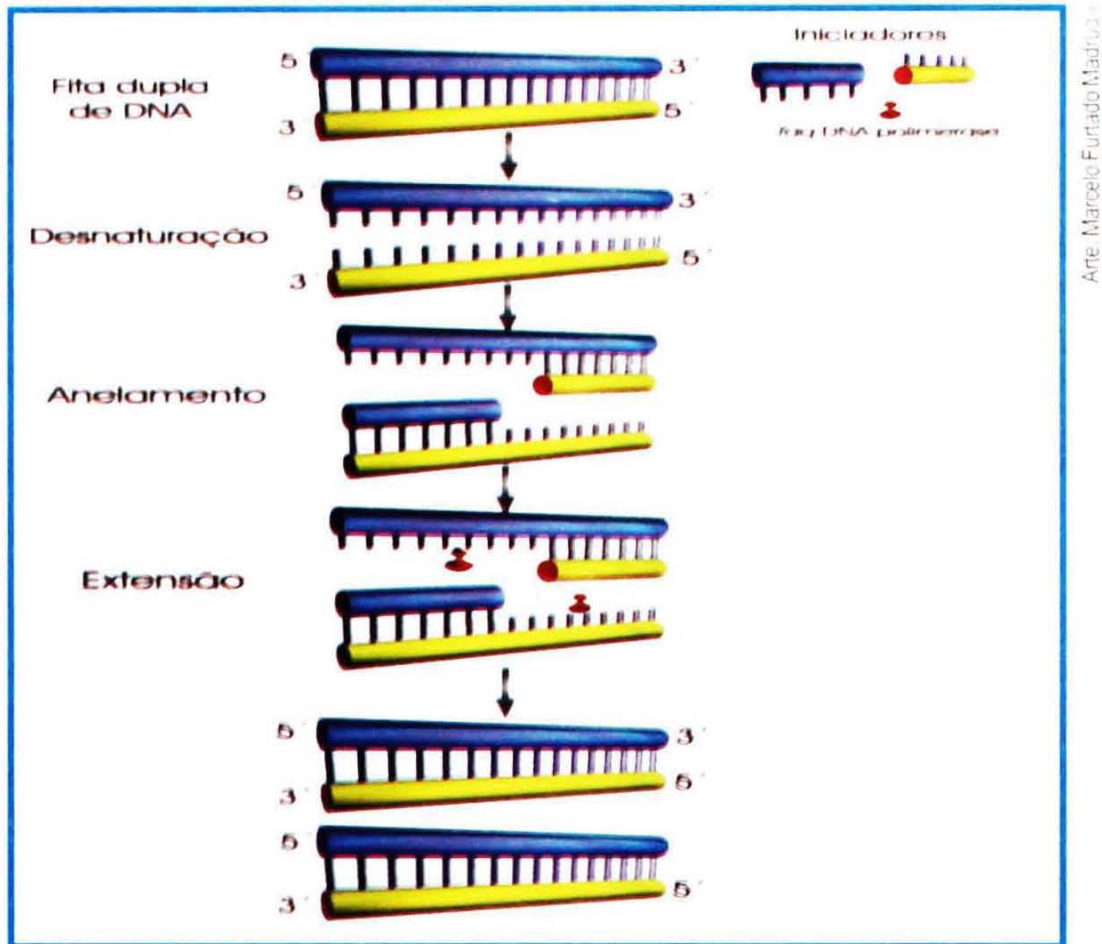


Fig. 5. Representação esquemática do ciclo de amplificação de DNA por reação da polimerase em cadeia - PCR.

O sucesso da técnica de amplificação do DNA para a detecção de micobactéria causadora de tuberculose em mamíferos depende, dentre outros fatores, da escolha da sequência de genes que será amplificada, a qual deve estar presente nas micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, e ausente em outras bactérias (Magdalena et al., 1998). O segmento IS6110 é alvo de muitas das reações de amplificação do DNA dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, pois ele se repete de uma a vinte vezes no cromossomo dessas espécies, conferindo, nesse caso, uma alta sensibilidade ao método (Magdalena et al., 1998).

A variação nos resultados de diferentes autores quanto à especificidade e sensibilidade deste teste deve-se a muitos fatores, como o tipo de amostra, o emprego de metodologias diferentes no preparo das amos-

tras, no sistema de amplificação e na detecção do produto amplificado (Wards et al., 1995; Hirata et al., 1997).

Esse procedimento mostra-se mais sensível quando utilizam culturas a partir de tecido com lesão de tuberculose ou *Mycobacterium* sp. para a extração de DNA. O que não ocorre quando utilizam amostras clínicas, em particular, tecidos (Wards et al., 1995). Ao analisar culturas de micobactérias isoladas de linfonodos de bovinos, verificou-se por PCR que 45,5% pertenciam ao complexo de *M. tuberculosis*, 9,1% de *M. avium* e 9,1% de *Mycobacterium fortuitum* (Jorge, 2001). Enquanto que Leite et al. (1998) detectaram, por essa técnica, a presença de *M. bovis* em 60% dos isolados de linfonodos estudados.

Considerações finais

O impacto da tuberculose como zoonose, além de pôr em risco a saúde humana, tornou vulneráveis produtos da pecuária bovina nacional a barreiras sanitárias, diminuindo sua competitividade no comércio internacional. Esses fatores determinaram a elaboração de um programa com o objetivo de padronizar o controle dessa enfermidade dentro dos princípios técnicos sugeridos pelo código zoossanitário internacional. O PNCEBT visa, ainda, a promover a qualidade dos produtos de origem animal oferecidos ao consumidor e contribuir para modernizar as cadeias produtivas da carne e do leite no Brasil.

A exemplo do que ocorre em países desenvolvidos, a tuberculinização simples ou comparativa foi adotada como teste diagnóstico da tuberculose no Brasil. Com a evolução do programa, testes complementares de eficácia comprovada deverão ser utilizados.

O padrão ouro de diagnóstico é o isolamento e a identificação de *M. bovis*. No entanto, técnicas moleculares, como a PCR, têm sido implementadas como metodologia para o diagnóstico rápido da tuberculose (Abanto, 2000). Essas provas têm sido de grande valia em estudos epidemiológicos, pois permitem a elucidação de casos, principalmente em áreas onde animais silvestres estão envolvidos. As provas bioquímicas também são amplamente utilizadas. Contudo, tais técnicas deverão ser utilizadas apenas como complementares ao diagnóstico intradérmico, na identificação de animais infectados por *M. bovis*.

Referências

- ABANTO, S. M. H.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; MAMIZUKA, E. M.; SCHMAL, M.; HOSHINO-SHIMIZU, S. Evaluation of genes-PCR assay for *Mycobacterium* detection in different clinical specimens from patients with or without tuberculosis-associated HIV infection. *Journal of Clinical Laboratory Analyses*, New York, n. 14, p. 238-245, 2000.
- ALMEIDA, R. F. C. *Diagnóstico da brucelose e tuberculose bovina*. 2001. 30 f. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2001.
- ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R. Protocolos de técnicas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em medicina veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p. 177-341.
- BARBUTO, J. A. M. Imunologia celular. In: CALICH, V.; VAZ, C. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 179-193.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Departamento de Defesa Animal. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose*. Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: **05 de abr. 2002**.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. *Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal* - RIISPOA. Brasília, 1997. 243 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de bacteriologia da tuberculose*. 2 ed., Rio de Janeiro, 1994. 111 p.
- CLAXTON, P. D.; EAMENS, G. J.; MYLREA, P. J. Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, Brunswick, n. 55, p. 514-520, 1979.
- COLLINS, D. M.; RADFORD, A. J.; LISLE, G. W.; JACOB, H. B. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, n. 40, p. 83-94, 1994.
- CORNER, L. A. *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, n. 40, p. 53-63, 1994.

DOMINGO, M.; LIEBANA, E.; VILAFRANCA, M.; ARANAZ, A.; VIDAL, D.; PROETS, N.; MATEOS, A.; CASAL, J.; DOMINGUEZ, L. A field evolution of the interferon gama assay and the intradermal tuberculin test in dairy cattle in Spain. In: GRIFFIN F.; LESLIE G. *Tuberculosis in wildlife and domestic animals*. Otago Conference. Series nº 3, Dunedin: University of Otago Press, 1995. p. 304-306.

FRANCIS, J.; SEILER, R. J.; WILKIE, I. W.; O'BOYLE, D.; LUMSDEN, M. J.; FROST, A. J. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Veterinary Records*, London, v. 103, p. 420-435, 1978.

HIRATA, M. H.; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. C.; LEITE, C. Q. F. Gene amplification techniques to *M. tuberculosis* diagnosis. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, n. 18, p. 75-85, 1997.

JONES, S. L.; COX, J. C.; SHEPHERD, J. M.; ROTHEL, J. S.; WOOD, P. R.; RADFORD, A. J. Removal of false-positive reactions from plasma in an enzyme immunoassay for bovine gamma interferon. *Journal of Immunology Methods*, Amsterdam, n. 155, p. 233-240, 1992.

JORGE, K. S. G. *Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil*. 2001. 73 f. Dissertação (Mestrado) - FIOCRUZ / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2001.

KANTOR, I. N. Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal. *OPAS/OMS*, 1979. 63p. (Nota Técnica, 11).

KOCAGÖZ, T.; YILMAZ, E.; OZKARA, S.; KOCAGÖZ, S.; HAYRAN, M.; SACHADENA, M.; CLAMBERS, H. F. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, New York, n. 31, p. 1435-1438, 1993.

LEITE, C. Q. F.; SOUZA, C. W. O.; LEITE, S. R. A. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, n. 93, p. 801-805, 1998.

LEMOS, R. A. A.; NAKAZATO, L.; BRUM, K. B.; BERNARDO, K. C. Reconhecimento e interpretação de achados de necrópsia. In: LEMOS, R. A. A. *Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico*. Campo Grande: Editora UFMS, 1998. p. 17-25.

LESLIE, I. W.; HERBERT, C. N.; BURN, K. J.; MCCLANCY, B. N.; DONNELLY, W. J. C. Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle. ***Veterinary Records***, London, v. 96, p. 332-341, 1975.

LILENBAUM, W.; SCHETTINI, J. C.; SOUZA, G. N.; RIBEIRO, E. R.; MOREIRA, E. C.; FONSECA, L. S. Comparison between a γ -IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. ***Journal of Veterinary Medicine***, Berlin, n. 46, p. 353-358, 1999.

MAGDALENA, J.; VACHEE, A.; SUPPLY, P.; LOCHT, C. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. ***Journal of Clinical Microbiology***, New York, n. 36, p. 947-943, 1998.

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

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

REIS, D. O.; COELHO, H. E.; LUCIO, N. F. Características morfológicas das lesões de tuberculose, em bovinos abatidos. ***Higiene Alimentar***, São Paulo, n. 10, p. 15-16, 1996.

ROXO, E. *Mycobacterium bovis* como causa de zoonose. ***Revista de Ciências Farmacêuticas***, São Paulo, n. 18, p. 101-108, 1997.

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

WHIPPLE, D. L.; BOLIN, C. A.; DAVIS, A. J.; JARNAGIN, J. L.; JOHNSON, D. C.; NABORS, R. S.; PAYEUR, J. B.; SAARI, D. A.; WILSON, A. J.; WOLF, M. M. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial γ -interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. ***American Journal of Veterinary Research***, Schaumburg, n. 56, p. 415-419, 1995.

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

WOOD, P. R.; ROTHEL, J. S. *In vitro* immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. ***Veterinary Microbiology***, Amsterdam, n. 40, p. 125-35, 1994.

Glossário

A

Aborto: interrupção prematura da gestação, com ou sem expulsão do feto antes que ele possa sobreviver fora do organismo materno, independente do fato de ser ela espontânea ou provocada.

Ágar: substância existente em certas algas vermelhas (rodofíceas), e que forma com facilidade um hidrogel, utilizado como meio de cultura de microrganismos; ágar, gelose.

Agente etiológico: qualquer substância ou elemento, variável ou fator, animado ou inanimado, cuja presença ou ausência, mediante contato efetivo com o hospedeiro susceptível, constituir estímulo para iniciar ou perpetuar um processo de doença.

Aglutinina: anticorpo decorrente de estímulos induzidos por antígenos de superfície e que tem a capacidade de reagir especificamente provocando a aglutinação de antígenos particulados.

Anergia: baixa da capacidade do sistema imune de reagir a antígenos específicos.

Anticorpo: glicoproteína, também chamada de imunoglobulina, produzida por linfócitos B que se ligam especificamente a antígenos.

Anticorpos colostrais: ver imunidade passiva.

Anticorpos monoclonais: anticorpos obtidos de um só clone de linfócitos B e que reconhecem exclusivamente um determinante antigênico específico.

Antígenos: substâncias que induzem resposta imune específica e são alvo desta resposta.

B

BAAR (bacilos álcool-ácidos resistentes): são bacilos que resistem à descoloração com álcool-ácido.

B19: isolado de *Brucella abortus*, amostra 19, que é utilizado para a elaboração de vacina contra brucelose bovina.

Brucelose: enfermidade infecciosa causada por bactérias do gênero *Brucella*, comum aos bovinos, caprinos e suínos, por eles transmitida ao homem, e que provoca febre, anemia, nevralgias, dores articulares e suores; febre-de-malta, febre-do-mediterrâneo, febre-ondulante.

C

Cut-off: ver linha de corte.

D

Descontaminação: eliminação de um agente etiológico de uma superfície contaminada, seja ela de um ser animado ou de um objeto inanimado.

Diagnóstico: conjunto de procedimentos adotados para estabelecer, em cada caso específico, a(s) causa(s) envolvida(s) no processo de doença, a fim de possibilitar a adoção de medidas terapêuticas e/ou profiláticas compatíveis.

Dispnéia: dificuldade em respirar.

Doença: processo interativo; decorrente da participação de vários fatores que resultam em uma alteração ou desvio do estado de relativo equilíbrio que caracteriza a condição de saúde do indivíduo, e está sempre associado a uma seqüência de manifestações características, comumente chamadas de sinais clínicos ou sintomas.

Doença infectocontagiosa: agravo da saúde causado por um agente infeccioso específico ou de seus produtos tóxicos, e que pode ser transmitido de um hospedeiro infectado a um susceptível por meio de uma ampla variedade de mecanismo de disseminação.

E

ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimático): teste de diagnóstico que usa um dos componentes (antígeno ou anticorpo) adsorvido a um suporte inerte, e anti-imunoglobulina, anticorpo ou antígeno ligados a enzimas. O complexo formado (componente adsorvido + elemento marcado com enzima) é revelado pela adição de um substrato cromogênico.

Epidemiologia: estudo das inter-relações dos vários determinantes da frequência e distribuição de doenças em um conjunto populacional, ou estudo da ocorrência de doenças em populações e dos meios para a correspondente prevenção.

Erradicação: conjunto de ações empreendidas com fins específicos de eliminar uma doença de um determinado território.

Especificidade: habilidade de um método de diagnóstico em classificar como negativos os indivíduos não-dotados do atributo pesquisado. É expressa pela proporção de animais não infectados que o método é capaz de qualificar corretamente como negativos.

F

Falso-negativo: resultado que se obtém quando indivíduos efetivamente acometidos por uma doença ou detentores dos atributos pesquisados são classificados como negativos por um método qualitativo.

Falso-positivo: resultado que se obtém quando indivíduos não acometidos por uma doença nem detentores dos atributos investigados são classificados como positivos por um método qualitativo.

Fonte de infecção: elemento animado ou inanimado que abriga um agente infeccioso e é capaz de eliminá-lo, transmiti-lo ou disseminá-lo a um outro hospedeiro.

FPA (ensaio de fluorescência polarizada): técnica de diagnóstico que utiliza marcador fluorescente e luz polarizada para detectar interações moleculares em sistemas biológicos e químicos. Esta técnica tem sido usada no diagnóstico de várias doenças infecciosas de humanos e de animais, para monitorar níveis terapêuticos de drogas e substâncias em fluidos corporais e para diagnosticar patógenos em alimentos, micotoxinas em grãos e pesticidas.

H

Hipersensibilidade tardia: processo mediado por linfócitos T, os quais produzem citocinas que promovem inflamação. Recebe este nome devido a seus efeitos característicos serem observados em 24-48 horas após estimulação pelo antígeno.

Hospedeiro: indivíduo capaz de abrigar, na intimidade do organismo ou em sua superfície, um determinado agente etiológico com o qual estabelece variadas interações.

I

IgG (imunoglobulina da classe G): isótipo que desempenha diversas funções, tais como opsonização, ativação de complemento, aglutinação, neutralização de vírus e conferência de imunidade passiva ao neonato. Este isótipo possui cadeia pesada do tipo γ .

IgM (imunoglobulina da classe M): principal isótipo de respostas imunes primárias. Funciona como receptor de antígenos em linfócitos B virgens, aglutina e ativa complemento. Este isótipo possui cadeia pesada do tipo μ .

Imunidade: resposta do organismo a substâncias estranhas, incluindo microrganismos e macromoléculas, a qual pode ter uma consequência fisiológica (ex: proteção) ou patológica (ex: hipersensibilidade).

Imunidade específica: também chamada de imunidade adaptativa e/ou adquirida, desenvolve-se especificamente após o contato com um determinado antígeno, e pode ser re-estimulada, agindo com maior intensidade e eficácia em um encontro subsequente com o mesmo antígeno. A imunidade específica é mediada por linfócitos B e T.

Imunidade passiva: imunidade transferida ao hospedeiro por intermédio de anticorpos e/ou células previamente elaborados no organismo de outros hospedeiros. Normalmente, a resistência ou proteção embasada nesse tipo de imunidade apresenta curto período de duração.

Imunógeno: qualquer substância que, quando em contato íntimo com o organismo do hospedeiro imunologicamente competente, estimula uma resposta imune (humoral ou celular).

Incidência: número de casos novos de uma doença, constatados dentro de uma determinada população durante um período de tempo específico, dando uma idéia da dinâmica de sua propagação.

Infecção: penetração, desenvolvimento e multiplicação de seres inferiores no organismo de hospedeiro, de que podem resultar, para este, consequências variadas, habitualmente nocivas, em grau maior ou menor.

K

KDa (quilodaltons): unidade de massas de moléculas. Equivalente a 1.000 Daltons (Da).

L

Linha de corte: parâmetro utilizado em um ensaio sorológico para determinar se a amostra testada é positiva ou negativa.

LPS (lipopolissacarídeos): estrutura composta de lipídeos e sacarídeos, presente em bactérias Gram-negativas, e que é liberada pela destruição da bactéria. Pode, por si própria, estimular a produção de citocinas por macrófagos.

M

Meio de cultura: qualquer sistema nutritivo destinado ao cultivo artificial de bactérias ou de outras células. Usualmente é constituído por uma mistura complexa de materiais orgânicos e inorgânicos.

Microrganismo atenuado: organismo patogênico que foi submetido a condições especiais capazes de reduzir-lhe a patogenicidade sem, contudo, privar-lhe de sua capacidade vital. Em vacinas é essencial que o processo de atenuação não interfira nas qualidades imunogênicas do agente.

Monotípico: que tem apenas um representante (diz-se, especificamente, de gênero que possui apenas uma espécie).

P

Patogenia: processo interativo da relação agente-hospedeiro que ocorre durante o intervalo de tempo que corresponde ao desenvolvimento progressivo de todo o processo da doença, desde o momento da interação inicial agente-hospedeiro até sua resolução final.

PCR (reação da polimerase em cadeia): técnica de síntese enzimática *in vitro* de ácidos nucleicos.

PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina): instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

PPD (derivado protéico purificado): ver tuberculina.

Prevalência: número de casos clínicos ou de portadores existentes em um determinado momento em uma comunidade, dando uma idéia da estática da ocorrência do fenômeno.

Prevenção: são conjuntos de medidas que visam prevenir ou atenuar as doenças, suas complicações e conseqüências. Comumente chamada de profilaxia.

R

RB51: vacina utilizada contra a brucelose bovina, elaborada a partir de amostras de colônias rugosas de *Brucella abortus*.

Reação cruzada: reação de anticorpos com epítomos em comum, presentes em antígenos não relacionados.

Reservatório: considerada uma espécie principal, objeto de ação sanitária, e os demais vertebrados capazes de atuar como fonte de infecção, no processo de disseminação de uma determinada doença, são considerados reservatórios.

Resistência natural: habilidade do hospedeiro de resistir a um determinado agente etiológico sem a interferência de anticorpos ou do desenvolvimento de respostas tissulares específicas.

S

SAL-2ME (prova da soroaglutinação lenta em 2-mercaptoetanol): prova utilizada para o diagnóstico confirmatório de brucelose, após a triagem pela prova do antígeno acidificado tamponado.

Sensibilidade: habilidade de um método de diagnóstico em classificar como positivos os indivíduos dotados do atributo de julgamento. É expressa pela proporção de animais infectados que o método é capaz de qualificar corretamente como positivos.

T

Transmissão: transferência de um agente infeccioso de uma fonte de infecção a um hospedeiro susceptível.

Tuberculina: extrato de bacilos tuberculares utilizado no teste para o diagnóstico cutâneo da tuberculose. Conhecido também como derivado protéico purificado (PPD).

V

Vacina: preparação contendo microrganismos completos, vivos ou inativados, frações deles dotadas de propriedades imunogênicas, ou produtos do seu metabolismo. A vacina é utilizada com a finalidade de provocar, no hospedeiro, uma resposta imune específica contra um agente infeccioso em particular.

Vacinação: procedimento preventivo que tem como base a administração de uma vacina a um hospedeiro.

Z

Zoonose: doença transmissível de outros animais vertebrados ao homem, e vice-versa, sob condições naturais.

Índice remissivo

A

- Abate sanitário 70
- Aborto 13, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 26, 27, 81
- Ácidos micólicos 48, 61, 62, 74
- Agente etiológico 14, 26, 46, 63, 81, 82, 83, 86
- Aglutinação 21, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 39, 40, 81, 83
- Aglutininas 27
- AIDS 47
- Alterações macroscópicas 62
- Amostra 18, 19, 20, 21, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 38, 42, 49, 51, 62, 63, 66, 67, 72, 74, 75, 76, 81, 84, 85
 - Amostra 1119-3 27
 - Amostra lisa 21
 - Amostra rugosa 20
- Anergia 64, 81
- Animais silvestres 46, 76
- Anticorpos 16, 17, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 34, 35, 36, 38, 39, 66, 74, 81, 84, 85, 86
 - Anticorpos colostrais 19, 81
 - Anticorpos monoclonais 28, 36, 66, 74, 81
 - Anticorpos vacinais 20, 21, 28, 34
- Antígeno 16, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 40, 42, 62, 66, 67, 81, 82, 83, 84, 85, 86
 - Antígeno acidificado tamponado 86
- Áreas livres 52, 53, 55

B

- B19 13, 18, 19, 21, 35, 81
- Bacilo álcool-ácido resistente 45, 73
- Baciloscopia 48, 49, 62, 74, 75
- Bactéria 13, 14, 16, 17, 23, 25, 26, 27, 28, 49, 63, 72, 74, 75, 82, 84, 85
- Bezerros 17, 18, 50
- Bovinos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 40, 45, 46, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 62, 63, 64, 66, 70, 71, 72, 76, 78, 79, 82

Brucella 13, 14, 15, 16, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 32, 34, 36, 40, 42, 81, 82, 85

Brucella abortus 13, 14, 15, 22, 23, 25, 26, 29, 32, 34, 36, 42, 81, 85

Brucella canis 15

Brucella melitensis 15

Brucella neotomae 15

Brucella ovis 15

Brucella suis 15

Brucelose 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 34, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 48, 56, 64, 77, 81, 82, 85, 86

C

Calcificação 53

Carne 14, 48, 76

Células 17, 45, 53, 63, 66, 67, 84, 85

Células epitelióides 45, 53

Células gigantes 45, 53

Cervídeos 45, 50

Código zoossanitário 76

Colostro 17, 27, 28

Complexo MAIS 73

Condenação 69, 70

Conjugado 34, 35, 67

Contaminação 17, 20, 50, 51, 69

Controle 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 18, 20, 21, 22, 25, 32, 34, 36, 38, 40, 41, 45, 48, 52, 54, 55, 56, 63, 64, 76, 77, 85

Cromatografia 74

Cromatografia de camada delgada 74

Cromatografia líquida de alta pressão 74

Cromossomo 75

Culturas 7, 76

D

Densidade óptica 34

Derivado protéico purificado 62, 85, 86

Determinantes antigênicos 35

Diagnóstico 9, 10, 15, 16, 18, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 34, 36, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 47, 55, 56, 57, 61, 62, 63, 67, 68, 71, 76, 77, 78, 82, 83, 86

Diagnóstico bacteriológico 71
Diagnóstico diferencial 18
Diagnóstico direto 26
Diagnóstico indireto 27, 67

Diarréia 53

Dispnéia 53, 62, 82

Disseminação 17, 54, 68, 82, 86

E

Educação sanitária 15, 45, 56

ELISA 21, 27, 34, 35, 43, 66, 67, 82

ELISA competitivo 34, 35

ELISA indireto 34

Epidemiologia 8, 9, 10, 12, 13, 16, 45, 49, 68

Eritritol 16

Erradicação 7, 8, 9, 10, 15, 21, 22, 34, 40, 41, 48, 49, 50, 52, 53, 55,
56, 64, 66, 77, 83, 85

Especificidade 26, 27, 30, 34, 35, 36, 38, 40, 65, 75, 83

Exame 27, 32, 33, 61, 62, 66, 68, 69, 71

Exame histológico 71

Exame histopatológico 61, 62, 71

Exame post-mortem 66, 68

F

Falso-negativos 27, 64

Falso-positivas 27, 28, 31, 67

Fibrose 45, 53

Fixação de complemento 21, 25, 27, 30, 39, 42

Fluorescência polarizada 21, 25, 27, 36, 38, 40, 83

Fluoróforo 37

G

Gânglios linfáticos 17

Genes 17, 75, 77

Gestação 13, 16, 18, 26, 64, 81

Glândula mamária 51

Granuloma 62, 71

H

Hibridização 74

Hidrólise do *tween* 73

Homem 14, 16, 17, 21, 45, 46, 49, 50, 82, 86

Hospedeiro 15, 17, 45, 49, 50, 53, 81, 82, 83, 84, 85, 86

Humana 14, 16, 46, 47, 50, 51, 52, 55, 62, 76, 78

Humanos 14, 21, 47, 58, 74, 83

I

IgG1 28, 34

IgM 28, 29, 30, 84

Imunidade 17, 19, 21, 23, 66, 81, 83, 84

Imunidade celular 66

Imunidade passiva 17, 81, 83, 84

Imunização 9, 21

Incidência 15, 48, 51, 52, 55, 67, 71, 84

Infecção 84

Infecção congênita 51

Infecção cutânea 51

Infecção natural 21, 34, 39

Infertilidade 13, 14, 16, 26

Inflamação 17, 69, 83

Inóculo 17, 63

Inseminação artificial 17, 21

Inspeção sanitária 68

Interferon-gama 61, 62, 66, 67

Isolamento 17, 25, 26, 27, 40, 61, 62, 63, 68, 71, 72, 74, 76

L

Legislação 68

Leitor de fluorescência 36, 38

Linfática 17

Linfonodos 45, 53, 54, 62, 68, 69, 70, 71, 72, 76

Lipopolissacarídeo 16, 28, 84

M

- Macrófagos 17, 45, 53, 84
- Manejo 21, 50, 55
- Marsupial 50
- Maturidade sexual 16, 18
- Membrana celular 16
- Metástases 54
- Micobactérias 46, 48, 49, 62, 65, 67, 71, 72, 73, 74, 75, 76
- Microrganismos 21, 48, 74, 81, 84, 86
- Middlebrook 72
- Milipolarização 36
- Mucosas 17
- Mycobacterium*, 45
 - Mycobacterium africanum* 46, 72
 - Mycobacterium bovis* 45, 46, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 73, 77, 79
 - Mycobacterium intracellulare* 73
 - Mycobacterium microti* 46, 72
 - Mycobacterium scrofulaceum* 73
 - Mycobacterium tuberculosis* 46, 59, 78, 79

N

- Necrópsia 62, 70
- Necrose 45, 53, 64, 69
- Nódulo pulmonar 54

O

- Ocorrência 18, 26, 28, 47, 51, 82, 85
- Oligonucleotídeos 74
- Orquite 16

P

- Parênquima pulmonar 54
- Parto 13, 18, 27, 64
- Pasteurização 49
- Patogenia 16, 53, 85
- Pecuária 7, 8, 9, 10, 13, 14, 22, 24, 25, 41, 48, 54, 56, 68, 76, 77, 85

Perdas econômicas 14
Peroxidase 34, 35, 67
Pipeta de Bang 30
Pirazinamida 73
Placenta 16, 27
PNCEBT 7, 8, 9, 10, 15, 40, 48, 56, 64, 76, 85
PPD 62, 64, 66, 67, 78, 79, 85, 86
Prega ano-caudal 63, 64
Prejuízo 9, 14, 52, 54
Prejuízos econômicos 14, 16
Prevalência 9, 14, 15, 18, 19, 33, 36, 47, 48, 52, 53, 55, 56, 68, 71, 85
Produtividade 10, 14, 20, 48
Programa 7, 8, 9, 10, 14, 15, 19, 22, 32, 34, 36, 38, 40, 41, 48, 49, 53, 55, 56, 64, 66, 76, 77, 85
Propriedades livres 15, 56
Proteção 19, 21, 84
Prova 27, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 62, 63, 64, 68, 73, 86
 Prova comparativa 62
 Prova tuberculínica 63
Provas 18, 20, 21, 30, 34, 36, 42, 64, 70, 73, 76
 Provas bioquímicas 61, 62, 63, 73, 76
 Provas intradérmicas 62, 70
 Provas sorológicas 18, 20, 21, 26, 27, 61, 62, 63
provas 18, 20, 21, 26, 27, 30, 34, 36, 42, 61, 62, 63, 64, 70, 73, 76
Puberdade 18

R

Rap test 27, 30, 31, 32, 33, 38, 40
RB51 20, 21, 23, 85
Reação 29, 31, 54, 61, 62, 63, 64, 67, 74, 85
 Reação da polimerase em cadeia - PCR 25, 61, 62, 74
 Reação de hipersensibilidade 53, 63
 Reação de hipersensibilidade tardia 63
Reações 21, 27, 28, 29, 31, 33, 39, 62, 64, 65, 67, 75
 Reações cruzadas 21, 28, 39, 67
 Reações inespecíficas 62, 64, 65
Rebanho 7, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 33, 35, 36, 40, 45, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 64, 67, 68

Resistência 17, 21, 54, 56, 84, 86
 Resposta imune 16, 19, 81, 84, 86
 Rifampicina 21
 Rosa-de-bengala 25, 27, 29, 30, 31, 33, 38

S

Sangue 17, 66, 67, 72
 Secreção nasal 62
 Sêmen 17, 21, 27, 50, 51
 Sensibilidade 25, 26, 27, 33, 35, 36, 38, 40, 62, 64, 65, 68, 73, 74, 75, 86
 Sistema teste e abate 66
 Soroaglutinação lenta 21, 25, 27, 29, 30, 86
 Soropositivos 14, 18, 19, 30, 33, 38
 Stonebrink 72, 73
 Suínos 15, 45, 50, 82

T

Teste confirmatório 29, 30, 34, 39, 64
 Testes 16, 25, 27, 30, 33, 36, 38, 39, 40, 57, 63, 64, 65, 68, 74, 76, 78
 Testes bioquímicos 74
 Testes sorológicos 16, 30, 36
 Texugo 50
 Tosse 53, 62
 Toxicidade 30
 Trânsito de animais 56
 Transmissão 13, 45, 50, 51, 52, 86
 Transmissão genital 51
 Transmissão iatrogênica 51
 Triagem 30, 38, 62, 64, 86
 Tuberculina 63, 64, 85, 86
 Tuberculinização cervical 63, 64, 65
 Tuberculinizações intradérmicas 61
 Tubérculo 45, 53, 69
 Tuberculose 7, 8, 9, 10, 15, 22, 40, 41, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51,
 52, 53, 54, 55, 56, 57, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72,
 75, 76, 77, 78, 79, 85, 86
 Tuberculose bovina 7, 8, 9, 41, 45, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55,
 56, 57, 61, 62, 63, 66, 67, 68, 71, 77, 78, 85

Tuberculose humana 46, 47, 50, 51, 55, 62

U

Útero 16, 17, 18, 51, 69

V

Vacas 16, 17, 33, 45, 50

Vacina 13, 14, 18, 19, 20, 21, 81, 85, 86

Vacinação 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 86

Veterinário 8, 10, 15, 20, 21, 45, 56

Via 16, 17, 50, 51, 53, 54, 70

Via aérea 54

Via digestória 45

Via orofaríngea 50

Via respiratória 45, 50, 51, 53, 45, 46

Virulência 17, 21

Y

Yersinia enterocolitica 21, 28, 42

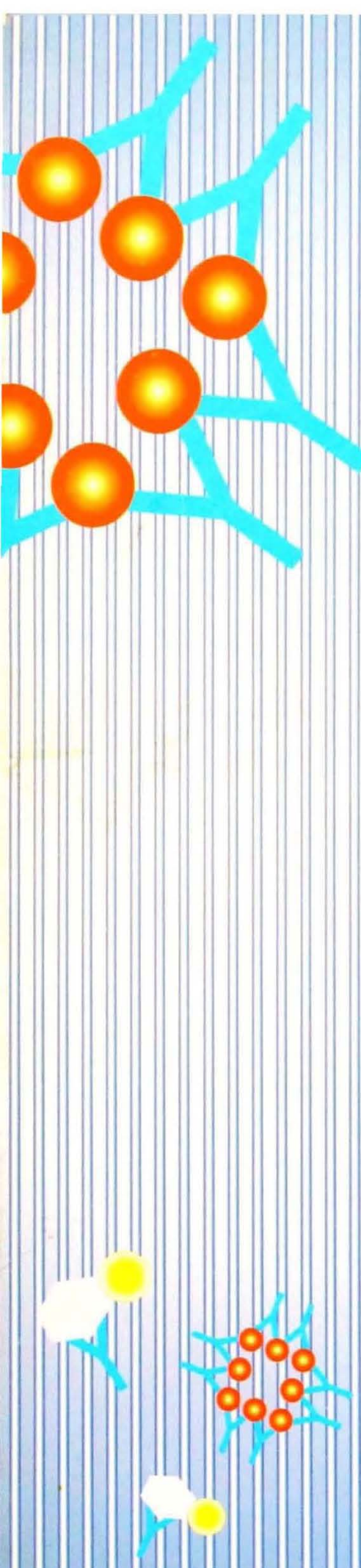
Z

Zoonose 9, 13, 16, 50, 52, 56, 58, 76, 79, 86



Os capítulos 2 e 4 tratam dos métodos e meios de diagnóstico da brucelose e da tuberculose bovina, desde as técnicas tradicionais e mais simples até as mais modernas, como os métodos moleculares por reação de polimerase em cadeia – PCR – e os imunológicos, como o ensaio de fluorescência polarizada – FPA. Nesses capítulos, são descritas e discutidas as técnicas de diagnóstico, com seus protocolos e respectivas interpretações.

A obra visa contribuir para o repasse de conhecimentos e informações sobre brucelose e tuberculose bovina, de forma consolidada, de fácil leitura e entendimento, para os diferentes atores envolvidos no PNCEBT, especialmente os médicos-veterinários e os estudantes de medicina veterinária.



Embrapa

Gado de Corte

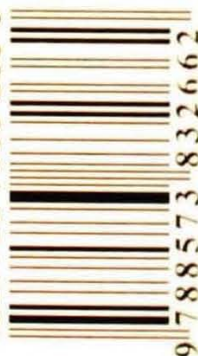
A diversidade de condições sanitárias entre os países do mundo globalizado lhes impõe, além da vocação para a produção de alimentos, a existência de condições satisfatórias de competitividade. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina – PNCEBT – não foge desse paradigma. A participação dos diversos atores que atuam nesse segmento da cadeia produtiva é sem dúvida o alicerce do Programa. Nesse propósito, faz-se necessária a transferência de conhecimentos teóricos e práticos, atualizados e suficientes ao bom desenvolvimento do PNCEBT.

A brucelose e a tuberculose bovina são doenças infecciosas de grande impacto para a cadeia da pecuária bovina no Brasil e no mundo, pois, além de determinarem sérios prejuízos diretos e indiretos ao sistema produtivo, constituem importantes zoonoses. Dessa forma, este livro foi estruturado em duas partes: uma contemplando a enfermidade **brucelose bovina** e a outra versando sobre a **tuberculose bovina**. Para cada enfermidade, é abordado um capítulo relativo aos aspectos de **epidemiologia e controle**, e outro capítulo tratando exclusivamente do **diagnóstico**.

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



ISBN 85-7383-266-5



CGPE 460