Adriana Pinheiro da Franca

**Estudo microbiológico e histopatológico da glândula
mamária de caprinos tuberculina positivo**

São Paulo
2010

ADRIANA PINHEIRO DA FRANCA

**Estudo microbiológico e histopatológico da glândula mamária de caprinos
tuberculina positivo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
19/2/10

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2247
FMVZ

Franca, Adriana Pinheiro da

**Estudo microbiológico e histopatológico da glândula mamária de caprinos
tuberculina positiva** / Adriana Pinheiro da Franca. -- 2010.

160 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e
Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. *Mycobacterium bovis*. 2. Caprinos. 3. Glândula mamária. 4. Tuberculose.
5. Zoonose. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo microbiológico e histopatológico de glândulas mamárias de caprinos tuberculina positiva", protocolado sob o nº1318/2008, utilizando 30 (trinta) cabras, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 23 de abril de 2008.

We certify that the Research "Microbiological and hystophatlogical study on mammary gland of positive tuberculin text in goats", utilizing 30 (thirty) goats, protocol number 1318/2008, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/23/08.

São Paulo, 23 de abril de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FRANCA, Adriana Pinheiro da

Título: Estudo microbiológico e histopatológico da glândula mamária de caprinos tuberculina positivo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico...

A DEUS, pela vida, por quando as forças acabaram me carregou em seus braços, guardando-me debaixo de suas asas onde permaneci segura. Permitindo-me que conquista-se este sonho.

Aos meus pais, Neide e José que me ensinaram que a maior riqueza de um homem é obtida por sua integridade de caráter e sua maior herança é a educação.

As minhas irmãs Andréa e Alesandra por todo apoio e amor que vocês me dão.

O maior bem dessa terra é poder viver em família, e sem dúvida somos a família bendita do Senhor aqui na terra. O presente que Deus me deu, vocês.

"Que toda honra, toda a glória seja dada a ti Deus."

Agradeço...

Ao Prof. Dr. Nilson Roberti Benites por ter acreditado em mim me dando essa oportunidade, pelo carinho, pelos sábios ensinamentos, por sua orientação, pela confiança e amizade.

À querida Dr^a Priscila Mellvile por todo o carinho, paciência e ensinamento ao longo dessa jornada, a quem admiro.

Ao Prof. Paulo César Maiorka pela paciência, carinho e conselhos para a realização dessa pesquisa, pela prontidão em sempre me ajudar.

À querida Dr^a. Eliana Roxo pelo acolhimento em seu laboratório, pelo carinho, pelos conselhos e por sempre me orientar tirando as dúvidas que ocorreram ao longo do trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Sônia Regina Pinheiro pelo auxílio na realização dessa pesquisa, pelo apoio.

Ao Dr. Silvio Arruda Vasconcellos pelo carinho.

Ao Dr. Paulo Eduardo Brandão pelo carinho.

Ao querido Mestre e amigo Dr. Mario Schuster, chefe da Inspetoria Regional de Pelotas, que me ensinou com muito carinho, paciência e apoio durante a minha formação acadêmica, acreditando sempre em minha capacidade, incetivando-me a sonhar e a correr atrás deles.

Ao Dr. Valmor Lansini, supervisor regional da CISPOA, pelas oportunidades de pesquisa e pelo carinho.

Ao querido Prof. Dr. Franklin Riet que através de seus ensinamentos, por sua postura profissional, me fez desejar estar aqui. Obrigada pela ajuda e carinho que o senhor tem comigo, mesmo de longe sempre me ajuda prontamente.

À querida Prof^a. Dr^a Cristina Gerhr Fernandes, da Universidade Federal de Pelotas, pela amizade, pelo carinho, orientação e aconselhamentos. Uma profissional a quem admiro sendo um exemplo para mim a ser seguido.

Ao querido Prof. Dr. Augusto Langeloh, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por acreditar em mim em minha capacidade, sempre torcendo e vibrando por minhas conquistas, um grande amigo a quem admiro.

Ao Prof. Dr. Luis Felipe D'amé Schu, da Universidade Federal de Pelotas, que plantou a semente da curiosidade científica me fazendo desejar ser uma pesquisadora.

A Zenáide e a Gisele, do laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da USP, pela paciência e carinho com quem sempre me trataram, pelos ensinamentos que permitiram a realização dessa pesquisa.

A todos os funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pelo carinho, paciência, pela prontidão em sempre me ajudar.

A todos os funcionários da biblioteca da USP Leste, pelo carinho, pelo acolhimento, incentivo e toda a ajuda prestrada para a conclusão deste trabalho

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pela torcida, pela boa convivência e amizade

Ao doutorando Caio Rogrigues dos Santos pelo carinho, pela ajuda, o meu muito obrigada.

As amigas Anna Maria Casagrande e a Isabela Ferreira Lopes que dividimos juntas para as nossa vidas a obtenção desse título.

A minha grande amiga Karla Patrícia Araújo, pela amizade sincera, por toda ajuda, apoi e incentivo, sempre acreditando em minha capacidade.

A amiga Flávia Carolina Oliveira, que mesmo longe esteve sempre presente na realização deste trabalho.

Aos amigos Marcos Vinícios e Lorena pela amizade, carinho, ajuda e torcida, muito obrigada pela força e incentivo.

A Fátima que foi um anjo que Deus colocou em meu caminho, que mesmo quando não acreditava mais que conseguiria fez-me prosseguir e crê que seria capaz.

A todos que aqueles que torceram e contribuíram para a realização deste sonho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela concessão da bolsa de Mestrado (Processo nº 08/51777-7).

RESUMO

FRANCA, A. P. **Estudo microbiológico e histopatológico da glândula mamária de caprinos tuberculina positivo**. [Microbiological and histopathological study on mammary gland of tuberculin test in goats]. 2010. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Até recentemente acreditava-se que a tuberculose em caprinos fosse uma enfermidade rara, o que levou ao errôneo conceito de que esses animais fossem resistentes ao *Mycobacterium bovis*. Este trabalho tem por objetivo verificar se houve processo inflamatório da glândula mamária devido a agentes de mastite ou à presença de *Mycobacterium*, comparar a frequência de isolamento pelo teste de Ziehl-Neelsen nas amostras de leite e dos fragmentos de glândula mamária de caprinos tuberculina positivo e verificar lesões encontradas na glândula mamária com frequência semelhante aos isolados pelo teste de Ziehl-Neelsen em caprinos tuberculina positivo. Os animais deste experimento foram provenientes de um surto de tuberculose em caprinos ocorrido numa propriedade localizada em Bueno Brandão (Minas Gerais), totalizando 68 animais. Os resultados encontrados foram obtidos através da análise dos testes de Tamis e California Mastitis Test em relação ao exame microbiológico tanto da glândula mamária quanto do leite. Através do isolamento bacteriológico obteve-se 64 (98,46%) amostras para *Staphylococcus* spp e apenas 1 (1,54%) para *Corynebacterium* spp. Na glândula mamária, dos seis isolamentos obtidos todos eram *Staphylococcus* spp. Com os resultados apresentados pelo isolamento microbiológico da glândula mamária concluiu-se que independente da espécie, o *Staphylococcus* spp é o agente de maior frequência entre os isolados sendo o maior responsável pela mastite intramamária em caprinos. Das 116 amostras de leite semeadas nos tubos de Stonebrink e Löwenstein-Jensen, foram isolados 5 (4,31%) de amostras de leite positivas ao teste de Ziehl-Neelsen. Dos 60 fragmentos de glândula mamária semeados nos meios de Stonebrink e Löwenstein-Jensen, isolou-se apenas um tubo no meio de Stonebrink, perfazendo uma frequência de 1 (1,66%) amostra de glândula mamária, o que é um indicativo que seja *M. bovis*, pois o meio de Stonebrink é um meio de eleição para o

seu crescimento, utilizado para isolar o *M. bovis*. Estes fragmentos de glândula mamária que foram submetidos à análise histopatológica pelas colorações de hematoxilina-eusina e Zielh-Neelsen, apresentaram lesões na glândula mamária de cabras tuberculina positivo, 7 (11, 66%) de achados de lesões causadas por *M. bovis* na glândula mamária, e 18 (30,00%) processos de reparo. Pela análise histológica dos fragmentos de glândula mamária todos apresentaram processo inflamatório na região intersticial da glândula, sendo um indício de mastite crônica. Concluiu-se que: o processo inflamatório da glândula mamária não estava associado à presença de *Staphylococcus ssp*, mas ao estágio de secagem dos animais, pelo resultados do teste de Zielh-Neelsen no leite e nos fragmentos de glândula mamária positivos, pode-se utilizar qualquer um dos métodos para verificar a frequência de isolamento de microrganismos em animais tuberculina positivo, a frequência de processo granulomatoso nas glândulas mamárias dos animais estudados foi semelhante estatisticamente, tanto a frequência do testes de Zielh-Neelsen no leite, quanto nos fragmentos de glândula, porém quando se considerou a frequência do processo de reparo comparada com a frequência do teste de Zielh-Neelsen no leite e no fragmento da glândula houve diferença significativa, portanto a frequência de processo na glândula mamária de animais tuberculina positivo é superior a frequência do teste de Zielh-Neelsen no leite e na glândula mamária.

Palavras-chave: *Mycobacterium bovis*. Caprinos. Glândula mamária. Tuberculose. Zoonose.

ABSTRACT

FRANCA, A. P. **Microbiological and histopathological study on mammary gland of tuberculin test in goats.** [Estudo microbiológico e histopatológico da glândula mamária de caprinos tuberculina positivo]. 2010. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Until recently it was believed that caprine tuberculosis was a rare infirmity leading to the wrong agreement that these animals were resistant to *Mycobacterium bovis*. This study aims to: verify if there was inflammatory process of the mammary gland caused by mastitis agents or the presence of *Mycobacterium*; compare the frequency of isolation by the Zielh-Neelsen's test in the milk samples and fragments of caprine mammary gland tuberculin positive, verify if the lesions found in the mammary gland present similar frequency to the ones isolated by the Zielh-Neelsen's test in tuberculin positive caprine. The animals used in this experiment came from an outbreak of tuberculosis in caprine that occurred in a property located at the city of Bueno Brandão (Minas Gerais), totalizing 68 animals affected. The results were obtained through the analysis of the Tamis and California Mastitis Tests in relation to the microbiologic exam of, both, mammary gland and milk. By the bacteriological isolation it was obtained 64 (98,46%) samples for *Staphylococcus ssp* and only 1 (1,54%) for *Corynebacterium sp*. Of the 64 (98,46%) identified milk samples, from the genus *Staphylococcus ssp*.. In the mammary gland, of the 6 isolations obtained all were *Staphylococcus ssp*.. With the results shown by the microbiological isolation of the mammary gland, it is possible to conclude that, independently of the species, the *Staphylococcus ssp* is the agent of greater frequency among those which were isolated, being the major responsible for the caprine intramammary mastitis. Of the 116 milk samples cultured in the Stonebrink and Löwenstein-Jensem tubes, were isolated 5 (4,31%) milk Zielh-Neelsen positive samples. Of 60 mammary gland fragmentes cultured, in total, in the Stonebrink and Löwenstein-Jensem media, it was isolated only 1 tube in the Stonebrink medium, accomplishing a frequency of 1 (1,66%) samples of mammary gland, which indicates that it was *M. bovis*. This conclusion was possible because the Stonebrink medium is a way of selection to its

growth, used to isolate the *M. bovis*. Of the 60 mammary gland fragments which were submitted to the histopathological analysis by the coloration of hematoxylin-eosin and Zielh-Neelsen and that showed mammary gland lesions of caprine tuberculin positive, 7 (11,66%) of the lesions were caused by *M. bovis* in the mammary gland, and 18 (30,00%) underwent repair process. By the histological analysis of the 60 mammary gland fragments, all presented inflammatory process in the interstitial region of the gland, which indicates cronic mastitis. Of 30 lung fragments, in total, sent to the histopathological diagnostic, it were submitted to hematoxylin-eosin (HE) and Zielh-Neelsen (ZN) colorations, 4 (13,33%) lesions typical tuberculosis lesions. From the results shown above, it is possible to conclude that: the inflammatory process of the mammary gland was not associated to the presence of *Staphylococcus ssp* (predominant microorganism of the positive culture) but in fact to the drying stage of the animals; from the results of the ZN test in the milk and positive mammary gland fragments, it is possible to use any of the methods to verify the isolation frequency of microorganism turberculin positive animals; the frequency of granulomatosus process in the mammary gland of the studied animals were statistically similar, in ZN tests frenquency in milk as much as the ZN tests' in the gland fragments, however when considering the frequency of repair with the frequency of the ZN tests in the milk and in the gland fragments there was significant differences, and so, the process frequency in the mammary gland of tuberculin positive animals is greater than the frequency of the ZN tests in the milk and in the mammary gland.

Keywords: *Mycobacterium bovis*. Caprine. Mammary gland. Tuberculosis. Zoonosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Constituição da parede celular do <i>Mycobacterium sp</i>	34
Figura 2 -	Aspecto morfológico do granuloma.....	45
Figura 3 -	Microbiológico das amostras de leite e dos fragmentos de glândula mamária.....	76
Figura 4 -	Necropsia de caprinos com tuberculose.....	82
Figura 5 -	Fotomicrografia de corte histológico do pulmão do animal 474....	83
Figura 6 -	Exame clínico e realização do teste de Tamis das cabras submetidas ao estudo.....	89
Figura 7 -	Necropsia da glândula mamária de caprinos tuberculina positiva.....	102
Figura 8 -	Fotomicrografia de corte histológico da glândula mamária do animal 474.....	101

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultados obtidos pelo exame clínico através da auscultação pulmonar dos 68 caprinos positivo.....	86
Gráfico 2 - Resultado do exame clínicos da glândula mamária obtidos pela palpação do parênquima mamário dos 68 animais positivos à tuberculina.....	87
Gráfico 3 - Resultado do teste de Tamis realizado nas 68 cabras tuberculina positivos.....	88
Gráfico 4 - Resultado da distribuição dos achados encontrados no teste CMT, dos 68 caprinos durante a realização desse exame.....	89
Gráfico 5 - Resultados que representam o total de glândulas mamárias (GM) que foram passíveis de isolamento mediante as que não foram passíveis a nenhum tipo de isolamento no diagnóstico microbiológico das amostras de leite.....	91
Gráfico 6 - Resultados do teste de Tamis comparados ao diagnóstico do exame bacteriológico em relação às amostras de leite que apresentaram cultura positiva e cultura negativa ao microbiológico do leite.....	95
Gráfico 7 - Resultados obtidos através da comparação entre o diagnóstico do CMT e o diagnóstico bacteriológico das amostras de leite que apresentaram crescimento bacteriano.....	96
Gráfico 8 - Resultados das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp identificadas distribuídas em <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (SCP) e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (SCN) análogas ao diagnóstico do CMT.....	97
Gráfico 9 - Resultados dos isolamentos de <i>Mycobacterium bovis</i> com crescimento nos tubos de Stonebrink que apresentaram-se positivos e negativos ao exame direto pela metodologia de Zielh-Neelsen.....	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Mycobactérias que são patogênicas ao homem e animais.....	34
Quadro 2 -	Ocorrência da tuberculose e frequência das principais micobactérias em humanos e em alguns animais domésticos.....	39
Quadro 3 -	Parâmetros analisados na auscultação pulmonar, o escore varia de 0 a 5 de acordo com a gravidade das manifestações respiratórias apresentadas.....	71
Quadro 4 -	Escore para os resultados clínicos encontrados no exame clínico da glândula mamária e leite.....	71
Quadro 5 -	Escore na análise do leite em fundo de caneca (TAMIS).....	72
Quadro 6 -	Escore para o teste CMT (Califórnia Mastitis Test).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultado das bactérias isoladas das amostras de leite do grupo de 60 animais.....	92
Tabela 2 -	Resultados do <i>Staphylococcus</i> spp isolados nas amostras de leite divididos em grupos de <i>Staphylococcus</i> coagulase Negativa (SCN) e <i>Staphylococcus</i> coagulase Positiva (SCP)	
Tabela 3 -	Comparação dos resultados dos 60 caprinos tuberculina positivo, entre os achados do testes Tamis e os achados do Bacteriológico das amostras de leite.....	93
Tabela 3 -	Comparação dos resultados dos caprinos tuberculina positivo, entre os achados do testes Tamis e os achados do bacteriológico das amostras de leite.....	94
Tabela 4 -	Análise estatística entre o teste de Tamis e o exame bacteriológico.....	94
Tabela 5 -	Análise estatística entre o CMT e o exame bacteriológico.....	96
Tabela 6 -	Resultados das bactérias isoladas comparadas ao crescimento bacteriológico das amostras dos fragmentos de glândula mamária e das amostras do leite pertencentes a animais em comum aos dois grupos que apresentaram crescimento no exame bacteriológico.....	99
Tabela 7 -	Análise estatística dos resultados de isolados do leite e da glândula mamária em relação ao teste de Zielh-Neelsen.....	101
Tabela 8 -	Análise estatística dos resultados histopatológicos com os resultados de microbiológicos da glândula mamária.....	104
Tabela 9 -	Análise estatística entre os achados histológicos da glândula mamária.....	105
Tabela 10 -	Resultado do exame clínico dos 68 caprinos positivos à tuberculina.....	150
Tabela 11 -	Resultados histopatológicas dos fragmentos de glândula mamária dos 30 animais submetidos à necropsia, positivos à tuberculina.....	154
Tabela 12 -	Resultados dos testes e exames realizados nas amostras de leite e fragmentos de glândula nos caprinos estudados.....	158

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
a.D.	Depois de Cristo
AIDS	acquired immune deficiency syndrome, Síndrome de imunodeficiência adquirida
CAE	Caprine Arthritis-Encephalitis
CPZ	Centro Panamericano de Zoonoses
CMT	California Mastitis Test
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BHI	Brain Heart Infusion
<i>C.pseudotuberculosis</i>	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
DNA	desoxi-ribonucleic acid, Ácido desoxi-ribonucléico
et al.	e colaboradores
FAO	Food and Alimentation Organization, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
H.E.	Hematoxilina-Eosina de Harris
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC	Linfadenite Caseosa
HOVET	Hospital Veterinário
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>
MAPA	Ministério da Agricultura e Abastecimento
MOTT	mycobacterias other than tubercle bacilli, micobactérias que não as do Complexo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M.avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M.tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OIE	Office International des Epizooties

OMU	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PCR	polimerase chainreaction, Reação de polimerase em cadeia
PNCEBT	Plano Nacional de Combate e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
PNSCO	Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos
PPD	purified protein derivative, Derivado protéico purificado
PRA	Análise da PCR por enzimas de restrição
SCN	Staphylococcus Coagulase Negativo
SCP	Staphylococcus Coagulase Positiva
<i>S. auriculares</i>	<i>Staphylococcus auriculaes</i>
<i>S. caprae</i>	<i>Staphylococcus caprae</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
<i>S. epidermides</i>	<i>Sataphylococcus epidermides</i>
<i>S. equorum</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>S. hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis subsp. hominis</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i>
<i>S. kloosii</i>	<i>Staphylococcus kloosii</i>
<i>S. lentis</i>	<i>Staphylococcus lentis</i>
<i>S. scheleiferi</i>	<i>Staphylococcus scheleiferi subsp. coagulans</i>
<i>S. xylosus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
<i>S. warneri</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>S.vitulus</i>	<i>Staphylococcus vitulus</i>
TCC	Teste cervical comparativo
UFC	Unidade formadora de colônia
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
VPT	Departamento de Patologia Animal

WHO	World Health Organization, Organização Mundial de Saúde
WTO	World Trade Organization, Organização Mundial de Comercio
ZN	Zielh-Neelsen

LISTA DE SÍMBOLOS

° C	Graus Celsius
G	Grama
MG	Miligramma
L	Litro
mL	Mililitro
Min	Minuto
Mm	Milímetro
%	Por cento
Ph	Potencial Hidrogeniônico
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	DEFINIÇÃO.....	29
2.2	HISTÓRICO DA DOENÇA.....	29
2.3	ASPECTO SÓCIO-ECONÔMICO.....	31
2.4	ETIOLOGIA.....	31
2.4.1	Agente etiológico e classificação.....	32
2.5	MORFOLOGIA.....	34
2.5.1	Parede Celular.....	35
2.5.2	Resistência Bacteriana.....	37
2.6	EPIDEMIOLOGIA.....	37
2.6.1	Distribuição Mundial e Brasil.....	42
2.6.2	Programa de Controle e Erradicação de Tuberculose.....	43
2.6.3	Patogenia.....	44
2.7	CAPRINOS.....	47
2.7.1	Origem dos Caprinos.....	47
2.7.2	Caprinocultura no Mundo e Brasil.....	47
2.7.3	Tuberculose em Caprinos.....	50
2.8	OUTRAS DOENÇAS DE IMPORTÂNCIA.....	53
2.8.1	Artrite-Encefalite Caprina (CAE).....	53
2.8.2	Linfoadenite Caseosa (L.C).....	54
2.8.3	Mastite Caprina.....	55
2.8.4	Mastite causada por <i>Mycobacterium bovis</i>.....	57

2.9	DIAGNÓSTICO.....	58
2.9.1	Diagnóstico Clínico.....	58
2.9.2	Diagnóstico <i>post mortem</i>.....	58
2.9.3	Diagnóstico Histológico.....	59
2.9.4	Diagnóstico Imunológico.....	60
2.9.4.1	<i>Tuberculinização</i>.....	61
2.9.4.2	<i>Interferon-Gama (IFN-γ)</i>.....	62
2.9.4.3	<i>Elisa</i>.....	62
2.9.5	<i>Diagnóstico Bacteriológico</i>.....	65
2.9.6	<i>Diagnóstico Molecular</i>.....	66
3	OBJETIVOS	67
4	MATERIAL E MÉTODO.....	69
4.1	MATERIAIS DE CAMPO.....	69
4.2	PROCEDÊNCIA E EXAME CLÍNICO.....	70
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS.....	72
4.3.1	<i>Leite</i>.....	72
4.3.2	<i>Glândulas Mamárias</i>.....	73
4.4	EXAMES MICROBIOLÓGICOS DAS AMOSTRAS DE LEITE.....	74
4.5	EXAMES MICROBIOLÓGICO DOS FRAGMENTOS DE GLÂNDULA MAMÁRIA.....	75
4.6	ISOLAMENTO DE <i>MYCOBACTERIUM SP</i> DO PARÊNQUIMA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	78
4.7	ISOLAMENTO DE <i>MYCOBACTERIUM SP</i> DAS AMOSTRAS DE LEITE.....	79
4.8	EXAMES HISTOPATOLÓGICOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	80
4.9	IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS.....	81
4.9.1	<i>Obtenção do DNA</i>.....	81
4.9.2	<i>PCR Restriction Enzyme Pattern Anaysis (PRA)</i>.....	81

4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	82
5	RESULTADOS	85
5.1	EXAME CLÍNICO.....	85
5.2	EXAME MICROBIOLÓGICO DAS AMOSTRAS.....	90
5.3	COMPARAÇÃO DO TESTE DE TAMIS E DO MICROBIOLÓGICO DAS AMOSTRAS DE LEITE.....	93
5.4	COMPARAÇÃO ENTRE OS ACHADOS DO TESTE CMT E MICROBIOLÓGICO DO LEITE.....	95
5.5	MICROBIOLÓGICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	98
5.6	ISOLAMENTO DE <i>MYCOBACTERIUM SP</i> DAS AMOSTRAS DE LEITE.....	99
5.7	ISOLAMENTO DE <i>MYCOBACTERIUM SP</i> DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	100
5.8	RESULTADOS PATOLÓGICOS.....	101
5.8.1	Anatomopatológico da Glândula Mamária.....	101
5.8.2	Histopatológico.....	102
5.8.2.1	<i>Estudos entre o Processo Inflamatório Crônico e o Processo de Reparo dos Achados Histopatológico da Glândula Mamária.....</i>	104
5.8.2.2	<i>Estudos entre os Resultados Histilógicos e os Resultados do teste de Zielh-Neelsen das Amostras de Leite edos Fragmetos de Glândula Mamária.....</i>	106
6	DISCUSSÃO.....	107
6.1	MASTITES CAUSADAS POR STAPHYLOCOCCUS SSP E OUTRAS BACTÉRIAS.....	107
6.1.1	Cultura microbiológica do leite e dos fragmentos de glândula mamária.....	107
6.1.2	Mastites causadas por <i>Mycobacterim sp</i>.....	113
6.2	ESTUDOS ENTRE AS FREQUÊNCIAS DE ISOALMENTO DE <i>MYCOBACTERIUM</i> DO LEITE E DA GLÂNDULA MAMÁRIA COM O TESTE DE ZIELH-NEELSEN (ZN).....	117
6.3	ESTUDOS DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS COM OS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	119

6.4	ESTUDOS ENTRE OS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS CRÔNICOS E O PROCESSO DE REPARO DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA	119
6.5	ESTUDOS ENTRE OS RESULTADOS HISTOLÓGICOS E OS RESULTADOS DO TESTE DE ZIELH-NEELSEN NAS AMOSTRAS DE LEITE E DOS FRAGMENTOS DE GLÂNDULA MAMÁRIA.....	120
7	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	122
	APÊNDICES.....	150

1 INTRODUÇÃO

As zoonoses são enfermidades que representam uma ameaça importante para a saúde humana e animal em todo mundo. São naturalmente transmissíveis entre os animais vertebrados e o homem (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1967). Apesar da adoção de medidas que controlam as enfermidades e da ampla cobertura dos serviços de saúde, estas zoonoses continuam registrando elevadas taxas de ocorrência nas zonas rurais e urbanas em diversos países. São prevalentes em numerosas espécies animais das quais o homem se alimenta.

As zoonoses podem apresentar um grande impacto econômico em países onde a exportação assegura a estabilidade econômica, na qual depende diretamente na confiabilidade de alimentos livres das enfermidades. Desse modo, as enfermidades zoonóticas, apresentam estreita relação entre a saúde pública, ambiente e o bem estar sócio-econômico (ACHA; SZYFRES, 1984). A tuberculose é uma dessas zoonoses, destacando-se como uma enfermidade de distribuição mundial, cuja ocorrência sofre variação por região e país, sendo considerada uma antroponose e também uma zoonose.

Em todo o mundo a tuberculose é tida como a principal causa de morte provocada por um único agente, tem sido considerada como um flagelo da humanidade. A cada segundo, uma nova pessoa é infectada por esse agente. Estima-se que um terço da população mundial albergue o bacilo de Koch, e que de 5 a 10% desses indivíduos irão desenvolver a doença ou se tornar infectantes em algum momento de suas vidas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Alguns fatores estão modificando a epidemiologia dessa enfermidade no homem, entre os quais deve-se destacar a epidemia da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), que se fez notar mundialmente no aumento do número de casos da tuberculose ativa; e o aparecimento de cepas multidroga-resistentes, devido a tratamentos inadequados ou incompletos. Atualmente o principal receio desta doença é a possibilidade dela se tornar incurável devido ao aparecimento de cepas resistentes às drogas antituberculosas (FESTENSTEIN; GRANGE, 1991; DARBORN; GRANGE, 1993; COLLINS, 1994; FONTAINE, 1994; ZACARIAS et al., 1994; BRASIL, 1995; ZAKI; HIBBERD, 1996; ABRAHÃO, 1998).

Introdução

Em muitos países em desenvolvimento, a tuberculose emergiu como a doença oportunista mais comum associada à infecção pelo Humam Immunodeficiency Virus (HIV). A maioria dos casos de tuberculose em infectados pelo HIV são causados pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), mas casos de infecção por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e infecção com cepa Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), também tem sido descrito (COTTER et al., 1996; SCHULTSZ et al., 1996).

A tuberculose ficou esquecida pela comunidade técnico-científica durante décadas, e após três décadas de declínio dessa enfermidade a Organização Mundial de Saúde (OMS) registrou um aumento no número de casos notificados seguido de um significativo aumento dessa doença, em 1989 (LIMA, 1995; SANTOS, 1995). Em 1993 a OMS declarou essa enfermidade como questão de urgência à saúde global, por ser um agente infeccioso responsável pelo maior índice de mortalidade humana, representando 26% de mortes previsíveis e 7% de todas as mortes da terra. As estimativas futuras para essa enfermidade não são nada favoráveis, sendo extremamente preocupantes, pois estima-se que para os anos de 2000 à 2020 aproximadamente um bilhão de pessoas estarão infectados por essa doença. Dentre essas, caso o controle não seja eficiente e rigoroso, 200 milhões adoecerão e 35 milhões irão a óbito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994, 2002).

Na sua essência a tuberculose é considerada uma "epidemia lenta", ressurgindo nos dias de hoje como uma "emergência global", apesar da evolução do conhecimento na área da saúde pública e dos novos métodos de diagnósticos (PAULA, 1998).

A taxa de infecção por tuberculose no mundo é 3%, destacando-se que os índices mais alarmantes são encontrados nos países em desenvolvimento, sendo que as perdas econômicas e sociais geradas por essa bactéria são imensuráveis. Ainda hoje mesmo com tanta informação dos problemas e conseqüências trazidos por essa zoonose, há o abate clandestino de animais tuberculosos e a comercialização clandestina do leite, que são práticas comuns de várias regiões do Brasil (ANDRADE; SANTIAGO; ANDRADE, 1972; FONSECA, 1982; ANTENORE, 1998a,b,c; ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005).

Introdução

Cabe aqui salientar que a tuberculose causada por *M. bovis* é clinicamente indistinguível da tuberculose causada por *M. tuberculosis* e a metodologia do escarro, método empregado usualmente no Brasil para o diagnóstico da doença, é ineficaz para distinguir o bacilo humano do bacilo bovino. Essa discriminação só se torna possível pelo emprego de meios de cultivos específicos, como o meio de Stonebrink (isento de glicerol que é tóxico para o *M. bovis*) com a finalidade de se distinguir verdadeiramente um bacilo do outro (LATINI et al., 1990; KANTOR; RITACCO, 1994; USABIAGA, 2001).

O *M. bovis* é naturalmente resistente a pirazinamida, droga utilizada no tratamento da tuberculose humana, o que justifica a diferenciação destas espécies em determinados casos, principalmente quando houver evidência epidemiológica que justifique a suspeita, ou quando houver falha na resposta ao tratamento com esquemas que incluem pirazinamida.

Destacando-se o crescente consumo dos produtos oriundos dos caprinos com destaque a produção leiteira, pois a cabra como animal leiteiro continua ocupando um espaço importante no mundo moderno, inclusive em países com a bovinocultura leiteira bem desenvolvida, pelas vantagens que a espécie apresenta no tocante à sua grande eficiência de produção aliada ao valor nutricional do seu leite sendo indicado como alimento para crianças, velhos enfermos, pessoas alérgicas ao leite de vaca e para a fabricação de produtos destinados ao consumidor com maior poder aquisitivo (ZACHARIAS, 2001). E também, por causa da facilidade de criação devido a rusticidade apresentada por esses animais, conseguindo produzir em regiões que a espécie bovina seria incapaz de se obter algum lucro associada a sua docilidade e a facilidade de manejo, a caprinocultura é um setor que encontra-se em plena expansão em todo mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2004).

Sabendo-se da importância do leite, e seus derivados, como a principal fonte de transmissão do *M. bovis* ao homem e da viabilidade da caprinocultura leiteira vir a transmitir esse agente à população, negar a existência deste elo da cadeia epidemiológica é um problema cujas dimensões são incalculáveis.

Mediante a complexidade do tema abordado, levando em consideração a declaração feita pela OMS em 1993, que colocou a tuberculose no “estado de emergência” em todo mundo e a preocupação desta instituição em relação à considerável e contínua importância, em saúde pública, da infecção pelo *M. bovis*

Introdução

que possui uma ampla cadeia de hospedeiros, o que facilita sua proliferação as espécies suscetíveis. Além das medidas tomadas para o controle e erradicação dessa zoonose em bovinos, se faz necessário à extensão e inclusão dos caprinos neste programa, pois diante das pesquisas até o momento realizadas, se conseguiu provar que estes animais também são suscetíveis ao agente, o que erroneamente foi negado por muitos anos, como é relatado na própria literatura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

Buscando maiores conhecimentos com a finalidade de evitar que tão importante zoonose passe despercebida, quanto a sua transmissão ao homem pela espécie caprina, essa pesquisa tem por objetivo isolar e tipificar o *Mycobacterium bovis* do leite e da glândula mamária de cabras tuberculina positiva, na tentativa de evitar que a tuberculose continue se propagando entre as espécies, e alertar as autoridades sobre a existência dessa doença na espécie em estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEFINIÇÃO

A tuberculose bovina é uma entidade nosológica infecto-contagiosa de evolução crônica e desenvolvimento de lesões granulomatosas características. O agente etiológico é o *Mycobacterium bovis*, que forma junto, a outras micobacterias o complexo *Mycobacterium tuberculosis* dos mamíferos acometendo especialmente o sistema respiratório dos hospedeiros infectados. O fato desta doença afetar além dos bovinos, diversas espécies animais, tanto domésticas como silvestres a transforma em um importante problema; suscitando riscos à saúde pública face ao seu aspecto zoonótico (GRANGE; YATES, 1994; ACHA; SZYFRES, 2001; COLLINS, 2001).

2.2 HISTÓRICO DA DOENÇA

A tuberculose é uma enfermidade que acompanha o homem e os animais desde os seus primórdios. Há evidências de tuberculose humana durante o período neolítico (7.000 a 6.000 a.C.) quando o homem deixou de ser nômade passando a praticar rudimentos de agricultura e a domesticar o gado bovino. Na dinastia de Ramsés II (3.700 a.C.) foram encontradas múmias com vestígios de tuberculose e a primeira descrição da doença foi feita na Grécia antiga por Hipócrates (460-377 a.C.); na Índia o médico Susruta (500 a.C.) também a mencionou em seus escritos (CORRÊA; CORRÊA, 2002; PORTER; MCADAM, 1994). Hipócrates mencionou uma doença pulmonar, cujo curso era semelhante à tuberculose pulmonar. Aristóteles afirmou que a tuberculose era uma doença contagiosa, e que tinha uma grande incidência no povo grego (CORRÊA; CORRÊA, 1983).

Achados de tuberculose óssea foi verificado em ossos humano de múmias do templo de Ramsés (3.000 a.C) e em lesões ósseas de humanos pré-históricos na

Alemanha (8.000 a.C). Em animais a presença de tuberculose óssea foi encontrada em um fóssil de búfalo americano (*Bison bison*), que viveu a mais de 17.000 mil anos, sendo confirmada pela técnica de DNA (ácido desoxiribonucléico) (ROTHSCHILD et al., 2001).

Durante a Revolução Industrial, a tuberculose foi denominada de “peste branca” por ter alcançado proporções epidêmicas, e por ter matado mais de um bilhão de pessoas nos últimos 200 anos (COLLINS, 1994; CALERO, 1995).

Em 1671 Francis Sylvius encontrou lesões pulmonares em humanos que foi descrita por ele como “tubercles” Villemin, em 1865, reconheceu a tuberculose como agente infeccioso em animais e a sua transmissibilidade de humanos para os animais, a partir de material humano inoculado em coelho. Mas foi Robert Koch, que em 1882, descreveu o agente causal através de seus recursos tintoriais, corando-o pela fucsina-anilina, e em 1884 pelo seu isolamento em meio de cultivo apropriado. Koch denominou o agente causador da tuberculose de “tubérculo bacilo”. A diferenciação entre os bacilos causadores da tuberculose do homem e dos animais foi estabelecida por Rivolta em 1889, e entre o bacilo humano e bovino por Smith em 1897 (GRIFFITH et al., 1930; PRITCHARD, 1988).

Em 1902 MacFadyean, declarou que a causa de tuberculose intestinal em crianças escocesas era devido à ingestão de leite de vacas tuberculosas, mas foi Ravel que primeiramente comprovou a transmissibilidade da tuberculose bovina ao homem através da ingestão de leite cru, no mesmo ano, isolando de cultura pura os bacilos dos gânglios mesentéricos de uma criança afetada por meningite tuberculosa no Hospital Infantil da Filadélfia. Os bacilos foram inoculados em três bovinos que vieram a óbito em 30 dias, provando definitivamente que a transmissão por via digestiva do bovino ao homem, era verdadeira (DANKNER et al., 1993; FERREIRA NETO; BERNARDINE, 1997; ABRAHÃO, 1998; SOUZA et al., 1999).

Behring, em 1903, defendeu a tese de que a doença poderia ser adquirida na infância e só manifestar-se na fase adulta, sendo o leite a principal fonte de transmissão bacteriana (FELDMAN, 1955; ABRAHÃO, 1998).

A conclusão definitiva que o bovino tuberculoso representava um risco a saúde pública e que medidas deveriam ser tomadas só ocorreram em 1911, já que os dados da doença em animais eram alarmantes (PRITCHARD, 1988).

No Brasil, em 1938, o *Mycobacterium bovis* foi isolado de lesões de humanas por Torres e Pacheco, sendo a primeira publicação nacional na literatura médica sobre o agente (SOUZA et al., 1999).

2.3 ASPECTO SÓCIO-ECONÔMICO

Em países desenvolvidos, estima-se que as perdas econômicas decorrentes da tuberculose alcancem 10,0% da produtividade do gado de leite afetado (KANTOR, 1988). Estima-se que um animal tuberculoso perca de 10 a 25% de sua capacidade produtiva, o que traz prejuízos à atividade pecuária e ainda passa a ser um foco da doença para outros animais e o homem (COSIVI et al., 1998).

As perdas econômicas causadas pela tuberculose estão relacionadas principalmente à baixa produtividade e à condenação de carcaças em matadouros. Deve-se salientar além das perdas por condenação total ou parcial das carcaças, os custos adicionais do processamento dos animais tuberculosos são de aproximadamente 8,5% do valor do animal. As perdas percentuais estimadas em vacas eliminadas com tuberculose e novilhos de corte são de 10 a 15%. Economicamente esses índices são elevados, mas os efeitos tornam-se mais graves se contabilizados as perdas indiretas relacionadas aos custos adicionais à saúde pública e pelas perdas de mercados potenciais pela rejeição comercial, este fato acarreta a perda da credibilidade e competitividade do produto (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972). A presença da doença no rebanho torna o produto final, vulnerável as barreiras sanitárias, imposta pelo mercado internacional. Devido aos fatores supracitados, os prejuízos a pecuária mundial, em função da tuberculose, são de aproximadamente três bilhões de dólares por ano (LAGE et al., 1998; GARNIER et al., 2003).

2.4 ETIOLOGIA

2.4.1 Agente etiológico e classificação

O *Mycobacterium bovis* encontra-se agrupado num complexo denominado de Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Os membros desse complexo são extremamente semelhantes, tendo similaridade de 99,9 % no nível de nucleotídeos e nas seqüências identificadas do rRNA 16S (BROSH et al., 2002; GARNIER et al., 2003).

Pertence à ordem dos *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*, espécie *tuberculosis*. O gênero *Mycobacterium* engloba cerca de 127 espécies, entre as quais pelo menos 22 podem causar doença no homem, e 11 subespécies. É uma bactéria fracamente gram-positiva, álcool-ácido resistente (BAAR), imóvel, baciliforme, aeróbia estrita, com ausência de cápsula ou flagelo e não esporulada (KRIEG; HOLT, 1994; EUZÉBY, 1998).

As principais espécies de micobactérias com importância epidemiológica estão incluídas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* que inclui o *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* (ainda não isolada no Brasil, mas isolado de humanos na África equatorial), *Mycobacterium microti* (patogênica apenas para ratazana – *Microtis agrestis*), *Mycobacterium canettii* (não patogênico para o homem), os dois últimos introduzidos no grupo devido à similaridade genética (BIER, 1992; CORNER, 1994; GRANGE, 1996; ABRAHÃO, 1998; BROSH et al., 2002; ZINK, NERLICH, 2004). Podem ser incluídas ainda nesse complexo as cepas *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium caprae*, agente etiológico de tuberculose em caprinos (ARANAZ et al., 2003), e *Mycobacterium pinnipedii*, que causa tuberculose em leões marinhos, mas que também pode infectar o homem (COUSINS et al., 2003) (Quadro 1).

As espécies de micobactérias altamente patogênicas são parasitas facultativas ou obrigatoriamente intracelulares, entretanto, muitas micobactérias saprófitas também agem como patógenos oportunistas. As espécies potencialmente patogênicas, largamente disseminadas na natureza (no solo, água, aves, animais domésticos e silvestres), já receberam nomenclaturas distintas, como “atípicas”, “anônimas”, “não classificadas”, “não tuberculosas”, “oportunistas” e atualmente denominadas de “MOTT” - *Mycobacteria Other Than Tuberculosis* (CENTRO

Revisão de Literatura

PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979; WOLINSKY, 1979; ROSEMBERG, 1983; YATES, 1984; PRITCHARD, 1988; DARBORN; GRANGE, 1993; HADAD, 1994; KRIEG; HOLT, 1994; ROXO, 1996a; ABRAHÃO, 1998). Estão incluídas em complexos diversos como: *M. avium* (*M. intracellulare*, *M. avium* subespécie *avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis* e *M. avium* subespécie *syvaticum*), MAIS (*M. scrofulaceum*, *M. avium* e *M. intracellulare*), *M. bovis* (*M. bovis*, Bacilo de Calmette-Guerin – BCG e *M. africanum*) e *M. terrae* (*M. terreae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale*), deve-se ressaltar que essas denominações e agrupamentos ainda não apresentam unanimidade científica (KANTOR, 1979; VASCONCELLOS, 1979; PRITCHARD, 1988; KRIEG; HOLT, 1994; HAAGSMA, 1995; FAALKINHAM III, 1996; PEDELEY et al., 2004).

Outro grupo de micobactérias genotipicamente diferente do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, forma o complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) o qual inclui duas espécies *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*. Dentro do complexo MAC o *M. avium* é subdividido em quatro subespécies que são: *Mycobactérium ssp avium*, *Mycobactérium ssp paratuberculosis*, *Mycobactérium ssp silvaticum* e recentemente *Mycobactérium ssp hominissuis*. As bactérias do complexo MAC são responsáveis por causarem reação cruzada ao teste de hipersensibilidade a derivados protéicos purificados, em bovinos (DVORSKA et al., 2004).

O *M. avium ssp avium* é o agente da tuberculose em várias espécies de aves e associado a quadros de linfadenite granulomatosa em suínos. O *M. avium ssp paratuberculosis* é causador da Doença de Johne em pequenos ruminantes e foi encontrado em tecido de humanos com doença de Crohn (DVORSAKA et al., 2004; BIET et al., 2005).

As micobacterioses com potencial patogênico que têm causado doenças, que não a tuberculose, no homem e nos animais são conhecidas como saprófitas ou "atípicas"; fazendo parte do complexo micobactérias outras que não causadoras de tuberculose (*mycobacterium other than tuberculosis*-MOTT) incluindo-se entre elas, o *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. smegmatis* e *M. chelonae*, sendo causadores de infecções e quadros mórbidos (THOEN; KARLSON; HIMES, 1981; LAGE et al., 1998).

Espécies de <i>Mycobacterium</i>	Hospedeiro	Especies infectadas ocasionalmente	Doença
<i>M. tuberculosis</i>	Home, captive Primatas	Cães, gado, psitacídeos Pássaros, canários	Tuberculose (em todo mundo)
<i>M. bovis</i>	Gado	Veado Texugo Gambá Gatos Outras espécies de mamíferos	Tuberculosisi
<i>M. africanum</i>	Homem		Tuberculose (regiões da África)
<i>M. avium complex</i> ^a	Muitas espécies de aves exceto psitacidios	Suínos Cães	Tuberculose
<i>M. microtri</i>	Ratazanas	Ocasionalmente outras espécies de mamíferos	Tuberculose
<i>M. marinum</i>	Peixes	Homem, mamíferos aquáticos Anfíbios	Tuberculose
<i>M. leprae</i>	Homem	Tatu, chipanzés	Leprose
<i>M. lepraemurium</i>	Ratos Camundongos	Gatos	Lepra de ratos Lepra felina
<i>M. avium ssp</i>	Bovinos, ovinos Caprinos, Veados	Outros ruminates	
<i>Bacteria</i> *Álcool ácido não específico	Bovinos	-	Associado com tuberculose da pele
<i>M. senegalense</i> <i>M. farcino-genes</i>	Bovinos	-	

*Bovinos infectados com essa micobacteria geralmente exibem sensibilidade para tuberculina.
(Fonte: QUINN et al., 2002)

Quadro 1 - Mycobactérias que são patogênicas ao homem e animais

2.5 MORFOLOGIA

Os bacilos do *M. bovis* morfologicamente são curtos, intracelulares facultativos, microaerófilo, imóveis, não esporulados, não flagelados, não capsulados e não produtores de toxina. São álcool-ácido resistente (BAAR), devido a capacidade de formar complexos com os derivados trifenilmetano, resistindo assim a ação do álcool-ácido. Apresentam a forma de bastonetes retos, encurvados ou

ainda ramificados medindo de 0,3 a 0,6 micrômetros (μm) de largura por 1,0 a 4,0 μm de comprimento. Estas propriedades encontradas no *M. bovis* são propriedades que estão associadas a outros gêneros como *Nocardia*, *Rhodococcus*, e *Corynebacterium* (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988b; CORNER, 1994; LAGE et al., 1998).

Tem crescimento ótimo a uma temperatura de 37° C. Não cresce a 25° C. Não reduz o nitrato. É resistente a pirazinamida. Não reduz a niacina e é sensível a hidrazida. É destruído pela luz solar, mas bastante resistente a dissecação, ao ácido e ao básico.

2.5.1 Parede Celular

Fonte: < www.unirio.br/dmp/.../Micobacterioses >

Figura 1 – Constituição da parede celular do *Mycobacterium* sp

A parede celular é formada da parte interna, adjacente ao citosol, para o meio externo, pela membrana citoplasmática (Figura 1), seguida por uma camada intermediária de peptidoglicano, como o glucolil-murâmico que encontra-se ligado ao arabinogalactano esterificados na sua extremidade com ácido micólico, formando um complexo correspondente a parte externa da parede bacteriana denominada de complexo micolilarabinogalactano. Esse complexo atua como uma camada protetora impermeabilizando a superfície do agente tornando a bactéria altamente resistente a

compostos hidrofílicos e à dessecação, dificultando também a captação de nutrientes fato que retarda o crescimento bacteriano (COLLINS, 1994; LAGE et al., 1998; NEILL; BYRSON; HANNA, 2001).

Os lipídeos da parede celular correspondendo a cerca de 20 a 40% de seu peso seco total. Esse alto conteúdo de lipídeos dificulta a coloração das células micobacterianas pelas técnicas convencionais da coloração de Gram. Possuem alta resistência à descoloração com 95% de etanol e 3% de ácido clorídrico, sendo por estes motivos denominados de bacilos álcool-ácido resistentes. Os ácidos micólicos são os lipídeos responsáveis por esta resistência dos bacilos. Tal propriedade é observada em métodos de coloração como a de Kinyoun e a de Ziehl-Neelsen e suas modificações por Faraco e Wade (BEHMER; TALOSA; FREITAS, 1976; BORSUK, 2004).

Existem alguns fatores de patogenicidade dessa bactéria que garantem sua sobrevivência quando essa está dentro do organismo do hospedeiro, o que dificulta sua destruição pelo sistema imunológico do ser infectado, relacionados a seguir.

A superfície lipídica da parede bacteriana que aumenta a sua capacidade patogênica, tornando-a também resistente a vários agentes físicos e químicos

Os glicolipídeos ou micosídeos do complexo micolilarabinogalactano, como a lipoarabinomana, que são responsáveis pela toxicidade, pelo estímulo à resposta inflamatória granulomatosa e pela resistência das micobactérias fagocitadas, atuando ainda na permeabilidade celular e na resistência as substâncias desinfetantes.

O fator corda ou 6,6' dimicolato de trealose que é responsável pelo crescimento da bactéria e por sua virulência, os sulfolipídeos da trealose que estão localizados na periferia da parede celular, também atuam no fator de virulência. Todos os lipídeos citados anteriormente corroboram como fator de resistência do bacilo a função enzimática dos macrófagos, atuando na inibição da fusão do fagossomo com o lisossomo, o que explica o êxito parcial desta bactéria no meio intracelular. Existem ainda outros mecanismos bioquímicos e moleculares que atuam na inibição do fago-lisossomo (COLLINS, 1994; POLLOCK; NEILL, 2002). Há ainda as tubérculos proteínas que induzem a hipersensibilidade do tipo IV, contribuindo desta forma para a morte celular. Os fatores relacionados anteriormente são principais fatores patogênicos do *M. bovis* (RIET-CORREA et al., 2001).

2.5.2 Resistência Bacteriana

As micobactérias apresentam elevada capacidade de sobrevivência às mais variadas condições ambientais. Segundo a World Health Organization (1984) estas podem permanecer viáveis por até dois anos em instalações, um ano, na água e no esterco e até 10 meses em produtos de origem animal contaminados. O *M. bovis* é extremamente resistente ao meio ambiente, mantendo-se viável em condições de umidade, temperatura e ao abrigo de luz solar. Resistem bem as baixas temperaturas e ao pH ácido. É extremamente resistente ao meio ambiente, sendo que em fezes e material orgânico em decomposição sua sobrevivência é de seis meses a um ano (ABRAHÃO, 1998).

Nas instalações como sala de ordenha, estábulo e cocho, podem sobreviver por até dois anos ou mais (ABRAHÃO, 1998). São sensíveis a luz solar direta devido à ação dos raios ultravioleta, e a agentes desinfetantes como fenóis a 5% por três horas, formol a 3%, hipoclorito de sódio a 5%, e glutaraldeído a 2%. Deve-se salientar que a ação dos desinfetantes é dependente dos seguintes fatores: da concentração do produto, do tempo de exposição, da temperatura e da presença de matéria orgânica. Os compostos de amônia quaternária e clohexidine não destroem o bacilo (CARTER, 1988; ABRAHÃO, 1998; MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994).

O calor úmido a 60 ° C mata o bacilo rapidamente. A pasteurização, realizada no tratamento do leite a 62,8 - 65,6 °C por 30 min ou 71,7°C por 15 segundos mata além das micobactérias, a maioria dos microrganismos não-esporulados (ROXO 1997).

2.6 EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose é uma zoonose de distribuição mundial, cuja ocorrência sofre variação por região e país. É uma enfermidade que determina prejuízos à pecuária e riscos à saúde da população humana que consome produtos de origem animal. (LILENBAUM, 2000), tendo sua maior prevalência nos países em desenvolvimento e

Revisão de Literatura

baixa nos países desenvolvidos, devido a programas de controle e erradicação, de inspeção de carnes e de leite pasteurizado. (GRANGE; COLLINS, 1987; PRITCHARD, 1988; MOTA; NAKAJIMA, 1992; ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005).

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica e efeito debilitante causada pelo *Mycobacterium bovis*, sendo também um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), fazendo parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, cujo hospedeiro primário é o bovino. Entretanto, diversas espécies de silvestres e mamíferos, incluindo o homem, são também suscetíveis ao bacilo bovino (GRIFFITH, 1928; ALHAJI, 1976; CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES, 1988a, b; ANDRADE et al., 1991; MOTA; NAKAJIMA, 1992; FLAMAND et al., 1994) (Tabela 1).

O *Mycobacterium bovis* possui uma das maiores cadeias de hospedeiros entre todos os patógenos existentes, com um complexo padrão epidemiológico, que envolve interações da infecção entre: seres humanos, animais domésticos e animais silvestres (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994). Existem muitos reservatórios animais do *M. bovis* no mundo, mas atualmente deve-se considerar como principais reservatórios os texugos, gambás, os cervos (LEPPER; CORNER, 1983; LANGENERGGER; LANGENERGGER, 1985; YATES, 1984; CHEESEMAN; WILESMITH; STUART, 1989; HARDIE; WATSON., 1992; BARLOW, 1994; GOODGER et al., 1994; GRIFFIN; BUCHAN, 1994; NEILL et al., 1994; NOLAN; WIKLEESMITH, 1994; TWEDDLE; LIVINGSTONE, 1994; MODA et al., 1996).

Deve-se salientar que algumas espécies comportam-se como hospedeiros terminais e desenvolvem apenas uma doença auto-limitante. Em países como Grã Bretanha, Irlanda, Nova Zelandia, Zambia e Estados Unidos (O'REILLY; DARBORN, 1995; PALMER; WATERS; WHIPPLE, 2002).

Espécie	Ocorrência	<i>M. bovis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>
Humano	Comum	++	+++	+
Bovino	Comum	+++	+	++
Suíno	Comum	+++	++	+++
Ovino	Rara	+++	-	++
Caprino	Rara	+++	-	++
Cães	Rara	++	+++	+
Gatos	Rara	+++	++	+
Equinos	Rara	+++	+	+

Legenda: (+++)= agente mais comum, (++) agente menos comum, (+) agente raro, (-) agente não observado.

(Fonte: CORRÊA; CORRÊA, 1992)

Quadro 2 - Ocorrência da tuberculose e frequência das principais micobactérias em humanos e em alguns animais domésticos

O *Mycobacterium bovis* tem sido considerado agente causador de infecção em caprinos, ovinos, suínos, animais de vida selvagem (LUKE, 1958; THOEN, 1988; BERNABÉ et al., 1991; MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994).

Segundo Blood e Henderson (1978), todas as espécies e grupos etários são suscetíveis ao *M. bovis*, porém os bovinos, caprinos e suínos são menos resistentes e entre os bovinos os zebuínos são mais resistentes. Em condições naturais o *M. bovis* produz enfermidade no bovino, homem e suíno, e só ocasionalmente em eqüinos, cães, gatos e ovelhas (PEREIRA, 1980) (Quadro 2).

O gado leiteiro apresenta maior suscetibilidade à tuberculose bovina. As principais causas dessa suscetibilidade maior são: o stress e a manutenção de animais de maior idade para a produção láctea, tal fato não ocorre no gado de corte, que se mantém por menos tempo em criação extensiva, sendo menor o contato entre animais e homens (COMISION NACIONAL DE ZOONOSIS, 1982).

Em humanos, as crianças são consideradas mais suscetíveis ao *M. bovis* quando consomem leite *in natura* provenientes de vacas tuberculosas, mesmo quando infectadas por um pequeno número de bacilos (MODA et al., 1996). Os adultos expostos ocupacionalmente ao bovino tuberculoso, são mais suscetíveis ao *M. bovis*, infectam-se pela via aerógena ou pelo consumo de leite cru ou produtos lácteos oriundos de leite não pasteurizado (LESSLIE; MAGNUS; STEWART, 1972; CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973; ROSEMBERG, 1983; DALOVISIO; STETTER; MIKOTA-WELLS, 1992; HARDIE; WATSON, 1992; WORLD

HEALTH ORGANIZATION, 1993; 1994; DAVID; BRUM; PRIETI, 1994; GRANGE; YATES, 1994; DUMARS et al., 1995, MODA et al., 1996).

O animal com tuberculose clínica é a principal fonte de contágio, transmitindo a infecção por via aerógena e pela contaminação ambiental, da água, pastagens, utensílios, cochos através das fezes, urina, escarros, leite, sêmem, abcedações de linfonodos, secreções vaginais e uterinas (BLOOD; HENDERSON, 1978). Embora grande número de bacilos seja eliminados nas fezes, provavelmente, as pastagens não são uma fonte de infecção importante (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994)

É de fundamental importância saber quais as vias de transmissão deste patógeno e como ele se comporta nas diversas espécies, além da bovina, que alberga esse agente. A transmissão do *M. bovis* de bovinos para o homem se dá por via aerógena devido à inalação do agente, e indiretamente pelo consumo de leite e de produtos lácteos oriundos de leite não pasteurizado (WIESNER, 1973; ROSEMBERG, 1983; KLEEBOERG, 1984; MOTA; NAKAJIMA, 1992; GRANGE; YATES, 1994; O'REILLY; DARBORN, 1995; ABRAHÃO, 1999). Os bovinos também podem infectar os caprinos por via inalatória ao pastarem juntos ou ainda por via digestiva ao se alimentarem com leite proveniente de vacas tuberculosas (COUSINS et al., 1993).

A transmissão de bovino para bovino se dá por via aerógena, sendo essa rota a mais comum de infecção no gado, representando um percentual de 80 a 90% de contaminação através dessa rota de infecção. A via digestiva é a mais comum para bezerros e a fonte de infecção é o leite infectado, alimento, forragem ou água contaminada (ALHAJI, 1976; LITTLE et al., 1982; WILESMITH et al., 1982; OLIVEIRA et al., 1983; MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994; ABRAHÃO, 1999).

A transmissão do *M. bovis* de bovinos para o homem se dá por via aerógena devido à inalação do agente, e indiretamente pelo consumo de leite e de produtos lácteos oriundos de leite não pasteurizado (WIESNER, 1973; ROSEMBERG, 1983; KLEEBOERG, 1984; MOTA; NAKAJIMA, 1992; GRANGE; YATES, 1994; O'REILLY; DARBORN, 1995; ABRAHÃO, 1999). Já a propagação do homem para o homem pelo *M. bovis* é muito rara, mas há relatos de alguns casos contemporâneos na Grã-Bretanha, Suécia, Canadá e Holanda, confirmando a transmissão aerógena inter-humana, o que torna mais preocupante a ação desse agente (DANKNER et al., 1993; O'REILLY; DARBORN, 1995).

Deve-se descartar o risco de contrair *M. bovis* pela ingestão de carne que apesar de baixa, não se deve ignorar a possibilidade de aquisição da doença através do consumo de carnes originárias de animais abatidos clandestinamente, ou mesmo os animais descartados de rebanhos tuberculina positivo em matadouros municipais, que não atendem às normas de inspeção exigidas pelo rigor da lei (SOUZA et al., 1999).

A exploração leiteira é o setor de maior risco para o homem, devido ao estreito contato do ordenhador e seus familiares com os animais, em repetidas ocasiões, diariamente (COMISION NACIONAL DE ZOONOSIS, 1982).

Sabendo-se que um animal infectado é capaz de eliminar o agente pelo leite mesmo antes do desenvolvimento de lesões teciduais (ROXO, 1997), e que mesmo contaminado o leite não apresenta alterações visíveis, o que dificulta a detecção e segregação do produto, essa forma de transmissibilidade da doença não deve ser deixada em esquecimento (LERCHE, 1969). Apesar de a pasteurização diminuir o risco da aquisição de tuberculose via leite e seus derivados, a grande preocupação é o seu consumo *in natura* e dos derivados lácteos que são fabricados utilizando—o nesta forma, sendo considerada a principal forma de transmissão de *M. bovis* na atualidade principalmente na Europa e Estados Unidos onde a doença tem sido considerada sob controle devido aos programas de controle e erradicação dessa zoonose, implantados nessas localidades (TROWE; DONAGY, 2008).

Na Europa, o *M. bovis* já foi isolado de manteiga, creme, queijo fresco e queijo integral curado; foi verificada sobrevivência de *M. bovis* em manteiga à temperatura ambiente por 32 dias; manteiga salgada conservada a 4°C por 151 dias e em pequeno número até 180 dias; em queijos gordos até um ano. O número e a virulência dos bacilos se mantiveram inalterados (CORRÊA; CORRÊA, 1983).

No Brasil, em 1997, estimou-se que 41% do leite consumido no país era clandestino, sendo que os brasileiros consumiram esse leite na forma de queijos, iogurtes e bebidas lácteas, cujos fabricantes falsificam o carimbo dos serviços de inspeção federal, estadual e municipal, vendendo esses produtos em estabelecimentos que não exigem nota fiscal. Há ainda os pequenos produtores que burlam as leis para sobreviver colocando a vida de seus familiares e dos consumidores de seus produtos em risco. As autoridades reconhecem a gravidade

do problema, mas geralmente se omitem, alegando falta de recursos financeiros (ANTENORE, 1998a, b, c; ABRAHÃO; NOGUEIRA; MALUCELLI, 2005).

2.6.1 Distribuição Mundial e Brasil

A taxa de infecção por tuberculose no mundo é de 3%, sendo que os índices mais alarmantes são encontrados nos países em desenvolvimento, liderados pela Índia e a China. A Índia apresenta cerca de um quarto do total de tuberculose no mundo, com estimativas de 3,5 milhões de pessoas doentes e meio milhão de mortos por ano, e na África a tuberculose corresponde a 80% das doenças de notificação obrigatória (FRIEDEN et al., 2003; EDGINTON, 2000).

Em 1995, o Brasil era o sexto país do mundo em notificação de casos de tuberculose. Segundo o Ministério da Saúde a prevalência da doença era 57,6 casos por 100.000 habitantes para todas as formas de tuberculose com 85,6% dos casos de tuberculose pulmonar e 14,45% de formas extrapulmonares (KRITSKI et al., 1995). Segundo as projeções feitas por Cosivi et al. (1998) a incidência de co-infecção HIV versus tuberculose deveria subir de 315.000 (4% dos casos de tuberculose) em 1990 para 1,4 milhões (14%) no ano 2000.

Na Europa, a prevalência da tuberculose bovina em 1991 atingiu 10,8% na Espanha, 8,8% na Irlanda, 3,71% na Itália, 0,37% na França, 0,31% na Grécia, na Grã Bretanha 0,15%, Portugal 0,12%, Bélgica 0,01%, Alemanha 0,002%. Por outro lado Holanda, Luxemburgo, Dinamarca, EUA e Canadá são livres de tuberculose (CAFFREY, 1994). A Austrália aponta a ocorrência de 0,0032% (TWEDDLE; LIVINSTONE, 1994).

Segundo Kantor e Ritacco (1994), no ano de 1991, na Bolívia a prevalência da enfermidade no rebanho bovino foi de 13%, Equador 3,4%, Chile 2,9%, Colômbia 2,6%, Brasil e Argentina 1,0%, Peru com 0,6%, Paraguai 0,2%, Costa Rica 0,08%, Venezuela 0,015% e Uruguai 0,01%.

Em 1986 a ocorrência da tuberculose bovina no Brasil foi entre 0,9 a 2,9% com 6,2 a 26,3% dos rebanhos acometidos. Neste mesmo ano, a taxa de lesões

tuberculosas encontradas em matadouros foi de 0,14% (KANTOR, 1988; KANTOR; RITACCO, 1994).

No Brasil, dados do Ministério da Agricultura referentes à prevalência da tuberculose bovina, realizados entre 1974 e 1984, apresentaram um índice de 1,82%, representados por 6.491 focos da doença. (BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL, 1984; KANTOR; RITACO, 1994)

As perdas econômicas causadas pela tuberculose estão relacionadas principalmente à baixa produtividade e à condenação de carcaças em matadouros.

2.6.2 Programa de Controle e Erradicação de Tuberculose

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os países que implantaram programas de controle da tuberculose animal ao longo do século passado, baseados em tuberculinização e sacrifício dos animais reagentes, conseguiram reduzir consideravelmente a frequência de animais infectados. Atualmente sua prevalência é maior nos países em desenvolvimento e menor nos países desenvolvidos, onde encontra-se em fase avançada de controle e erradicação. Alguns países da Europa já erradicaram a doença, outros estão em fase final de erradicação com prevalências baixas. Na América Latina e Caribe existem áreas com prevalência que ultrapassam 1% (BRASIL, 2003).

Devido às perdas econômicas causadas pela tuberculose objetivando assegurar o mercado de exportação, e se posicionar no mercado internacional, os países da América Latina foram sensibilizados a atenderem as exigências relacionadas ao manejo sanitário dos rebanhos e a adotar medidas para o controle de zoonoses de relevância para a saúde pública (KANTOR; RITACCO, 1994), estabelecendo e mantendo áreas livres de enfermidades (USABIAGA, 2001).

Na América Latina, os planos de controle para combate da tuberculose baseiam-se em esquemas de regionalização, considerando o sistema de produção, as condições culturais, econômicas e de infra-estrutura (USABIAGA, 2001).

A Argentina iniciou o programa de controle da tuberculose em 1993, entretanto, ainda são poucas as estimativas de prevalência nacional e quando

determinadas são feitas através de levantamentos realizados em províncias leiteiras de maior importância como Santa Fé (ABDALA, 2003).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), oficializado em 10 de janeiro de 2001, tendo como principal objetivo baixar a prevalência e a incidência de tuberculose e brucelose no país. O programa recomendou o uso do teste tuberculínico para o diagnóstico, com o propósito de eliminar os animais positivos, e incentivou a certificação de rebanhos livre da doença. A adesão ao programa inicialmente é voluntária por benefícios aos produtores com a valoração dos produtos certificados (BRASIL, 2001a).

2.6.3 Patogenia

Os ruminantes são infectados por *M. bovis* geralmente pela via respiratória e ocasionalmente pela ingestão dos bacilos (CARTER, 1988; CORRÊA; CORRÊA, 1992; SMITH, 1993; RADOSTITS et al., 2002). Após atingir o alvéolo pulmonar, o bacilo é fagocitado por macrófagos e seu desenvolvimento ou não no hospedeiro depende da infectividade do microrganismo, da carga infectante e da resistência oferecida pelo organismo invadido. Se não forem eliminados os bacilos se multiplicam no interior dos macrófagos até destruí-los. Esses bacilos que saem dos macrófagos rompidos são fagocitados por outros macrófagos alveolares ou por monócitos vindos da corrente circulatória. Por volta de duas a três semanas após a inalação do agente infeccioso pára a multiplicação do agente, onde ocorre resposta imune celular e uma reação de hipersensibilidade tardia, ocorrendo necrose de caseificação para conter o crescimento intracelular das micobactérias. Esse processo envolve a mediação por linfócitos T, com migração de novas células de defesa ao local da infecção, que levarão à formação dos granulomas da tuberculose. Essas lesões são constituídas por uma parte central, às vezes com área de necrose de caseificação, envolvida por células epitelióides, células gigantes, linfócitos, macrófagos e uma camada de fibroblastos na superfície. Os bacilos da lesão da tuberculose no parênquima pulmonar propagam-se para os linfonodos regionais, nos

quais desencadeiam a formação de novo granuloma e assim formam o complexo primário (SMITH, 1993; RADOSTITS et al., 2002; BRASIL, 2006).

Nos pulmões as lesões se iniciam na junção dos bronquíolos com os alvéolos, e se disseminam para linfonodos e brônquios, podendo regredir, continuarem estabilizadas ou progredir. A disseminação para outros órgãos pode ocorrer durante o desenvolvimento da doença mais tardiamente, em função de uma queda na imunidade do animal. Quando generalizada, a tuberculose bovina pode se apresentar sob duas formas: miliar (quando acontece de forma abrupta e maciça, com entrada de um grande número de bacilos na circulação), ou protraída, que é a mais comum a disseminação se dá por via linfática ou sanguínea, acometendo o pulmão, linfonodos, fígado, baço, úbere, ossos, rins, sistema nervosocentral, e dissemina-se por quase todos os tecidos (RADOSTITS et al., 2002; BRASIL, 2006).

Macroscopicamente observa-se que as lesões possuem geralmente coloração amarelada, se apresentando em forma de nódulos de um a três centímetros de diâmetro, ou mais, que podem ser confluentes, de aspecto purulento ou caseoso e com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar necrose de caseificação no centro da lesão ou calcificação nos casos mais avançados. As lesões são encontradas com maior frequência em linfonodos (mediastínicos, inguinais superficiais, retrofaríngeos, bronquiais, parotídeos, cervicais e mesentéricos), nos pulmões e no fígado (RADOSTITS et al., 2002; BRASIL, 2006).

Um indivíduo com imunidade adquirida durante a primeira infecção, responde a uma nova infecção pelo *M. bovis* diferentemente daquele que infectado pela primeira vez. Quando infectados novamente, os bovinos não apresentam alterações tuberculosas dos gânglios linfáticos, porque a disseminação do bacilo não ocorre mais por via hematogênica, mas, somente intracanalicular. Também os processos tuberculosos da maioria dos órgãos permitem reconhecer uma tendência à fusão do tecido, faltando à calcificação. Quando as lesões são circunscritas a um órgão ou sistema orgânico, como consequência de não existir difusão linfohematogênica, origina-se o quadro de tuberculose de um órgão isolado. Como as lesões produzidas somente progridem lentamente no órgão afetado, é originada uma tuberculose crônica do órgão. Devido à tendência deste processo tuberculoso à fusão, não é raro o seu acesso aos canais naturais, de maneira que assim podem chegar grandes quantidades de bacilos ao meio ambiente (BEER, 1988; RADOSTITS et al., 2002).

Revisão de Literatura

O aumento da resistência específica, que é necessário para a constituição do processo pós-primário e adquirido na evolução do período de infecção primária, pode ser perdido por influências como gestação, nutrição deficiente, doenças e transportes que causam fadiga ao animal. Assim, com a resistência diminuída as bactérias podem se multiplicar intensamente (BEER, 1988).

As lesões macroscópicas da tuberculose caracterizam-se, inicialmente por pequenos nódulos acinzentados que, geralmente, contém pequenas áreas centrais amarelas de aspecto caseoso (RIET-CORREA et al., 2001). Posteriormente essa lesão progride, e é comum a mineralização (calcificação) do tubérculo, o que ao corte dá sensação de areia com som característico de ranger (COELHO, 2002). Histologicamente caracterizam-se por áreas de necrose caseosa central, onde predominam-se células epitelióides e células gigantes (Figura 2), com áreas de calcificação; enquanto na periferia, observam-se monócitos e linfócitos com proliferação de tecido fibroso que tenta encapsular a lesão. Riet-Correa et al. (2001) citam que com a coloração de Ziehl-Neelsen para bactérias BAAR, pode-se observar o agente na lesão.

Fonte: GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2001.

Figura 2 - Aspecto morfológico do granuloma

2.7 CAPRINOS

2.7.1 Origem dos Caprinos

A cabra foi o primeiro animal a ser domesticado pelo homem, a mais de 10.000 anos, antes mesmo do cachorro e da ovelha. Seu leite foi introduzido na alimentação humana há séculos pelos povos nômades da Ásia. De lá para cá, sempre acompanhou a história da humanidade, conforme atestam os diversos relatos históricos, mitológicos e até mesmo bíblicos, que mencionam os caprinos. Apesar disso, poucas vezes teve seu valor devidamente reconhecido (RIBEIRO, 2006; CAPRINO, 2009).

Os caprinos têm a mesma origem que os bovinos, com o tronco ancestral dos antílopes e a diferenciação ocorrendo no Plioceno. As raças domésticas atuais descendem provavelmente da *Capra aegagrus*, da Pérsia e Ásia Menor, *Capra falconeri*, do Himalaia, e *Capraprisca*, da bacia do Mediterrâneo. A cabra doméstica é a *Capra hircus*. Existe uma grande variedade de produtos de origem caprina: leite, carne, couro, pêlo e esterco, além de ter utilidade como animal de tração (RIBEIRO, 2006).

2.7.2 Caprinocultura no Mundo e Brasil

A caprinocultura é uma atividade que vêm se desenvolvendo muito nos últimos anos. A população mundial de caprinos, que é estimada em 780 milhões de cabeças (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2004), aumentando em 11,30% entre 1965- 2004. No período de 1979-1987 enquanto a população de bovina aumentou em apenas 4,9%, a de ovino em 5,7% a de caprino teve um aumento de 7,3%. A produção de leite de cabra, porém, aumentou em 10,7%, e a produção de sua carne aumentou em 21,8% no mesmo período, indicando um

aumento na produtividade dos animais, uma vez que o aumento na produção de leite e carne foi maior que o aumento no efetivo (PRODUCTION YEARBOOK, 1988).

Segundo dados da Food and Agriculture Organization (2004), cerca de 96% dos caprinos do mundo, encontram-se em regiões em desenvolvimento, evidenciando a capacidade do caprino de se adaptar a condições adversas, justificando sua reputação de animal rústico. Os 4% restantes estão localizados em regiões desenvolvidas, sendo que essa espécie é responsável por 28,4% do leite produzido nessas regiões, este fato mostra que em condições favoráveis os caprinos são capazes de apresentar alta produtividade. Vale apenas destacar que para a caprinocultura de corte 95,5% da produção concentra-se em países em desenvolvimento e 4,5% em países desenvolvidos. Para a produção oficial de leite encontramos a situação inversa a de corte, pois temos 78,6% e 28,4% da produção proveniente de países em desenvolvimento e desenvolvidos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2004).

Segundo a Production Yearbook (1994) a maior população mundial de caprinos por continente, encontra-se na Ásia, seguida da África, da América do Sul, América do Norte e Central e da Europa. O rebanho caprino da América do Sul é pequeno, com 22,8 milhões de cabeças o que representa apenas 3,7% da população mundial. O Brasil possui o maior rebanho da América do Sul com 9,8 milhões de cabeças, seguidos pela Argentina (3,4 milhões) e pela Venezuela (1,8 milhão).

O Brasil apresenta o 14º rebanho de caprinos do mundo, sendo que o país que apresenta maior rebanho é a China (PESQUISA, 2005; COUTINHO, 2007). Segundo dados da Pesquisa (2005), o Brasil destaca-se com um plantel de 9,8 milhões de caprinos com o 14º rebanho mundial de caprinos, ocupando a 14ª e 16ª posição mundial de carne e leite. O rebanho caprino brasileiro se distribui da seguinte forma: o Nordeste apresenta 90% do rebanho do país, a região Sul apresenta 4%, a região Sudeste 3%, a Norte 2% e a Centro-oeste apenas 1% do total de cabeças do país (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1994; COUTINHO, 2007).

Na região Nordeste a maioria dos animais é criada em condições precárias, sendo exploradas apenas a carne e a pele. Por outro lado, existe no Centro-Sul e no próprio Nordeste uma caprinocultura voltada para a produção de leite, onde

busca-se alta produtividade. A população de caprinos no Brasil entre 1970 e 1980 aumento em 40%, enquanto a população humana aumentou em 23,8% no mesmo período (PRODUCTION YEARBOOK, 1994; RIBEIRO, 2006).

De acordo com os dados publicados pela FAO, Production Yearbook (1993), a produção de leite de cabra ocupa o quarto lugar, superado pelos leites de vaca, de búfalo e de ovelhas. Do total da produção mundial de leite das espécies citadas, temos as seguintes distribuições percentuais: leite de vaca (89,4%), leite de búfala (7,3%), leite de ovelha (1,7%) e leite de cabra (1,6%).

A cabra como animal leiteiro continua ocupando um espaço importante no mundo moderno, inclusive em países com bovinocultura leiteira bastante adiantada, pelas vantagens que a espécie apresenta no tocante à sua grande eficiência de produção, aliada ao valor nutricional do seu leite como alimento para crianças, velhos enfermos, pessoas alérgicas ao leite de vaca e para o fabrico de produtos destinados ao consumidor de maior poder aquisitivo (ZACHARIAS, 2001).

No Brasil, como atividade comercial, a produção do leite de cabra teve seu crescimento na região Sudeste, intensificando-se a partir dos meados da década de 70, fato esse demonstrado pelo aumento de associados da Caprileite, de 42 para 500, no período de 1974 a 1989. Por outro lado, é nítido o fortalecimento da caprinocultura leiteira nas regiões Sudeste e Sul, pela crescente exploração de cabras leiteiras, predominantemente em estado de pureza racial (ZACHARIAS, 2001). A Bahia também tem acompanhado essa tendência nacional de crescimento, já existindo em todo Estado alguns criadores que exploram essa atividade de forma racional, de maneira intensiva e semi-intensiva (RIBEIRO, 2006).

A produção de leite de cabra está distribuída mundialmente em todos os continentes, sendo destaque o continente Asiático e Africano devido ao volume de animais desses continentes onde a sua criação é de subsistência. Segundo Zacharias (2001), cerca de 10% do leite consumido no mundo é de origem caprina, sendo que em alguns países ele representa a única fonte láctea disponível.

No Brasil, o leite de cabra vem conquistando crescente mercado, tanto na forma de leite pasteurizado e congelado, como na de leite em pó e mais recentemente em embalagens longa vida, iogurte natural ou com frutas, queijos boursin, chevrotin, chabichou (com mofo), frescal, sorvetes, cosméticos, sabonetes, shampoos e condicionadores. A caprinocultura sem dúvida é um mercado em plena

expansão, e que é de extrema importância as condições sanitárias do plantel, principalmente no que se refere a perdas por doenças (RIBEIRO, 1998) entre estas destaca-se as zoonose.

2.7.3 Tuberculose em caprinos

A tuberculose caprina pode ter sido considerada rara a essa espécie (MURRAY; MCNUTT; PURWIN, 1921; SOLIMAN et al., 1953; LUKE, 1958; GUTIÉRREZ et al., 1995), o que levou ao errôneo conceito de que esses animais fossem resistentes ao *Mycobacterium bovis*, pois pesquisas recentes além de acreditarem na suscetibilidade desses animais ao *M. bovis* (THOEN, 1988; BERNABÉ et al., 1991, MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994), recentemente classificaram o agente em uma subespécie do *M. bovis*, sendo este classificado como *Mycobacterium bovis subsp. caprae*, também pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (ARANAZ et al., 1999). O primeiro relato da doença em caprinos ocorreu em 1884 por Robert Koch (MOHAN, 1950). Em 1917, na Inglaterra, Griffith registrou o primeiro caso natural de tuberculose caprina devido à ingestão de leite de vaca durante o período de amamentação, sendo este o primeiro caso de cujo bacilo foi determinado (O'REILLY; DARBORN, 1995).

Estudos indicaram que as cabras são suscetíveis ao *M. bovis*, mas frequentemente resistentes ao *M. tuberculosis* (GRIFFITH et al., 1930; BLOOD; HENDERSON, 1978; JUBB; KENNEDY; PALMER, 1993; O'REILLY; DARBORN, 1995), mas existem relatos de casos de isolamento de *M. tuberculosis* e *M. avium* nessa espécie (LESSLIE; FORD; LINZEL, 1960; BERNABÉ et al., 1990-1991a).

A infecção por *M. bovis* em cabras pode ocorrer por contato direto com o animal doente, ou por alimento contaminado, e causar doença progressiva e generalizada, cujos sinais são anorexia, aumento de volume dos linfonodos, dor ao respirar, tosse rouca, diarreia aguda ou crônica, perda de peso que pode levar a caquexia e diminuição na produção de leite (LESSLIE; FORD; LINZEL, 1960; BRUNINI SOBRINHO, 1988; BERNABÉ et al., 1991; ANDERSON; KING, 1993; COUSINS et al., 1993), mas assim como em bovinos a via respiratória é a forma

mais importante dessa infecção, devido às lesões encontradas, concentrarem-se na cavidade torácica (JUBB; KENNEDY; PALMER, 1993).

Deve-se ressaltar que as cabras leiteiras são também vítimas de mastite tuberculosa, e que o leite desses animais constitui um grande fator de risco para quem os consome (O'REILLY; DARBORN, 1995). Em 1921, na literatura há o primeiro relato dessa enfermidade em cabras leiteiras, em Iowa nos Estados Unidos, onde pela primeira vez se destacou o risco à saúde pública pela transmissibilidade deste agente ao homem, devido ao consumo de leite oriundo dessa espécie, sendo também recomendado como forma de evitar - lá a pasteurização do leite e a eliminação de animais reatores ao teste de tuberculinização (GOLDEN, 1921).

A tuberculose nos caprinos ocorre de forma semelhante à observada nos bovinos no que se refere aos agentes causais, a patogenicidade, à forma clínica de apresentação, à frequência, aos aspectos patológicos, epidemiológicos e zoonóticos (LUKE, 1958; KAKKAR; SINGH; SINHA, 1977; BERNABÉ et al., 1990-1991a,b).

Há relatos da existência da tuberculose em caprinos em diversos países. Na Alemanha foi realizada a incidência, da tuberculose em cabras, em abatedouros que revelaram uma percentagem de 0,71% no período de 1904 a 1920, e 1,02% para o período de 1920 a 1937 (O'REILLY; DARBORN, 1995).

No nordeste da Espanha também ocorreu infecção por *M. bovis* em rebanho de cabras leiteiras, onde foram encontrados 19 rebanhos infectados, sendo que estes animais apresentavam como principal sinal clínico o emagrecimento. Exames *post mortem* mostraram lesões de tuberculose crônica, com presença de nódulos grandes e caseosos e áreas de cavitações. Essas lesões foram confirmadas em 65 animais (O'REILLY; DARBORN, 1995).

Em 1990, na Espanha, 77% das 251 cabras provenientes de dois rebanhos distintos, foram encontradas positivas ao teste da tuberculina e o *M. bovis* foi isolado em 10 (28,65%) de 35 cabras reatores e necropsiadas (COUSINS et al., 1993).

Cabras selvagens com prevalência de tuberculose acima de 3,1%, dentro de grupos distintos, foram encontradas em áreas endêmicas de tuberculose na Nova Zelândia (MORRIS; PFEIFFER; JACKSON, 1994; O'REILLY; DARBORN, 1995). A significância epidemiológica da infecção por *M. bovis* em cabras selvagens, é geralmente considerada como mínima, mas em países desenvolvidos com avançados programas de erradicação da tuberculose bovina, cabras domésticas são

Revisão de Literatura

monitoradas, para prevenir a infecção por *M. bovis*, uma vez que quando, infectadas freqüentemente, sofrem de tuberculose pulmonar e são capazes de reinfectar os bovinos (O'REILLY; DARBORN, 1995). Portanto, essa enfermidade já foi relatada na Espanha, Austrália, Índia e Zaire (Tanganica), Inglaterra e Estados Unidos; os diagnósticos foram estabelecidos por achados de necropsia, inspeção em abatedouros, e/ou pela realização de teste tuberculinico (GOLDEN, 1921; MOHAN, 1950; SOLIMAN et al., 1953; MILNE, 1955; LUKE, 1958; LESSLIE; FORD; LINZEL, 1960; KAKKAR; SINGH; SINHA, 1977; SHARAN et al., 1988; WELLINGTON, 1988; BERNABÉ et al., 1990-1991a; ANDERSON; KING, 1993; COUSINS et al., 1993; SEVA et al., 2002).

No Brasil, a tuberculose tem sido diagnosticada em animais dessa espécie, registrando-se o caprino com tuberculose atendido na Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Este caso, diagnosticado em 2001, desencadeou pesquisas em caprinos e ovinos objetivando avaliar a ocorrência dessa enfermidade em pequenos ruminantes, até então considerado como espécime resistentes à tuberculose (BENESI et al., 2006; CYRILLO, 2006; SILVA et al., 2006). A ocorrência desse fato, pode ser considerado como o primeiro caso da enfermidade em caprinos, com isolamento e identificação do agente comprovado no Estado de São Paulo (BENESI et al., 2008).

Em 2005, no Município de Jaboatão dos Guararapes, em Pernambuco, com a utilização do Teste Cervical Comparativo (TCC) preconizado por Silva et al. (2006), em cabras leiteiras tendo como resultado 16,2% de animais que apresentaram-se positivos ao teste, sendo este o primeiro relato de tuberculose caprina em Pernambuco (MELO et al., 2005).

Pinheiro et al. (2007), relatou um surto da doença no Estado de Minas Gerais, em caprinos leiteiros que mostraram-se positivos ao TCC, sendo estes abatidos, necropsiados e com posterior identificação de *Mycobacterium bovis*, com diagnóstico diferencial para *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

No semi-árido paraibano a prevalência da tuberculose nessa espécie, em animais positivos ao teste imunoalérgico foi de 0,47%, e a prevalência nas propriedades identificadas como positivas de 10,71%. Detectou-se também lesões compatíveis a tuberculose nesses animais quando foram submetidos a necropsia, ao

estudo histológico, e a bacterioscopia direta onde constatou-se a presença de bacilos álcool-ácido resistente (BAAR) (PIGNATA et al., 2009).

Apesar das evidências da tuberculose caprina no Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que criou o Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO) pela portaria nº 103, de 7 dezembro de 2004 (BRASIL, 2004), não inclui nesse programa a tuberculose, desprezando desta forma o potencial zoonótico dessa enfermidade.

Sabendo-se da suscetibilidade da espécie a esta enfermidade, negar a existência deste elo da cadeia epidemiológica é um problema de cujas suas dimensões são incalculáveis, pois o consumo indiscriminado dos produtos originários da caprinocultura é importante fator de risco a população mundial, devido ao seu potencial zoonótico, sendo uma questão de saúde pública.

2.8 OUTRAS DOENÇAS DE IMPORTÂNCIA

2.8.1 Artrite-Encefalite Caprina (CAE)

Os caprinos podem sofrer de Artrite-encefalite caprina, usualmente denominada CAE (Caprine Arthritis-Encephalitis), que é uma doença vírica altamente transmissível, cuja sua disseminação no Brasil se deu na década de 80 devido à importação de caprinos do Canadá e da França. A doença se disseminou desta forma para todo o rebanho do país. A CAE pode ser transmitida pelo colostro, pelo aleitamento e pelo sangue, para se evitar a disseminação dessa doença no rebanho é de costume, no Brasil, fornecer aos caprinos jovens o leite de bovinos para que o animal não venha ter CAE (RIBEIRO, 2006). Deve-se salientar que essa pratica de manejo nutricional torna-se um forte fator de risco para a disseminação de tuberculose nessa espécie animal. Este fato foi comprovado por Griffith (1928) que relatou o diagnóstico da tuberculose em caprinos amamentados com leite de vaca, no início do século passado.

2.8.2 Linfadenite Caseosa (L.C.)

Ao se fazer o diagnóstico para tuberculose em pequenos ruminantes não deve-se esquecer de realizar o diagnóstico diferencial com *Corynebacterium pseudotuberculosis* que é o agente causador da Linfadenite Caseosa (LC). O *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria gram-positiva, pleomórfica, que forma pequenas colônias esbranquiçadas rodeadas por estreita zona de hemólise completa no meio de cultura, que pode ser evidente em até 72 horas. Dois tipos de *C. pseudotuberculosis* são conhecidos: linhagens de equino/bovino e de ovino/caprino respectivamente redutoras e não redutoras de nitratos (CORRÊA; CORRÊA, 1992; SMITH, 2006).

O agente não possui vetores ou transmissores. Os animais infectados contaminam o solo, a água, as instalações e os utensílios de manejo em geral com suas fezes, descargas nasais, orais ou descargas purulentas de abscessos superficiais rompidos. O agente resiste por meses à dessecação quando abrigado da luz solar, mas é sensível aos desinfetantes comuns, a temperaturas superiores a 70° C e luz solar direta por cinco minutos (CORRÊA; CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2000; QUINN et al., 2005). No local em que o agente se instale, surge um material caseoso, denso, branco-amarelado contido em abscessos de cápsula espessa que vai aumentar lentamente podendo atingir grande diâmetro. Os abscessos mais evoluídos se parecem ao corte com “anéis de cebola”, devido ao pus organizado em capas concêntricas (CORRÊA; CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2000; QUINN et al., 2005).

A prevalência da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos aumenta consideravelmente com a idade, podendo se manifestar de forma superficial com o aparecimento de abscessos subcutâneos nos linfonodos superficiais ou de forma visceral, que se caracteriza pelo desenvolvimento de abscessos internos nos linfonodos submandibulares, mediastínicos e mesentéricos, além de órgãos como pulmão e fígado (RADOSTITS et al., 2000; QUINN et al., 2005). Devido a similaridade macroscópicas desse agente com as lesões macroscópicas de *Mycobacterium sp*; faz-se necessário o diagnóstico diferencial da Linfadenite

Caseosa com a tuberculose, pelo cultivo ou microscopicamente pelo método histopatológico.

2.8.3 Mastite Caprina

A mastite é a inflamação da glândula mamária que ocorre como resposta, na maioria das vezes, a uma inflamação causada por um microrganismo. Caracteriza-se por uma inflamação geralmente de caráter infeccioso, podendo ser classificada como clínica ou subclínica. A mastite clínica apresenta sinais evidentes, tais como: edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor na glândula mamária, grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite (FONSECA; SANTOS, 2000). Na forma subclínica não se observam alterações macroscópicas e sim na composição do leite; portanto, não apresenta sinais visíveis de inflamação do úbere (CULLOR; TYLER; SMITH, 1994).

A mastite é considerada uma das doenças mais importantes que acometem os rebanhos de caprinos leiteiros. Atribui-se a ela perdas na produção e, conseqüentemente, prejuízos econômicos ao produtor e à indústria (FONSECA; SANTOS, 2000). As perdas econômicas originadas pelas mastites são extremamente elevadas nos rebanhos de pequenos ruminantes leiteiros. A diminuição da produção de leite devido a mastites clínicas e subclínicas, a diminuição da qualidade do leite, as repercussões sobre os animais adultos e lactantes e, ainda, a saúde do consumidor, são aspectos relacionados a estas perdas econômicas que justificam a grande necessidade em se estudar e desenvolver estratégias de controle para a doença.

A mastite caprina, assim como a bovina, gera graves prejuízos econômicos devido ao descarte do leite, custos com medicamentos e assistência veterinária, aumento da mão-de-obra, redução da qualidade e quantidade do leite e seus subprodutos (DULIN et al., 1983; BARROS; LEITÃO, 1992) além de ser importante problema de saúde pública (GUSS, 1975).

O “California Mastitis Test” (CMT) é um método indireto, sendo a prova de eleição para diagnóstico das mastites subclínicas pela sua fácil execução, por ser

econômico e por dar uma idéia muito aproximada da situação do rebanho. É método amplamente difundido como auxiliar no diagnóstico da mastite subclínica em bovinos, desenvolvido por Schalm e Noorlander em 1957. Esse método mede indiretamente a concentração de leucócitos no leite. O teste baseia-se em diferentes graus de viscosidade de acordo com a maior ou menor quantidade de células somáticas, reação esta ocasionada pela presença de um detergente. Em caprinos as reações negativas e de três cruzeiros (3+) são facilmente interpretadas, mas nas reações intermediárias existem algumas discrepâncias, que podem dificultar a interpretação dos resultados. Devido ao maior número de células somáticas no leite dos animais da espécie caprina, devem-se considerar como negativos os três primeiros níveis: negativo (-); duvidoso (+/-) e fracamente positivos (+) (SMITH; ROGUINSKY, 1977; CONTRERAS et al., 1996). Somente valores acima destes, ou seja, positivo (2+) e fortemente positivo (3+) é que devem ser considerados como infecção instalada.

Segundo Silva et al. (2001), o CMT poderá ser utilizado como teste de triagem da saúde da glândula mamária caprina, no entanto, para evitar resultados falso-positivos e devido à fisiologia da glândula mamária desta espécie, o teste deve ser associado ao exame microbiológico do leite. A análise microbiológica constitui um método direto cujo objetivo é a identificação do agente etiológico mediante cultivo e isolamento. Esta técnica é considerada como padrão para o diagnóstico da enfermidade em pequenos ruminantes (CONTRERAS et al., 2007).

A incidência anual de mastite clínica em pequenos ruminantes é geralmente menor que 5%, mas essa pode aumentar esporadicamente (CONTRERAS et al., 2007). A prevalência de mastite subclínica em caprinos e ovinos é estimada entre 5-30%, mas há informações limitadas sobre a incidência de infecções intramamárias (IMI) na literatura, para pequenos ruminantes (BERGONIER; BERTHELOT, 2003; CONTRERAS et al., 2003).

Alguns patógenos podem causar mastite, mas o *Staphylococcus* spp é isolado com maior frequência sendo os de maior causa de infecções intramamária em caprinos e ovinos. Outros patógenos como *Streptococcus* spp, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aureginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Corynebacterium* e fungos podem causar IMI em pequenos ruminantes, mas em menor grau (CONTRERAS et al., 2007).

2.8.4 Mastite causada por *Mycobacterim bovis*

A mastite causada pelo *M. bovis* pode apresentar-se de três formas: mastite miliar, infiltrativa lobular (ou tuberculose mamária crônica) e mastite caseosa. A forma miliar é menos frequente devido à generalização ocorrer quase sempre na idade jovem do animal, quando a mama está pouco desenvolvida. A forma infiltrativa lobular é a mais importante, devido a 80 a 90% da tuberculose mamária ser deste tipo (SANTOS, 1979).

A mastite miliar localiza-se nas zonas mais profundas da glândula mamária que caseificam e calcificam-se precocemente associando-se aos linfonodos supramamários. A crônica apresenta nódulos grosseiros na parede e na superfície da glândula mamária são consistentes e tem superfície de corte cinza-avermelhado. A mastite caseosa caracteriza-se por atingir grande extensão da mama, determinando hipertrofia e endurecimento acentuado do quarto atingido (ACHA; SZYFRES, 1984).

No início o leite não apresenta anomalias macroscópicas, mas com o avanço da doença, aparecem flóculos muito finos que se depositam quando o leite está em repouso, deixando-o com aspecto claro de coloração âmbar. Em estágios mais avançados o leite pode se apresentar apenas como um líquido de coloração âmbar, com aspecto quase aquoso, grumoso ou às vezes cremoso. As infecções do úbere são observadas em 1% dos casos (CORRÊA; CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2002). Aproximadamente 1% das vacas tuberculosas eliminam o bacilo de forma intermitente no leite (GRANGE; YATES, 1994). Devido o leite ser uma importante fonte de contágio as espécies suscetíveis, sendo um grande problema a saúde pública devido à transmissibilidade deste agente ao homem, apesar de ser minimizado pela pasteurização do leite (ACHA; SZYFRES, 1984; O'REILLY; DARBORN, 1995).

2.9 DIAGNÓSTICO

Para realização do diagnóstico da tuberculose bovina *in vivo* pode-se recorrer aos métodos clínicos, alérgicos e sorológicos; após a morte, pelos exames anatomopatológicos, histológico, bacteriológicos, incluindo sondas de DNA e técnicas de PCR (HAAGSMA, 1995; ROXO, 1996b).

2.9.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da tuberculose é difícil devido ao fato de que os sinais respiratórios, o emagrecimento e o aumento de tamanho de alguns linfonodos ocorrem em casos avançados da enfermidade e podem ser confundidos com outras doenças. Portanto, a tuberculinização, método alérgico, é a única forma eficiente de diagnosticar a enfermidade em animais vivos. Nessa prova, os animais infectados são reativos, “alérgicos”, às proteínas contidas na tuberculina e desenvolvem reações características de hipersensibilidade do tipo IV, evidenciada por edema no local da inoculação (RIET-CORREA et al., 2001).

2.9.2 Diagnóstico *post mortem*

O diagnóstico *post mortem*, também denominado de anatomopatológico da tuberculose bovina, que ocorre durante a realização da necropsia ou da inspeção sanitária de carcaças em matadouros-frigoríficos, apresentam considerável dificuldade, uma vez que muitos processos, inflamatórios granulomatosos apresentam características morfológicas semelhantes às descritas para tuberculose, isto é, lesões nodulares com 1 mm a 2 cm de diâmetro, confluentes ou não, de cor amarela, envolvidos, por cápsula e contendo exudato com aspecto purulento ou caseoso no seu interior.

As lesões de tuberculose devem ser diferenciadas das lesões dos seguintes agentes: *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces bovis*, *Actinobacillus iligneerensi*, por fungos, na infestação por larvas de parasitas, bem como alguns processos neoplásicos, que são confundidos frequentemente com tuberculose devido à semelhança macroscópica das lesões. Deve-se aqui ressaltar que para caprinos também deve ser realizado o diagnóstico diferencial de *Corynebacterium pseudotuberculosis* devido à semelhança da lesão macroscópica (BIER, 1982; ANDRADE et al., 1991; CORNER, 1994; ESSEY; KOLLER, 1994; NEILL et al., 1994; LAGE et al., 1998; GIL, 2000).

Apesar das dificuldades apresentadas pelo exame anatomopatológico é crucial para o diagnóstico de tuberculose. Isto pode ser confirmado com base nos resultados preliminares alcançados pelos programas de controle, implantados em regiões com alta prevalência da doença, onde o exame *post mortem* convencional detecta 47% das lesões de tuberculose em carcaças de bovinos abatidas (CORNER, 1994; LAGE et al., 1998; MENZIES; NEILL, 2000).

2.9.3 Diagnóstico Histológico

O diagnóstico histopatológico é uma forma complementar ao exame *post mortem* de carcaças que apresentaram lesões macroscópicas que condizem com tuberculose. Este exame constitui-se em uma forma direta de diagnóstico presuntivo utilizada para pesquisar bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), ou indireta, detectando o granuloma, considerando a característica dessa lesão. Para a realização deste exame é importante obter-se fragmentos da lesão com aproximadamente 1,0 cm de espessura abrangendo, preferencialmente, a zona de transição entre a área lesada e a aparentemente normal. Os fragmentos devem ser colhidos e acondicionados em fracos de boca larga contendo formol a 10% em volume dez vezes maior que o material a ser fixado (LEMOS, 1998; CASSIDY et al., 1999).

Depois de fixado, incluído em parafina e microtomizado, os cortes histológicos do tecido lesado podem ser submetidos a coloração de hematoxilina-eusina (H.E.),

examinados sob microscopia de luz. Permitindo dessa forma, a observação da morfologia e organização do granuloma característico de tuberculose, revelando seu envolvimento por uma cápsula conjuntiva, adjacente a ela há a presença de infiltrado mononuclear, predominantemente constituído por macrófagos e poucos linfócitos; também são observados células epitelióides, células gigantes tipo Langerhans delimitando a necrose de caseificação, que no interior pode conter material amorfo basofílico, resultando da calcificação distrófica (CASSIY et al., 1999).

As lâminas histológicas também podem ser submetidas à coloração especial pelo método de Ziehl-Neelsen, modificado por Faraco e Wade, ou pelo método de Kinyoun. Estas técnicas baseiam-se nas propriedades tintórias comuns às micobactérias e aos micorganismos do gênero *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium*, conhecidos como álcool-ácido resistentes (BAAR), assim denominados porque conseguem reter a fucsina aquecida após o tratamento do material com álcool-ácido. Neste tipo de coloração, os microrganismos álcool-ácido resistente podem ser observados ao microscópio óptico de luz, em objetiva de imersão, aparecendo como bacilos corados de vermelho, contrastando com o restante do corte histológico em contraste ao azul ou verde, pelo verde de malaquita, conforme a técnica utilizada (LUMA, 1968; BEHMER; TALOSA; FREITAS, 1976; MICHALANY, 1980).

A técnica de coloração fluorescente com auramina-rodamina também é uma metodologia utilizada para detectar o bacilo no corte histológico da lesão, mas necessita de microscópio especial para a sua leitura. É uma técnica que utiliza uma lente de menor aumento que a de imersão, sendo portanto possível avaliar a mesma área da lâmina em menor tempo do que com a técnica de ZN (KENT; KUBICA, 1985; GITHUI et al., 1993). Apresenta maior sensibilidade que o ZN é mais rápida, porém requer confirmação posterior com o ZN, caso o resultado seja positivo, para que artefatos sejam excluídos (HOPEWELL; BLOOM, 1994; KRITSKI et al., 2000).

2.9.4 Diagnóstico imunológico

2.9.4.1 Tuberculinização

O diagnóstico imunológico é baseado nas reações alérgicas *in vivo*, representado pela prova tuberculínica. É uma forma de diagnóstico que é capaz de detectar infecções incipientes, com três a oito semanas pós contato com *M. bovis*, desde que sejam empregadas técnicas utilizando-se reagentes e equipamentos padronizados. É considerada uma resposta de hipersensibilidade tardia mediada por linfócitos T sensibilizados, caracterizando-se por apresentar um infiltrado de células mononucleares no local da aplicação, deflagrada em animais expostos ao bacilo, que vem sendo utilizada para diagnóstico em bovinos a mais de cem anos (MONAGHAN, 1994; NEILL et al., 1994). É a forma diagnóstica preconizada pelo MAPA, sendo utilizada no Brasil para o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina (PNCEBT), implantado no país em 2001 (BRASIL, 2001a,b).

Atualmente, existem dois tipos de testes tuberculínicos em uso. O teste intradérmico simples que é realizado com o PPD bovino e o teste intradérmico comparativo, no qual, utiliza-se o PPD bovino e o aviário simultaneamente (MONAGHAN, 1994). No país segundo as normas preconizadas pelo MAPA, a tuberculinização por meio do Teste Cervical Simples (TCS) é adotada como prova de triagem devido a sua boa sensibilidade; o Teste da Prega Caudal (TPC) também é utilizado como prova de triagem, porém exclusivamente em gado de corte; o Teste Cervical Comparativo (TCC) é a única prova confirmatória, podendo ainda ser usada como prova de triagem em rebanhos com histórico de reações inespecíficas, em estabelecimentos certificados como livres e em propriedades com criação de bubalinos, visando garantir boa especificidade diagnóstica (BRASIL, 2001a,b).

Nos testes tuberculínicos podem ocorrer resultados falsos-negativos devido a infecção recente, período pós-parto e desnutrição. Animais recém infectados começam a apresentar resposta entre 30 a 40 dias após à infecção. Contudo, animais em estado avançado de infecção podem apresentar anergia ou ausência de reatividade cutânea à tuberculina e não responder. Resultados falsos-negativos também poderão ocorrer por reações inerentes ao próprio teste ou em sua leitura e

interpretação, a utilização de drogas imunossupressoras também podem ser um fator a este tipo de resultado (MONAGHAN et al., 1994).

Para caprinos a tuberculinização vem sendo utilizada como forma de detecção da doença nessa espécie (SOLIMAN et al., 1953; MILNE, 1955). Sabendo-se que os caprinos apresentam menor sensibilidade à tuberculina quando comparadas aos bovinos (WANASINGHE et al., 1973; ARELLANO REYNOSO et al., 1999), e que os valores padrões recomendados pelo Brasil (2004) no PNCEBT, para realizar a leitura e interpretação obtidos no Teste Cervical Comparativo em bovinos apresentam medidas limites para positividade que são superiores às estabelecidas no experimento Silva et al. (2006). A simples utilização dos valores de bovinos para caprinos determinaria uma falsa negatividade nessa espécie, à presença da tuberculose; o que invalida o uso desses padrões de interpretação do teste tuberculínico para caprinos, fato testado e comprovados nos experimentos de Silva et al. (2006) e avaliado por Almeida (2009).

2.9.4.2 Interferon-gama (IFN- γ)

A produção específica de Interferon-gama (IFN- γ) é forma diagnóstica *in vitro*, realizada em amostras heparinizadas do sangue total do animal suspeito, com o objetivo de mensurar a produção de Interferon-gama (WOOD; JONES, 2001).

2.9.4.3 ELISA

Trata-se de um ensaio de imunoadsorção enzimática (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay-Elise*) através do qual é possível se verificar a existência da resposta imune mediada por células, desenvolvida pelo organismo do animal em resposta à infecção através do teste de captura, utilizado pelos anticorpos monoclonais anti-IFN- γ . A ausência de detecção de IFN- γ caracteriza a negatividade do animal para a infecção pelo *M. bovis* uma vez que os linfócitos de

bovinos não infectados, não produzem esta quimiocina de forma específica. Como trata-se de um teste *in vitro*, tem a vantagem de não interferir no estado imune do animal podendo ser repetido no mesmo animal sem a necessidade de respeitar o período da dessensibilização (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001; WOOD; JONES, 2001).

2.9.5 Diagnóstico Bacteriológico

O isolamento de *Mycobacterium bovis* é um método diagnóstico considerado como “padrão ouro”. Porém o longo período necessário para o isolamento e identificação bioquímica, é um de seus pontos críticos, podendo demandar mais de 12 semanas para a conclusão definitiva do diagnóstico (COLLINS et al., 1994; CORNER, 1994).

A cultura do microrganismo é necessária nos locais onde a prevalência da doença é baixa, como nos estágios finais de uma campanha de erradicação, ou quando o animal não apresenta lesões macroscópicas visíveis, mas é reativo à tuberculina (CORNER, 1994).

A obtenção de diagnóstico satisfatório para a realização deste método depende das condições da colheita das amostras, principalmente no que diz respeito à assepsia, bem como a estocagem, até o seu envio ao laboratório. Em locais cuja temperatura ambiente é alta devem ser conservados a menos 20°C, pois estudos realizados onde foram observados a viabilidade das amostras quando submetidas a essa temperatura de estocagem, obtiveram 90% de recuperação das amostras positivas com *M. bovis* quando submetidas por dias a essa temperatura, e quando mantidos por um ano tiveram 76% de recuperação da bactéria. O tetraborato de sódio que é uma substância utilizada para a preservação da amostra, revelou ser eficiente quando a manutenção da viabilidade dos bacilos em amostras a 6 ° C positivos foram processados até 72 horas pós colheita. Passando esse período houve uma queda abrupta na viabilidade dos bacilos dificultando a sua recuperação por procedimentos laboratoriais preconizados para isolamento micobacteriano (CORNER, 1994).

No laboratório, os principais fatores que influenciam no sucesso do isolamento são: a escolha do meio de cultura, os procedimentos de descontaminação da amostra e as condições de incubação do agente. Sabendo-se que o *M. bovis* é uma bactéria que requer meios ricos em nutrientes para o seu crescimento e isolamento. Os meios de cultura de Stonebrink e o Löwenstein-Jensen que são à base de ovo e piruvato, sendo o Stonebrink o mais recomendados para o cultivo de *M. bovis*. Meios de cultura à base de Agar enriquecidos com soro ou sangue, a exemplo do *Middlebrook* modificado ou 7H11 e o meio Agar sangue ou B83, também são indicados para o cultivo (CORNER, 1994).

Os meios de cultivo a base de ágar, o crescimento bacteriano é mais rápido, sendo que a primeira colônia de bactérias começa a ocorrer por volta de 27 dias no B83 e em 28 no 7H11. Já quando se utiliza o Stonebrink o crescimento é entorno 36 dias. Entretanto os meios a base de Agar são mais suscetíveis ao crescimento de microrganismos contaminantes, mesmo se amostra cultivada tenha sido previamente descontaminada. O Löwenstein-Jensen é o meio que apresenta o melhor rendimento, quando comparado com os meios a base de ágar (CORNER, 1994; HOPEWELL; BLOOM, 1994). Os meios líquidos como o 7H-9 são mais adequados para os repiques de cultivos e para a estocagem de cepas também. A leitura dos resultados das culturas só é possível após duas a oito semanas pós coleta do material clínico.

Os meios Dorset e Stonebrinks, nos quais incorporam gema de ovo, tampão fosfato, sais de magnésio, piruvato de sódio e ocasionalmente, aminoácidos, com ausência glicerol por ser um inibidor desta micobactéria, requerem aproximadamente 3 a 4 semanas em incubação a 37°C antes das colônias se tornarem visíveis. No meio líquido, o crescimento é restrito à superfície a menos que o detergente aniônico seja incorporado ao meio (Tween 80). Além de estimular o crescimento, torna a hidrófila a superfície do bacilo e proporciona o crescimento disperso (ABRAHÃO, 1998).

Os mais recomendáveis são os meios de Löwenstein Jensen, Petragani e *Middlebrook* 7H10 e 7H11 para *M. tuberculosis*, enquanto que Stonebrink é o único meio utilizado para isolamento de *M. bovis*. O *M. bovis* tem dificuldade em se desenvolver em meios glicerinados, e por este motivo se desenvolve melhor no meio de Stonebrink, onde o glicerol é substituído pelo piruvato de sódio. Para o

isolamento primário do *M. bovis* nos meios à base de ágar, recomenda-se uma pequena concentração de CO₂ (não superior a 5%), já que o *M. bovis* é microaerófilo (MARCONDES et al., 2006).

O isolamento de *M. tuberculosis* nos meios de Löwenstein-Jensen e Petragnani leva de 12 a 25 dias enquanto que o *M. bovis* leva de 24 a 40 dias para se desenvolver no meio de Stonebrink, dificultando o diagnóstico da doença (MARCONDES et al., 2006).

O processo de descontaminação é um procedimento indispensável para amostras consideradas não estéreis ou contaminadas, tais como: urina, suco gástrico, lavados bronquiais, materiais de autópsias, secreções purulentas e fezes entre outras (BALIAN et al., 2002), sendo maior problema em relação a este processo, a seleção de um descontaminante e a sua concentração, bem como os efeitos adversos que a maioria dos reagentes tem sobre o *M. bovis*. Várias substâncias podem ser utilizadas como descontaminantes como: ácido oxálico, cloreto de hexadecilpiridínio, cloreto benzalcônico e o descontaminante de Petroff que contem NaOH a 2% em sua fórmula (CORNER, 1994), mas a escolha adequada da substância ideal a ser utilizada depende do tipo de amostra para a recomendação de um determinado método (BALIAN et al., 2002).

Pode-se citar a descontaminação com ácido oxálico e posterior semeadura em meio Löwenstein-Jensen e meio Herrold clara de ovo; a descontaminação pelo método hexadecil piridinium chloride HPC e adição de um suplemento ao meio de cultura, o mycobactin J. São encontrados protocolos que utilizam o lauril sulfato de sódio; o ácido oxálico a 5%, método de Corper e Stoner modificado (fosfato trissódico a 23% e fosfato monossódico a 20%); o método de Kubica e Dye (N-acetil-L-cisteínehidróxido de sódio = NALC-NaOH); o método do cloreto de cetilpiridínio (CCP) e o método Löwenstein- Jensen (ácido sulfúrico a 15%) (BALIAN et al., 2002).

O método de Petroff vem sendo utilizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a descontaminação de linfonodos, conteúdo de lesões granulomatosas, fígado, baço, pulmão entre outros espécimes como protocolo padrão (BALIAN et al., 2002). O diagnóstico bacteriológico é realizado pelo laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, com a finalidade de isolar e

tipificar o *M. bovis* das outras micobacterioses existentes. É realizado com a utilização de dois meios de cultura sólida que são: Löwenstein-Jensen acrescido de piruvato de sódio e Stonebrink-Lesslie isento de glicerol que é tóxico para o *M. bovis*. Antes de ser semeado nesses meios o material enviado ao laboratório deve ser descontaminado pelo método de Petroff, que utiliza NaOH a 2% com posterior neutralizados com HCL e IN. Após a descontaminação passa-se a semeadura do inoculo que será mantido em estufa a uma temperatura entre 35 a 37 °C com leituras semanais de até 90 dias (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972, 1973).

Constata-se uma ampla variedade de combinações de soluções e concentrações de substâncias químicas que buscam a máxima inativação de microbiota acompanhante das amostras e a mínima injúria às micobactérias presentes (BALIAN et al., 2002). Para amostras de fezes, o método de Löwenstein-Jensen ou de Petroff é recomendado, sendo que nos casos em que se necessita ação descontaminante mais intensa, sugere-se o método de Teepol (BALIAN et al., 2002).

2.9.6 Diagnóstico Moleculares

As técnicas de biologia molecular para a amplificação de ácido desoxiribonucleico (DNA), como no caso a reação em cadeia da polymerase (PCR), baseia-se na síntese enzimática orientada por oligonucleitídios iniciadores, denominados *primers*. Estes oligonucleotídeos correspondem a uma porção de DNA que se pretende sintetizar e ampliar. Eles fornecem um sítio para que a enzima DNA-polimerase promova a síntese e incorporação do nucleotídeo, alongando o DNA que se desenvolve em três etapas distintas, isto é, desnaturaço trmica e separao de dupla fita de DNA, hibridizao das fitas resultantes com os *primers*, aleamento e a extenso destes com auxlio da enzima DNA-polimerase (OIE, 2005). A tcnica de PCR tem a sua importncia baseada na habilidade de replicar ou amplificar o DNA “*in vitro*” sem proliferao biolgica do organismo portador de tal genoma (BRASIL, 2000).

A PCR vem sendo empregada para o diagnóstico de tuberculose bovina, sendo amplamente avaliada na detecção de micobactérias do complexo MTB em colônias cultivadas, em leite, em tecidos frescos, em tecidos fixados em formol e embebidos parafinados. Também tem sido utilizado diversos *primers* para amplificar a sequência de RNAr 16S-23S, correspondentes as sequência de inserção em cromossomo de micobactérias, IS610 e IS1081, como também genes codificadores como MPB70 de 24KDa, o Antígeno B de 38KDa e HSP de 65KDa (FISAMOTTI et al., 2001; LEITE; COOKSEY, 2003).

A técnica *fingerprinting*, também tem sido utilizada por alguns laboratórios de diagnóstico com o intuito de distinguir diferentes espécies do complexo MTB e algumas mostraram pertencentes ao *M. bovis*. O método mais utilizado é o de oligotipos espaçadores ou spacer oligotyping ou *Spoligotyping*. Também seguem o padrão de corte *fingerprinting* as técnicas PCRS (*Polymorphic "GC" Repeat Sequence*), DR (*Direct Repeat*), RPLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) (OIE, 2005).

Somando-se às técnicas mencionadas, a reação em cadeia de polimerase em tempo real (*PCR-real time*), MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*) e ISP (*Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms*) também vem sendo implementada com as demais técnicas, na metodologia de diagnóstico rápido de *Mycobacterium bovis*, tornando-se ferramenta para estudos epidemiológicos da transmissão da tuberculose bovina, dando notoriedade a um moderno campo de pesquisa a epidemiologia molecular da transmissão da tuberculose bovina, onde a agilidade e a rapidez na detecção do *M. bovis* podem ser determinantes na escolha desses métodos, que diferenciam as espécies e amostras diferentes de uma mesma espécie ao invés do DNA.

A contaminação cruzada tem sido o grande problema na padronização dos métodos moleculares, a variação nos resultados de diferentes autores quanto a sensibilidade e especificidade deste teste devem-se a muitos fatores como o tipo da amostra utilizada, o emprego de metodologias diferentes no preparo da amostras, no sistema de amplificação e na detecção do produto de amplificado, isto só será extinto com protocolos confiáveis e padronizados por vários laboratórios (OIE, 2005).

3 OBJETIVOS

Tendo em vista a importância do tema à precariedade de dados nacionais sobre tuberculose e micobacterioses em caprinos mediante a necessidade de evitar que essa zoonose se propague, este trabalho tem por objetivo:

1. Verificar se houve processo inflamatório da glândula mamária devido a agentes de mastite ou à presença de *Mycobacterium*.
2. Comparar a frequência de isolamento pelo teste de Ziehl-Neelsen nas amostras de leite e de fragmentos de glândula mamária de caprinos tuberculina positivo.
3. Verificar se as lesões encontradas na glândula mamária apresentam frequência semelhante aos isolados pelo teste de Ziehl-Neelsen em caprinos tuberculina positivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS DE CAMPO

As atividades à campo foram realizadas em um capril onde estava ocorrendo um surto de tuberculose, no Estado de Minas Gerais (MG), em uma propriedade localizada na cidade de Bueno Brandão. O rebanho desta propriedade era composto de cabras das espécies Saanem e Pardo Alpino cuja aptidão predominantemente era a leiteira. O plantel do capril era de 360 animais, sendo colocado em produção 160 animais, com uma produção média diária de três litros de leite com produção total por animal de 480 litros de leite por dia.

O sistema de produção da propriedade era intensivo. O rebanho era alimentado com pastagem de campo, auternando entre brachiaria e capim elefante, sendo está cortada e fornecida aos animais, e silagem. Eram suplementados com farelo de soja, milho e caroço de algodão. O leite destes animais era destinado à fabricação de queijos, dependendo do tipo de queijo a que este era destinado, o leite era pasteurizado e processado na própria propriedade.

Durante o surto todos os animais da propriedade foram submetidos à prova de tuberculinização realizada segundo os critérios de Silva et al. (2006). O resultado obtido da prova de tuberculina consistiu em um total 68 (42,5%) animais positivos, esses foram submetidos ao exame clínico. Dos 68 animais utilizou-se de 60 animais para a coleta de amostras de leite para exame bacteriológico e isolamento de *Mycobacterium bovis*. Foram utilizados 30 animais dos 68 animais tuberculina positiva para se realizar necropsias e desses coletou-se amostras de fragmentos da glândula mamária para exame bacteriológico, isolamento de *M. bovis* e histopatológico.

Cabe destacar que todos os 68 animais foram submetidos aos testes de Tamis e ao California Mastitis Test (CMT), mas coletou-se leite apenas de 60 animais perfazendo um total de 119 amostras de leite ao invés de 120, pois uma glândula encontrava-se seca. O grupo submetido à necropsia não foi previamente selecionado, sendo aleatoriamente retirado do total de animais para este

procedimento. Com o grupo necropsido foram obtidas 60 amostras de glândulas mamárias.

4.2 PROCEDÊNCIA E EXAME CLÍNICO

Foram utilizados pequenos ruminantes da espécie caprina (*Capris hircus*), previamente sensibilizados ao teste de tuberculinização intradérmica cervical comparativo, executado segundo as orientações adotadas no Brasil, para a espécie bovina (BRASIL, 2001a,b). A leitura do teste de tuberculinização intradérmica cervical comparativa foi realizada 72 horas após inoculação da tuberculina nos animais, sendo essa leitura similar à realizada em bovinos de leite como é recomendado por Lesslie, Ford e Linzel, (1960), Cousins et al. (1993), Liébana et al. (1998), Arellano Reynoso et al. (1999), Thorel e Gaumont (1977) e Seva et al. (2002). Os resultados ao teste de tuberculinização com *M. avium* e *M. bovis* lidos às 72 horas pós-sensibilização foram positivas quando o aumento da espessura da dobra da pele induzida pela tuberculina bovina foi superior a reação aviária em pelo menos 2,5 mm; reação inconclusiva quando a diferença entre a tuberculina bovina e à tuberculina aviária ficou situada entre 1,9 e 2,4 mm; e negativa quando a reação bovina ultrapassou a aviária em até 1,8 mm, como foi realizado e recomendado por Silva et al. (2006).

Os animais positivos foram separados do restante do rebanho e submetidos a exames clínicos minuciosos. Foi medido a temperatura, auscultado os batimentos cardíacos, auscultado os movimentos respiratórios que foram classificados num escore de zero a cinco, com a interpretação de negativo a ronco, e a auscultação classificada de normal a secreções viscosas bronquiais (Quadro 3).

Material e Métodos

Escore	Legenda	Interpretação	Auscultação
0	N	Negativo	Normal
1	CG	Crepitação Grossa	> Líquido interior brônquios
2	CF	Crepitação Fina	> Líquidos alveolus
3	II	Inspiração Interrompida	Líquido e viscosidade brônquios
4	S	Sibilo	Muco espesso brônquios
5	R	Ronco	Secreções viscosas brônquios

Quadro 3 - Parametros analisados na auscultação pulmonar, o escore varia de 0 a 5 de acordo com a gravidade das manifestações respiratórias apresentadas

Verificou-se também os movimentos ruminais de cada animal. Nas fêmeas examinou-se o úbere, de cada uma, que foi classificado num escore de zero a quinze, onde se observou clinicamente o parênquima da glândula e o leite. Dentre o escore anteriormente citado o parênquima foi classificado de macio a fibroso, e o leite foi classificado em sem alteração a sem secreção (Quadro 4).

Observação Clínica		
Escore	Parênquima	Leite
0	Macio	Sem Alteração
1	Macio	Seroso
2	Macio	Flocos Pequenos
3	Granulomatoso	Seroso
4	Granulomatoso	Flocos Pequenos
5	Granulomatoso	Grumos
6	Granulomatoso	Grumos com sangue
7	Granulomatoso	Pus
8	Edemaciado	Seroso
9	Edemaciado	Flocos Pequenos
10	Edemaciado	Grumos
11	Edemaciado	Grumos com sangue
12	Edemaciado	Pus
13	Fibrosado	Seroso
14	Fibrosado	Flocos Pequenos
15	Fibrosado	Sem Secreção

Quadro 4 - Escore para os resultados clínicos encontrados no exame clínico da glândula mamária e leite

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

4.3.1 Leite

Anteriormente a realização dos Testes Tamis também denominado *strip cup*, e o CMT, realizou-se a antissepsia dos tetos que foram lavados com solução desinfetante, em seguida secos com papel toalha descartável, e desinfetados utilizando-se algodão embebido em álcool iodado a 2%, principalmente na região do óstio do *ductus papilaris*. Após a realização dos procedimentos anteriormente descritos, procedeu-se a coleta. Coletou-se o leite de todas as fêmeas, desprezando-se os primeiros jatos que foi utilizado para o teste de Tamis, conhecido também com teste de Fundo de Caneca, que recebeu um escore de zero a seis com a interpretação que foi classificada de normal a sem secreção (Quadro 5).

Escore	Legenda	Interpretação
0	N	Normal
1	S	Seroso
2	FP	Flocos Pequenos
3	G	Grumos
4	GS	Grumos com sangue
5	P	Pus
6	SC	Sem secreção

Quadro 5 – Escores na análise do leite em fundo de caneca (TAMIS)

Depois de realizado o teste de Tamis, cada animal foi submetido ao teste CMT, sendo que este recebeu um escore de zero a quatro, com interpretação de negativo a fortemente positivo e com o número de células somáticas indo de 0-100.000/ml a maior que 2.700.000/ml (Quadro 6). Logo após o termino desses testes, as amostras de leite foram colocadas em tubos estéreis e armazenadas e mantidos sob refrigeração.

Escore	Legenda	Interpretação	Células
0	(-)	Negativo	0-100.000/ml
1	T	Traços	100.000-300.000/ml
2	1	Fraco	300.000-900.000/ml
3	2	Nitidamente positivo	900.000-2.500.000/ml
4	3	Fortemente positivo	> 2.700.000/ml

Quadro 6 – Escore para o teste CMT (Califórnia Mastitis Test)

4.3.2 Glândulas Mamárias

As cabras tuberculina positivo após a realização do exame clínico e da coleta de leite, foram submetidas à eutanásia para que pudessem ser submetidas a necropsia, sendo sacrificadas de forma humanitária.

Os animais positivos ao TCC após o exame clínico foram abatidos de forma humanitária. Para este procedimento seguiu-se um protocolo de sedação, para cada animal, com aplicação de acepromazina¹ na dose de 0,2 mg/kg. A seguir, aplicou-se tiopental na dose de 10,0 mg/kg. Para a parada cardio-respiratória, foi administrado 200 a 300 ml de cloreto de potássio² (KCl). Todos os medicamentos utilizados para a realização da eutanásia foram aplicados por via endovenosa.

Os animais após terem sido eutanasiados foram submetidos à necropsia. No decorrer desta buscou-se lesões macroscópicas das glândulas mamárias que condizesse com tuberculose. O úbere de cada animal foi examinado minuciosamente, separando-se a glândula direita da esquerda, onde também observou-se o parênquima mamário de cada glândula. Após o exame, retirou-se três fragmentos do parênquima da glândula mamária, sendo um fragmento com aproximadamente 1,0 cm e dois fragmentos com aproximadamente 2,0 cm cada um. O primeiro fragmento foi coletado de forma mais asséptica possível, sendo colocado em tubo estéril e acondicionado sob refrigeração. Os outros fragmentos do tecido mamário foram colocados em recipiente apropriado contendo formol a 10% e destinados ao exame histopatológico com a finalidade de encontrar lesões microscópicas típicas de tuberculose.

¹ Aceprom 1% (Vetnil®)

² Thiopentax (Critátia®)

Material e Métodos

Deve-se salientar que todo material coletado foi devidamente acondicionado no Laboratório de Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), onde foram mantidos até o processamento das análises.

4.4 EXAMES MICROBIOLÓGICOS DAS AMOSTRAS DE LEITE

De um total de 120 glândulas mamárias examinadas do grupo de 60 animais submetidos à coleta de leite, efetivamente coletou-se 119 amostras de leite, pois uma glândula estava seca.

As amostras de leite que estavam sendo mantidas sob refrigeração, foram descongeladas dentro da geladeira. Após descongelamento, estas foram homogeneizadas e semeadas, com alça estéril, em meio de Ágar Sangue de carneiro (ágar base³ acrescido de 5% de sangue de carneiro) e em caldo de infusão cérebro-coração (caldo BHI⁴) com incubação, respectivamente à 37°C em aerobiose por 24, 48 e 72 horas. Fez-se a leitura das placas de petri com o material semeado nos três tempos com a finalidade de isolar, identificar e classificar os microrganismos detectados no leite que não fossem micobacterias. Os microrganismos isolados foram identificados de acordo com Lennette, Spaunding e Traunt (1985) e classificados segundo Krieg e Holt (1994) e Kreeger-Van-Rig (1984).

A leitura foi realizada durante os três tempos (24, 48 e 72 horas), sendo observadas as seguintes características: aspecto da colônia, coloração, presença ou não de hemólise, qual o tipo de hemólise, se era catalase positiva ou negativa. As características observadas aqui relatadas foram seguidas segundo a metodologia utilizada pelo Laboratório de Doenças Infecciosas pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Fez-se um esfregaço em lâmina das colônias que cresceram no meio de Ágar Sangue, dos três tempos de leitura, para identificar através da coloração de Gram se

³ Blood Agar base – Oxoid – Hampshire.

⁴ Brain Heart infusin – Difco – USA

Material e Métodos

as bactérias encontradas eram gram positivas ou gram negativas. Após a coloração de Gram as lâminas foram observadas em microscópio óptico (Micronal Olympus) nas objetivas de 40 X e 100X de aumento.

Sabendo-se que a bactéria era gram positiva ou negativa, passou-se as provas bioquímicas para poder fechar a espécie da bactéria. Como os microrganismos encontrados foram gram positivos as provas bioquímicas, utilizada foram feitas para a série de *Staphylococcus* spp, onde utilizou-se as seguintes substâncias: maltose, trealose, sacarose, manitol, lactose, uréase e coagulase. Posteriormente a leitura da série e dependendo se não fosse possível fechar a espécie, outras provas foram realizadas, portanto na tentativa de fechar a espécie foi verificada a sensibilidade dos microrganismos as seguintes substâncias: polimixina B, novabiocina e a bacitracina. Com estas provas foi possível chegar à espécie de *Staphylococcus* encontrada nas amostras. Para verificar se as bactérias eram sensíveis ou resistentes, elas foram semeadas no meio de Müller & Hinton Ágar⁵, colocadas em estufa a 37°C e lidas 24 horas após terem sido semeadas. Deve-se destacar que as bactérias do tipo *Corynebacterium* ssp apresentam crescimento mais lento e crescem entre 48 e 72 horas, são pequenas e são gram positivas.

4.5 EXAMES MICROBIOLÓGICOS DOS FRAGMENTOS DE GLÂNDULA MAMÁRIA

Foi coletado fragmentos de 60 glândulas mamárias de 30 cabras necropsiadas. Os fragmentos das glândulas com cerca de 1,0 cm que foi mantido sob congelamento, no momento da semeadura o fragmento foi descongelado, foi mergulhado em álcool etílico 96° G e flambado três vezes para eliminação de contaminação externa do fragmento. Posteriormente foram colocados em Graal estéril, triturado com areia e salina estéril, onde foram macerados com um pistilo. Depois de feito esse processo, colocou-se com alça estéril descartável o conteúdo obtido do macerado sendo semeando em caldo de infusão cérebro-coração (caldo BHI⁶), e meio de Ágar Sangue de carneiro (ágar base⁷ acrescido de 5% de sangue

⁵ Mueller Hinton Agar-Difco

⁶ Brain Heart Infusin – Difco - USA

⁷ Blood Agar base – Oxoid - Hampshire

Material e Métodos

de carneiro). O material que foi semeado em BHI, Ágar Sangue (ágar base acrescido de 5% de sangue de carneiro) foi incubado a 37°C por um período de 24 horas. A leitura dos meio Ágar Sangue foi realizada as 24, 48, e 72 horas visando à observação do crescimento, isolamento e identificação dos microrganismos isolados nas placas de petri. Anteriormente as leituras 48 e 72 horas as amostras que foram semeadas em BHI, no dia seguinte os inóculos do caldo BHI, foram semeadas novamente nos meios de Ágar Sangue e BHI, objetivando um melhor isolamento (Figura 3).

A leitura foi realizada durante os três tempos (24, 48 e 72 horas), sendo observadas as seguintes características: aspecto da colônia, coloração, presença ou não de hemólise, qual o tipo de hemólise, se era catalase positiva ou negativa. As características observadas aqui relatadas foram seguidas segundo a metodologia utilizada pelo Laboratório de Doenças Infecciosas pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Fez-se um esfregaço em lâmina das colônias que cresceram no meio de Ágar Sangue, dos três tempos de leitura, para identificar através da coloração de Gram se as bactérias encontradas eram gram positivas ou gram negativas. Após a coloração de Gram as lâminas foram observadas em microscópio óptico (Micronal Olympus) nas objetivas de 40 X e 100X de aumento.

Sabendo-se a bactéria era gram positiva ou negativa, passou-se a provas bioquímicas para poder fechar a espécie da bactéria. Como os microrganismos encontrados foram gram positivos as provas bioquímicas, utilizadas foram feitas para a série de *Staphylococcus ssp*, onde utilizaram-se as seguintes substâncias: maltose, trealose, sacarose, manitol, lactose, urease, coagulase. Posteriormente a leitura da série e dependendo se não fosse possível fechar a espécie, outras provas foram realizadas, portanto na tentativa de fechar a espécie foi verificada a sensibilidade dos microrganismos das seguintes substâncias: polimixina B, novobiocina e a bacitracina. Com estas provas foi possível chegar à espécie de *Staphylococcus* encontrada nas amostras. Para verificar se as bactérias eram sensíveis ou resistentes, elas foram semeadas no meio de Müller & Hinton Ágar, colocadas em estufa a 37°C e lidas 24 horas após terem sido semeadas (Figura 3).

Material e Métodos

A identificação dos microrganismos isolados foi realizada de acordo com Lennette, Spaunding e Traunt (1985) e classificados segundo Krieg e Holt (1994) e Kreeger-Van-Rig (1984). Para diagnóstico diferencial foi analisado a possibilidade de isolamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* por ser o agente da linfadenite caseosa.

Legenda : **A:** Crescimento bacteriológico das colônias, das amostras, em meio ágar sangue pela técnica de esgotamento, para melhor identificação. **B:** Sério Bioquímica para o gênero *Staphylococcus ssp* para poder se chegar a espécie, sendo (1, 2, 3) a reação que ocorre nos açúcares. As reações 1 e 3 dos açúcares são indicio de negatividade, a reação 2 é um indicativo de positividade. **C:** Prova da uréase, que faz parte da série bioquímica para *Staphylococcus ssp*, sendo 1 indicativo de negatividade da bactéria mediante a prova, 2 indicativo de positividade.

Figura 3 - Microbiológico das amostras de leite e dos fragmentos de glândula mamária

4.6 ISOLAMENTO DE *MYCOBACTERIUM SP* DO PARÊNQUIMA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

- Meios de cultura

Para o isolamento de possíveis micobacterioses foram utilizados os meios de Stonebrink-Leslie e Löwenstain-Jensem (STONEBRINK, 1958; CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988a, b). O meio de Stonebrink foi distribuído em tubos de vidro (18 x 180 mm) com tampa de algodão hidrofóbico em volume de 7,0 ml por tubo. Para o meio de Löwenstain-Jensem foram empregados tubos de vidro (15x 160 mm) com tampa de rosca baquelite, no volume de 5,0 ml por unidade.

- Descontaminação de Petroff

Após o fragmento de glândula ter sido flambado três vezes no álcool etílico, ter sido triturado em Graal estéril, macerado com pistilo com areia e salina estéril e ter sido semeado nos meios de BHI, Ágar Sangue, visando à identificação de outros microrganismos que não fossem micobacterioses. Posteriormente esse fragmento, já macerado, foi descontaminado segundo a técnica de Petroff (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988a,b) e semeados em tubos em meios de Stonebrink-Leslie e Löwenstein-Jensen. Entre três a cinco dias após a semeadura, os tubos com meio de Stonebrink tiveram a tampa de algodão hidrófobo queimado e foram fechados com rolha de cortiça para criação de um ambiente de microaerofilia. Os tubos foram mantidos em posição horizontal, em estufa a 37°C, foram observados semanalmente por um período de até 90 dias onde se observou o crescimento ou não de micobacterias. Passando esses 90 dias os tubos positivos foram submetidos à coloração de Zielh-Neelsen (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988a,b), uma vez confirmada às características de álcool-ácido resistente (BAAR), as amostras foram repicadas para poder ser feita a tipificação do *Mycobacterium*.

4.7 ISOLAMENTO DE *MYCOBACTERIUM SP* DAS AMOSTRAS DE LEITE

- Meios de cultura

Para o isolamento de possíveis micobacterioses foram utilizados os meios de Stonebrink e Löwenstain-Jensem (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988a, b). O meio de Stonebrink foi distribuído em tubos de vidro (18 x 180 mm) com tampa de algodão hidrofóbico em volume de 7,0 ml por tubo. Para o meio de Löwenstain-Jensem foram empregados tubos de vidro (15x 160 mm) com tampa de rosca baquelite, no volume de 5,0 ml por unidade.

- Descontaminação de Petroff

A metodologia empregada, para a descontaminação das amostras de leite coletadas, foi o método de Petroff segundo a forma indicada pelo Centro Panamericano de Zoonosis (1988a,b).

As 119 amostras de leite foram submetidas a este método de descontaminação. Pipetou-se 1,0 ml de leite de cada amostra, que foi colocada em tubos do tipo Falcon previamente identificados. Depois de realizada essa etapa, colocou-se 1,0 ml de hidróxido de sódio (NaOH) juntamente com duas gotas de vermelho de fenol em cada tubo, que em seguida foi colocado em estufa a 37°C por 25 minutos.

Decorrido o tempo estabelecido, o material foi retirado da estufa e submetido ao processo de neutralização, que consiste em colocar com auxílio de conta gotas 1N de ácido clorídrico (HCl), até a viragem do indicador. A viragem do indicador é obtida pela mudança de coloração, que varia de rosa claro a vermelho tijolo.

Passada esta etapa, as amostras foram centrífugas por 20 minutos em uma velocidade de 3000 rotações por minuto (RPM). Após terem sido centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado, trabalhando-se apenas com o sedimento contido nos tubos. O sedimento foi ressuspenso com 1,0 ml de salina a 0,85%, para ser semeado nos meios de Stonebrink-Leslie e Löwestein-Jensen. Os tubos foram homogeneizados com auxílio de Vórtex, e em seguida pegou-se 100 µL da solução final que foi semeado nos meios citados anteriormente. Cada amostra foi semeada em cada meio em duplicata. Entre três a cinco dias após a semeadura, os tubos com

Material e Métodos

meio de Stonebrink tiveram a tampa de algodão hidrófobo queimado e foram fechadas com rolha de cortiça para criação de um ambiente de microaerofilia.

Os tubos semeados foram acondicionados em cubas de plásticos e mantidos em estufa a 37° C, por um período de 90 dias. Durante esse período os tubos foram lidos semanalmente, onde se observou crescimento ou não de colônia de *Mycobacterium sp.* Decorrido o tempo de observação de crescimento ou não do agente, os tubos suspeitos foram submetidos ao exame direto da colônia pela coloração de Ziehl-Neelsen (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1988a,b). Após a confirmação da caracterização de BAAR, as colônias foram encaminhadas para tipificação genética. Cabe destacar que durante o processamento das amostras descou-se três amostras de leite devido ao estado em que se encontravam.

4.8 EXAMES HISTOPATOLÓGICOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Um total de 60 fragmentos da glândula mamária com cerca de 2,0 cm coletados de 30 animais, colocados em recipiente apropriado contendo formol a 10%, foram encaminhados para exame histopatológico no Departamento de Patologia (VPT), com a finalidade de encontrar lesões microscópicas típicas de tuberculose e para ser feita a análise anatomopatológica desses fragmentos. O material foi submetido às técnicas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Posteriormente foi emblocado em parafina, cortado em micrótomo na espessura de 5,0 µm, fixado em lâminas-lamínulas e corado em Hematoxilina-Eosina (H.E) e Ziehl-Neelsen (ZN) com a finalidade de encontrarmos o *Mycobacterium bovis*, e examinados em microscópio óptico comum para a avaliação de alterações histopatológicas.

4.9 IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

Os isolamentos obtidos dos tubos foram identificados pela Seção de Microbiologia – Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pelo método de PRA (PCR-*Restriction Enzyme Analysis*).

4.9.1 Obtenção do DNA

Uma alça da colônia de micobactérias foi suspensa em 500 µL água estéril, fervida por dez minutos e congelada a -20° C por pelo menos 18 horas (CHIMARA et al., 2004).

4.9.2 PCR *Restriction Enzyme Pattern Anaysis* (PRA)

O PRA é uma técnica de identificação da PCR, realizada segundo Telenti (1993), que consiste na amplificação do gene *hsp65*, seguida da digestão com duas enzimas de restrição (*HaeIII* e *BstEII*). As condições utilizadas para a PCR foram às seguintes: 50 mM KCL, 10 mM TRIS-HCL (pH 8.3), 1,5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 200µM dNTPs 0,5 µM de cada iniciador (Tb11: 5' – ACCAACGATGGTGTGTCCAT e Tb 12: 5' – CTTGTCTGAACCGATATACCT) e 1,25 unidades de Taq polimerase. As reações foram realizadas em tubos de polipropileno num volume final de 50µL e submetidas a um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por dez minutos, seguidos de 45 ciclos de amplificação com um minuto a 95°C, um minuto a 60°C e um minuto a 72 °C e um ciclo de extensão final a 72°C por sete minutos.

As reações enzimáticas foram realizadas num volume final de 20 µL da seguinte maneira: 2 µL de água, 2 µL de tampão enzima, 1 µL de enzima e 15 µL do produto da PCR. No caso das digestões com *BstEII* a incubação foi efetuada a 60°C

Material e Métodos

por aproximadamente quatro horas e no caso das digestões procedidas com *HaeIII* a incubação foi realizada a 37°C por aproximadamente três horas.

As amostras digeridas foram amplificadas em gel de agarose 4%, submetidas à eletroforese com 100 volts por aproximadamente duas horas e visualizadas em aparelho transiluminador, após serem coradas com brometo de etídio. Foram utilizados marcadores moleculares (25bp e 50bp ladder – Gibco/BRL) para o cálculo dos tamanhos das bandas obtidos.

Os padrões de restrição obtidos após digestão foram analisados conforme Devallois, Goh e Rastogi (1997) e pelo site PRASITE (<<http://app.chuv.ch/prasite/index/html>>).

Foram examinadas as glândulas mamárias de 30 cabras posterior ao teste de tuberculinina segundo Silva et al. (2006), sendo que após a necropsia destes animais verificou-se que 66,66% destes foram positivos na cultura de linfonodos e/ou pulmão e 70% foram positivos na PCR de linfonodos e/ou pulmão.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a averiguação das hipóteses levantadas para o presente estudo, utilizou-se o teste de exato de Fisher, sendo adotado como nível de significância um valor de P de 0,05 ($P \leq 0,05$), realizado pelo *software* Graphapad Software Statistical (1993).

Legenda : **A:** Observa-se áreas de aderência (►) da pleura parietal à visceral na região anterior esquerda do pulmão(P). **B:** Pode ser visualizada (►) uma pequena área circular, de aproximadamente 0,5 cm, deprimida, de coloração amarelo acinzentada com halo vermelho escuro ao redor caracterizando um nódulo tuberculoso. **C** Observa-se uma (►) área no parênquima pulmonar que ao corte tinha o aspecto caseoso, caracterizando uma lesão granulomatosa típica de tuberculose. **D:** Na região dorsal do lado direito do pulmão havia uma nodulação de aproximadamente 2,0 a 5,0 centímetros, arredondada, de coloração amarelo acinzentado.

Figura 4 - Necropsia de caprinos com tuberculose

Legenda : . **A:** Observa-se (►) áreas severas de congestão no pulmão, H.E. aumento 10X **B:** Observa-se (►) severa área de infiltrado inflamatório MN e moderada de PMN no pulmão, H.E aumento 10X. **C** Observa-se (►) área de necrose caseosa com presença de calcificação na região central, com presença severa de infiltrado inflamatório MN e PMN, envolto por cápsula de tecido conjuntivo, com severa formação granulomatosa, H.E aumento 10X. **D:** Observa-se (►) células de Langerhans em meio ao infiltrado inflamatório na região granulomatosa da lesão pulmonar, H.E aumento 20X.

Figura 5 - Fotomicrografia de corte histológico do pulmão do animal 474

Nas figuras 4 e 5 observa-se lesões pulmonares dos achados de necropsia e histopatológico dos animais que participaram deste estudo.

5 RESULTADOS

Os resultados relatados a seguir são referentes à metodologia empregada no presente estudo.

5.1 EXAME CLÍNICO

Durante o exame clínico dos 68 animais, perfazendo um total de 136 glândulas mamárias, efetivamente examinou-se 134 glândulas, pois a cabra de número 81 era nulípara. Algumas das manifestações clínicas indicativas da tuberculose associadas à auscultação pulmonar foram emaciação, glândulas mamárias edemaciadas e secreção nasal muco-purulenta (Figura 6).

Para os testes de Tamis e CMT, foram examinadas 133 glândulas, devido ao problema apresentado pelo indivíduo citado anteriormente, a fêmea de número 420 não apresentava secreção láctea na glândula esquerda. Os dados observados encontram-se no apêndice A.

- Auscultação Pulmonar

Durante o exame pulmonar das cabras os resultados obtidos encontraram-se entre o escore 0 e 1, segundo os padrões estabelecidos para o estudo localizados no quadro 1, com a seguinte interpretação: negativo-normal e crepitação grossa-> líquido interior brônquios. Ao realizar a auscultação pulmonar de todo o grupo não foi possível notar alterações a auscultação em 44 (64,70%) das cabras, e 24 (35,30%) apresentaram alterações pulmonar com aumento de líquido nos brônquios. Os animais com alteração na auscultação apresentaram frequência maior estatisticamente ($P = 0,001$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Resultados obtidos pelo exame clínico através da auscultação pulmonar dos 68 caprinos positivo

- Observações Clínicas da Glândula Mamária

Para o escore clínico da glândula mamária e do leite, foram examinadas pela palpação 134 mamas, cujos resultados apresentados estavam entre os escores 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13 e 14, interpretados como (parênquima-leite): macio-sem alteração, macio-seroso, macio-flocos pequenos, granulomatoso-seroso, granulomatoso-grumos, granulomatoso-flocos pequenos, granulomatoso-pus, edemaciado-seroso, edemaciado-grumos, edemaciado-pus, fibrosado-seroso e fibrosado-flocos pequenos. Do total de 134 glândulas mamárias examinadas, foram classificados como 50 (37,31) macio-sem alteração, 6 (4,47%) macio-seroso, 1 (0,74%) macio-flocos pequenos, 40 (29,85%) granulomatoso-seroso, 4 (3,00%) granulomatoso-flocos pequenos, 3 (2,24%) granulomatoso-grumos, 3 (2,24%) granulomatoso-pus, 3 (2,24%) edemaciado-seroso, 18 (13,43%) fibrosado-seroso e 6 (4,47%) fibrosado-flocos pequenos (Gráfico 2) Houve predomínio nos animais com as seguintes características: 50 (37,31) macio-flocos pequenos, 40 (29,85%) granulomatoso-seroso, 18 (13,43%) fibrosado-seroso ($P \leq 0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Resultado do exame clínico da glândula mamária obtidos pela palpação do parênquima mamário dos 68 animais positivos à tuberculina

- Teste de Tamis

Os resultados encontrados no presente estudo para o teste de Tamis de um total de 136 glândulas efetivamente analisadas, foi possível a realização do teste em apenas 133 glândulas. Os resultados obtidos ficaram entre os escores 0, 1, 2, 3 e 5, sendo interpretado como normal, seroso, flocos pequenos, grumos e pus. De um total de 133 mamas analisadas 102 (76,70%) apresentaram-se normal, 8 (6,01%) seroso, 4 (3,01%) flocos pequenos, grumos 16 (12,03%) e pus em 3 (2,25%) se mostram com pus (Gráfico 3). Houve frequência estatisticamente maior nas amostras que apresentaram leite sem alteração na prova de tamis ($P = 0,0001$).

Gráfico 3 - Resultado do teste de Tamis realizado nas 68 cabras tuberculina positivos

- Teste CMT

Para Califórnia Mastitis Test do total de 136 glândulas examinadas, efetivamente realizou-se o teste em apenas 133 animais. Os resultados apresentados por essa mamas encontraram-se entre os escores 0, 3 e 4 interpretados como negativo, duas cruzes e três cruzes. Do total de animais submetidos ao CMT, 27 (20,30%) mostraram-se negativos, 103(77,44%) duas cruzes e 3 (2,25%) três cruzes (Gráfico 4). As amostras com CMT duas cruzes apresentaram frequência maior estatisticamente do que as outras ($P=0,0001$) e as amostras negativas foram mais frequentes estatisticamente ($P=0,0001$) do que as amostras CMT três cruzes.

Gráfico 4 - Resultado da distribuição dos achados encontrados no teste CMT, dos 68 caprinos durante a realização desse exame

Legenda : **A:** Observa-se animal em debilitada condição corporal (*). **B:** Nota-se secreção nasal mucopurulenta indicando processo pneumônico bacteriano. **C:** Observa-se glândula mamária avermelhada e edemaciada caracterizando a mastite clínica. **D:** Observa-se secreção de pus (►) da glândula mamária submetida ao teste de Tamis indicando mastite clínica.

Figura 6 - Exame clínico e realização do teste de Tamis das cabras submetidas ao estudo

5.2 EXAME MICROBIOLÓGICO DAS AMOSTRAS

Das 119 amostras que foram submetidas a essa análise laboratorial 65 (54, 62%) foram isolados microrganismos e 54 (45,38%) das amostras não se verificou a presença de microrganismos. As frequências de isolamento positivos e negativos não se observou diferença estatisticamente significativa ($P=1,00$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Resultados que representam o total de glândulas mamárias (GM) que foram passíveis de isolamento mediante as que não foram passíveis a nenhum tipo de isolamento no diagnóstico microbiológico das amostras de leite

Perante as 65 amostras de leite que observou-se crescimento bacteriológico, foram encontrados 64 (98,46%) de *Staphylococcus* spp e 1 (1,54%) de *Corynebacterium* sp. Ao serem analisadas as frequências de microrganismo que apresentaram cultura positiva distribuídas em *Staphylococcus* spp e *Corynebacterium* sp portanto a frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp. foi maior ($P= 0,001$) que a frequência de isolamento de *Corynebacterium* sp.

Os *Staphylococcus* spp que foram passíveis de isolamento, encontraram-se distribuídos da seguinte maneira: 18 (28,12%) *S. epidermides*, 12 (18,75%) *S. kloosii*, 6 (9,37%) *S. simulans*, 5 (7,81%) *S. intermedius*, 4 (6,25%) *S. equorum*, 3 (4,70%) *S. warneri*, 3 (4,70%), *S. hominis subsp. hominis*, 2 (3,12%) *S. xylosus*, 2 (3,12%) *S. caprae*, 2 (3,12%) *S. lentis*, 1 (1,56%) *S. chromogenes*, 1 (1,56%) *S. auricularis*, 1 (1,56%) *S. haemolyticus*, 1 (1,56%) *S. scheeleiferi subsp. coagulans*, 1 (1,56%) *S. vitulus* e 2 (3,12%) de *Staphylococcus* spp que não foram identificados (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado das bactérias isoladas das amostras de leite do grupo de 60 animais

Bactérias isoladas do leite	Total
<i>S. epidermides</i>	18
<i>S. kloosii</i>	12
<i>S. simulans</i>	06
<i>S. intermedius</i>	05
<i>S. equorum</i>	04
<i>S. warneri</i>	03
<i>S. hominis</i>	03
<i>S. lentis</i>	02
<i>S. caprae</i>	02
<i>S. xylosus</i>	02
<i>S. auriculares</i>	01
<i>S. chromogenus</i>	01
<i>S. haemolyticus</i>	01
<i>S. scheleiferi</i>	01
<i>S. vitulus</i>	01
<i>Staphylococcus spp</i>	02
<i>Corynebacterium sp</i>	01

Os 62 *Staphylococcus* spp. identificados, verificou-se que 56 (90,32%) foram *Staphylococcus* coagulase Negativa (SCN) e 6 (9,68%) *Staphylococcus* coagulase Positiva (SCP) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados do *Staphylococcus* spp isolados nas amostras de leite divididos em grupos de *Staphylococcus* coagulase Negativa (SCN) e *Staphylococcus* coagulase Positiva (SCP)

<i>Staphylococcus</i> spp	SCN (N/56)%	SCP(N/6)%
<i>S. epidermides</i>	18 (32,14%)	-
<i>S. kloosii</i>	12(21,43%)	-
<i>S. simulans</i>	06(10,71%)	-
<i>S. intermedius</i>	-	05 (83,33%)
<i>S. equorum</i>	04(7,14%)	-
<i>S. warneri</i>	03(5,36%)	-
<i>S. hominis</i>	03(5,36%)	-
<i>S. lentis</i>	02(3,57%)	-
<i>S. caprae</i>	02(3,57%)	-
<i>S. xylosus</i>	02(3,57%)	-
<i>S. auriculares</i>	01(1,80%)	-
<i>S.chromogenus</i>	01(1,80%)	-
<i>S. haemolyticus</i>	01(1,80%)	-
<i>S. scheleiferi</i>	-	01 (16,66%)
<i>S. vitulus</i>	01(1,80%)	-

5.3 COMPARAÇÃO DO TESTE DE TAMIS E DO MICROBIOLÓGICO DAS AMOSTRAS DE LEITE

Quando comparou-se os resultados microbiológicos do leite com os achados encontrados perante o teste de Tamis, das 119 glândulas cujo leite foi analisado notamos que 58 (48,74%) amostras apresentaram isolamento bacteriológico e 61 (51,26%) não apresentaram isolamento.

Das 58 amostras que apresentaram isolamento no exame microbiológico verificou-se que o Tamis apresentou os seguintes resultados: normal 45 (77,58), seroso 4 (6,89%), presença de grumos 6 (66,66%), flocos pequenos 2 (22,22%) e pus em 1 (11,11%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação dos resultados dos 60 caprinos tuberculina positivo, entre os achados do teste Tamis e os achados do Bacteriológico das amostras de leite

Tamis		Total	
	Com Isolamento	Sem Isolamento	Bactérias Isoladas
Normal	45	46	49*
Serosa	4	2	2
Flocos Pequenos	2	2	2
Grumos	6	9	8*
Pus	1	2	2

* há amostras com dois isolamentos bacterianos

As análises estatística do teste de Tamis foram divididas em Tamis negativo (normal) e Tamis positivo (seroso, flocos pequenos, grumos e pus), obteve-se assim 45 (77,59%) Tamis negativo e 13 (22,41%) Tamis Positivo em isolados de cultura positiva, e 46 (75,41%) Tamis negativo e 15 (24,59%) Tamis positivo em isolados de cultura negativa (Gráfico 6). Os dados citados anteriormente foram examinados encontrando-se um P valor igual a 0,8312 ($P=0,8312$) não sendo estatisticamente significativo (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise estatística entre o teste de Tamis e o exame bacteriológico

Tamis	Cultura +	Cultura -	Total
Negativo	45	46	91
Positivo	13	15	28
	58	61	

*P= 0,8312

Gráfico 6 - Resultados do teste de Tamis comparados ao diagnóstico do exame bacteriológico em relação às amostras de leite que apresentaram cultura positiva e cultura negativa ao microbiológico do leite

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS ACHADOS DO TESTE CMT E MICROBIOLÓGICO DO LEITE

Das 119 glândulas que foram submetidas ao California Mastitis Test (CMT) analisando-se os resultados que foram obtidos através da analogia feita diante das duas formas de diagnóstico, foram encontrados 59 (49,58%) tiveram isolamento de microrganismos e 60 (50,42%) sem isolamento bacteriano.

As 59 amostras de leite com isolamento e submetidas ao CMT (negativo, 2+ e 3+) distribuíram-se da seguinte forma: 6 (10,17%) foram negativa, 51 (86,44%) duas cruzes e 2 (3,39%) três cruzes (Gráfico 7).

* amostras com 2 crescimentos bacterianos

Gráfico 7- Resultados obtidos através da comparação entre o diagnóstico do CMT e o diagnóstico bacteriológico das amostras de leite que apresentaram crescimento bacteriano

Os resultados do CMT juntamente com os resultados microbiológico do leite cultura positivo e cultura negativa não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P=1,000$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise estatística entre o CMT e o exame bacteriológico

CMT	Cultura +	Cultura -	Total
Negativo	6	7	13
2+	51	51	102
3+	2	2	04
	59	60	

* $P=1,00$

Ocorreram 7 isolamentos de *Staphylococcus ssp.* das 6 amostras de leite referentes ao diagnóstico de CMT negativo, distribuídos da seguinte forma: 2

Resultados

(28,57%) *S. epidermides*, e 1 (14,29%) de *S. intermedius*, *S. auriculares*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. equorum*. Pode-se observar que os SCN apareceram maior frequência 6 (85,71%) enquanto os SCP foram isolados de apenas 1 (14,29%).

De um total de 57 bactérias isoladas no CMT duas cruzes foram observadas as seguintes bactérias 1 (1,75%) de *Corynebacterium sp*, e 56 (98,24%) de *Staphylococcus ssp*, sendo que não foi possível fechar a espécie de dois *Staphylococcus ssp*. De 54 (94,73%) *Staphylococcus ssp* em que foram estabelecidas as espécies quando correlacionadas ao CMT duas cruzes verificou-se a seguinte distribuição: 15 (27,80%) *S. epidermides*; 12 (22,22%) *S. kloosii*; 5 (9,25%), *S. simulans*, 4 (7,41%); *S. intermedius* e *S. equorum*; 3 (5,55%) *S. hominis*; 2 (3,70%) *S. lentis*, *S. warneri* e *S. caprae* e 1 (1,85%) *S. xylosus*, *S. sheleiferi*, *S. haemolyticus*. Entre as bactérias isoladas os *Staphylococcus* coagulase negativa foram as de maior frequência perfazendo um total de 49 (88,88%) dos *Staphylococcus* identificados, enquanto os *Staphylococcus* coagulase positivo apresentaram 5 (9,26%) dos isolados.

Das duas amostras de leite positivas no diagnóstico do CMT três cruzes com isolamento foram identificados 1 (50,00%) de *S. epidermides* e 1 (50,00%) de *S. simulans* todos SCP (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Resultados das espécies de *Staphylococcus ssp* identificadas distribuídas em *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) análogas ao diagnóstico do CMT

5.5 MICROBIOLÓGICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Os resultados observados no diagnóstico microbiológico das glândulas mamárias foram referentes ao grupo de 30 animais que foram submetidos à necropsia, perfazendo um total 60 fragmentos de glândula coletados. Do total de 60 fragmentos submetidos ao exame bacteriológico, apresentaram isolamento bacteriano 6 (10,00%) dos fragmentos submetidos a análise diagnóstica e 54 (90,00%) não houve isolamento. Do total de 6 fragmentos com isolamento na glândula todas as bactérias isoladas eram *Staphylococcus* spp, que encontraram-se distribuídas da seguinte maneira 2 (33,33%) *S. intermedius* e *S. simulans*, 1 (16,66%) *S. kloosii* e *S. caprae*. Das espécies identificadas foram obtidos 2 (33,33%) de SCP e 4 (66,66%) SCN.

Das 6 bactérias identificadas apenas 1 (16,67%) apresentou alteração no teste de Tamis, sendo isolado *S. intermedius*. Quando se fez o mesmo tipo de analogia com o teste CMT os resultados encontrados se distribuiu da seguintes forma: 2 (33,33%) de isolados CMT negativo sendo todos *S. simulans*, e 4 (66,66%) CMT duas cruzes onde foi possível detectar ao isolamento as seguintes bactérias 2 (50,00%) de *S. intermedius* e 1 (25,00%) de *S. caprae* e *S. Kloosii*.

Das amostras analisadas 5 (90,00%) apresentaram isolamento tanto no leite quanto na glândula, sendo 3 (60,00%) CMT negativo e 2 (40,00%) CMT duas cruzes. Para o CMT negativo houve crescimento bacteriano tanto no leite como na glândula de *S. intermedius*, e *S. epidermides* do leite, onde na glândula se obteve crescimento de *S. simulans*.

Nas amostras CMT duas cruzes obteve-se isolamento de *S. epidermides* no leite enquanto que na glândula detectou-se *S. kloosii*. Não foi possível identificar a espécie de um *Staphylococcus* ssp do leite e na glândula detectou-se *S. caprae*. Os resultados aqui supracitados encontram-se na tabela 6.

Resultados

Tabela 6 - Resultados das bactérias isoladas comparadas ao crescimento bacteriológico das amostras dos fragmentos de glândula mamária e das amostras do leite pertencentes a animais em comum aos dois grupos que apresentaram crescimento no exame bacteriológico

Espécies Isoladas	Glândula Mamária	Microbiológico		
		(N/23) %	Leite	(N/6) %
<i>S. epidermides</i>	12	52,17%	-	-
<i>S. intermedius</i>	1	4,35%	2	33,33%
<i>S. warneri</i>	1	4,35%	-	-
<i>S. simulans</i>	1	4,35%	2	33,33%
<i>S. kloosii</i>	2	8,69%	1	16,67%
<i>S. hominis</i>	1	4,35%	-	-
<i>S. caprae</i>	-	-	1	16,67%
<i>S. scheleiferi</i>	1	4,35%	-	-
<i>S. vitulis</i>	1	4,35%	-	-
<i>S. xylosus</i>	1	4,35%	-	-
<i>S. equorum</i>	1	4,35%	-	-
<i>Staphylococcus ssp</i>	1	4,35%	-	-
Total	23	100%	6	100%

5.6 ISOLAMENTO DE *MYCOBACTERIUM SP* DAS AMOSTRAS DE LEITE

Os resultados do isolamento de *Mycobactrium sp* no leite das 116 amostras de leite coletada do grupo de 60 cabras, foram semeadas em duplicata nos tubos de Stonebrink e Löwenstain-Jensem verificou-se 12 (10,34%) amostras suspeitas com crescimento no meio de Stonebrink. Os tubos de Stonebrink suspeitos foram sujeitos ao exame direto realizado pela coloração de Zielh-Neelsen. Das amostras suspeitas 5 (4,31%) apresentaram característica típicas de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) sendo consideradas positivas.

5.7 ISOLAMENTO DE *MYCOBACTERIUM SP* DA GLÂNDULA MAMÁRIA

De um total de 60 amostras de fragmentos de glândula mamária que cresceram no meio de Stonebrink, verificou-se 5 (8,33%) amostras suspeitas. As amostras de glândula suspeitas foram submetidas ao teste de Ziehl-Neelsen examinados direto das colônias dos tubos de Stonebrink, apenas 1 (1,66%) mostrou-se positivo ao teste com características de BAAR, sendo um indício de *M. bovis* (Gráfico 9). Os resultados que foram encontrados pelo teste de Fisher entre as análises relacionadas anteriormente não apresentaram diferenças significativas (Tabela 7).

Gráfico 9 - Resultados dos isolamentos de *Mycobacterim bovis* com crescimento nos tubos de Stonebrink que apresentaram-se positivos e negativos ao exame direto pela metodologia de Ziehl-Neelsen

Tabela 7 - Análise estatística dos resultados de isolados do leite e da glândula mamária em relação ao teste de Zielh-Neelsen

Isolamento TB	ZN+	ZN -	Total
Leite	5 (4,31%)*	111(95,69%)	116
Glândula	1(1,66%)*	59(98,33%)	60
	6	170	

* $P= 0,6654$

5.8 RESULTADOS PATOLÓGICOS

5.8.1 Anatomopatológico da glândula mamária

Observou-se durante a realização do exame *post mortem* das 60 glândulas mamárias dos 30 animais que foram submetidos ao exame, lesões suspeitas de infecções micobacterianas em 5 (8,33%) das 60 glândulas mamárias, sendo que dessa cinco apenas 3 (5,00 %) apresentaram macroscopicamente com lesões típicas de tuberculoses (Figura). As lesões eram nodulares com cerca de 1,0 a 2,0 cm de diâmetro de coloração branco - amarelada com presença de cápsula de aspecto caseoso que a superfície de corte evidenciava-se material de consistência calcárea. Devido os animais submetidos ao estudo estarem sem ser ordenhados as outras 2 passaram a ser consideradas macroscopicamente como suspeitas

Legenda: **A** Observa-se a glândula mamária (GM) com áreas císticas, contendo secreção láctea levemente avermelhada. **B** Foram observados alguns (►) nódulos de 1,0 a 2,0 cm no parênquima mamário de coloração amarelo acinzentado. **C** Ao corte, esses (►) nódulos apresentavam conteúdo caseoso que rangia ao corte. **D**: Observação do conteúdo (►) lácteo normal na glândula mamária

Figura 7 - Necropsia da glândula mamária de caprinos tuberculina positiva

5.8.2 Histopatológico

Microscopicamente as lesões de tuberculose na glândula mamária de cabras tuberculina positivo foram observadas em 7 (11,77%) dos 60 fragmentos de glândula analisados. As lesões apresentavam infiltrado inflamatório MN e PMN com grande quantidade de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e alguns neutrófilos que foram evidenciados na região intersticial da glândula sendo associado a mastite crônica. Em algumas amostras foram notadas mais de uma lesão granulomatosa, apresentavam vasos congestionados com presença de células plasmáticas. Algumas lesões não apresentaram a formação granulomatosa bem definida (Figura 8).

Legenda : **A:** Observa-se presença de leite (►) nos ácinos da glândula mamária (**GM**), H.E aumento 10X . **B:** Observa-se (►) severa área de infiltrado inflamatório MN e PMN na região intersticial da glândula mamária, H.E. aumento 20x,. **C e D:** Observa-se área de (►) necrose caseoas com presença de calcificação na região central, apresentando severo infiltrado inflamatório MN e PMN, envolta por cápsula de tecido conjuntivo, com formação granulomatosa, H.E. aumento 4X e 10X (**C e D**)

Figura 8 - Fotomicrografia de corte histológico da glândula mamária do animal 474

Das 7 glândulas que apresentaram lesão 4 (57,14%) estavam localizadas na glândula direita e 3 (42,86%) localizaram-se na glândula esquerda. As lesões encontradas foram classificadas dentro de um padrão estabelecido com a finalidade de padronização do tamanho das lesões encontradas em relação ao campo de visão microscópica com objetivo de determinar o tamanho e gravidade do processo granulomatoso. O campo microscópico foi dividido em adotando-se um escore de uma cruz (1+) a quatro cruzes (4+), sendo estabelecidas as seguintes percentagens conforme o escore: 0-12,5%, 25-37, 5%, 50-62,5% e 80-100%.

Resultados

Todas as lesões suspeitas de serem causadas pelo *Mycobacterium* ficaram classificadas no escore 4+, esse resultado demonstrou a gravidade dos achados na glândula.

Os resultados de cada glândula obtidos pelo diagnóstico histopatológico seguem em apêndice B.

Os resultados apresentados no exame microbiológico da glândula mamária, onde foram encontrados 6 (10%) de cultura positiva e 54 (90%) de cultura negativa ao comparamos os dados do isolamento com os achados histológicos com presença de lesão e sem presença de lesão, não sendo encontrado um P valor igual 1,277 não sendo significativo (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise estatística dos resultados histopatológicos e microbiológicos da glândula mamária

Histopatológico	Cultura +	Cultura -	Total
Positivo	6	54	60
Negativo	0	0	0
	6	54	

*P= 1,277

5.8.2.1 Estudos entre o processo inflamatório crônico e o processo de reparo dos achados histopatológico da glândula mamária

Foram observados 7 (11,66%) lesões histologicamente compatíveis com processos granulomatosos causados por *Mycobacterium*, 18 (30%) processos de reparo, sendo que do total de glândulas que não apresentou nenhum tipo de processo, sendo portanto consideradas negativas 35 (58,33%) do total de 60 fragmentos analisados (Tabela 9).

A comparação entre processo inflamatório histopatologicamente compatível com tuberculose e processo negativo histologicamente para tuberculose demonstrou que houve maior frequência deste último ($P = 0,023$).

Quando comparou-se o processo inflamatório histopatologicamente compatível com tuberculose e processo de reparo verificou-se que houve maior frequência do processo de reparo ($P = 0,001$).

Resultados

A frequência de processo de reparo e a frequência de processo negativo histologicamente para tuberculose observou-se que houve maior frequência dos processos negativos ($P = 0,0031$).

Apesar da presença de processo de reparo não ser o único indicativo de que houve tuberculose, decidiu-se somar as glândulas que apresentaram processo inflamatório histopatologicamente compatível com tuberculose e processo de reparo, pois os animais foram diagnosticados positivos para tuberculose e há possibilidade do processo de reparo estar associado à doença. Desta forma verificou-se que os resultados das frequências dos dois processos 25 (41,66%), cruzados com a frequência de resultados histopatológicos negativos 35 (58,33%) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($P=1,000$).

Tabela 9 – Análise estatística entre os achados histológicos da glândula mamária

Histologico	Reparo +	Processo Inflamatório Crônico
+ n/60%=f*	n/60%=f*	n/60%=f*
- n/60%=f*		
Total		

*f= resultados encontrado das frequências

5.8.2.2 Estudos entre os Resultados Histológicos e os Resultados do teste de Ziehl-Neelsen nas Amostras de Leite e dos Fragmentos de Glândula Mamária

Foram observadas as frequências de 11,66% de processos inflamatórios histologicamente compatível com tuberculose, 1,66% de fragmentos positivos ao teste de ZN, de um total de 60 fragmentos de glândulas mamárias, e 4,31% de amostras de leite positivas para o *M. bovis*, de um total de 116 amostras de leite

A comparação entre as frequências do processo inflamatório histologicamente compatível com tuberculose e dos fragmentos de glândula mamária positivos para *Mycobacterium*, demonstrou que não ocorreu diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0612$).

A frequência de processo inflamatório histologicamente compatível com *Mycobacterium*, e a frequência de amostras de leite positivas para o *M. bovis*, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,01103$) entre as frequências

Foram somadas as frequências das glândulas que apresentaram processo inflamatório histopatologicamente compatível com tuberculose e processo de reparo, cruzados com a frequência dos resultados positivos da glândula mamária no teste de ZN. Observou-se respectivamente os resultados das frequências, 41,66% e 1,66%, apresentou uma diferença significativa ($P = 0,0001$), portanto verificou-se que houve uma maior frequência da soma das frequências dos processos.

Quando se comprou o resultado da soma das frequências do processo inflamatório dos achados histológicos compatíveis à tuberculose, e do processo de reparo (41,66%), cruzados com os resultados da frequência das amostras de leite positivas ao *M. bovis* (4,31%), observou-se que houve maior frequência ($P = 0,0001$) da soma entre as frequências dos processos histologicamente compatíveis com tuberculose que a de isolados de *M. bovis* das amostras de leite

O resumo dos resultados do estudo dos caprinos positivo à tuberculinização encontram-se no apêndice C.

6 DISCUSSÃO

As discussões foram dispostas como os achados estabelecidos nos resultados sendo dividida em Mastites casadas por *Staphylococcus ssp* e *Corynebacterium ssp* e Mastites causadas por *Mycobacterim bovis*

6.1 MATITES CAUSADAS POR *STAPHYLOCOCCUS SSP* E OUTRAS BACTÉRIAS

6.1.1 Cultura microbiológica do leite e dos fragmentos de glândula mamária

A modernização tecnológica a que tem sido submetida às criações de caprinos, tem contribuído para o incremento da produção leiteira. Contudo, a mastite, processo inflamatório da glândula mamária, representa um entrave a esse incremento produtivo (SMITH; ROGUINSKY, 1977). A doença é responsável por prejuízos econômicos, representados pelo descarte do leite, custos com medicamentos, assistência veterinária, aumento da mão de obra, redução na quantidade e qualidade de leite e produtos lácteos (DULIN et al., 1983; LEWTER et al., 1983; BARROS; LEITÃO, 1992; DEGRAVES; FETROW, 1993). Em paralelo ao aspecto econômico deve-se ressaltar a relevância em saúde pública, pois muitos agentes etiológicos da mastite e/ou suas toxinas apresentam potencial zoonótico (LANGONI; ARAUJO; VITÓRIA, 2004).

Sabendo-se da importância do leite e seus derivado como via de transmissão de patógenos em decorrência ao consumo de produtos lácteos *in natura*, de erros de pasteurização, adulteração do leite da sua comercialização de forma clandestina (BOBENRIETH; BELTRAN, 1984), manter a higidez da glândula mamária associadas a práticas de manejo durante e após a ordenha, o estado sanitário do rebanho juntamente com a saúde do ordenhador, são formas importantes para tentar diminuir a transmissão de zoonoses por essa importante via alimentar.

Discussão

Segundo a OMS, o leite é responsável pela veiculação de sete enfermidades víricas e 16 agentes bacterianos, dentre estes a tuberculose (BRANDÃO, 1994), além dos agentes considerados emergentes como: os *Staphylococcus* principalmente os causadores de enterotoxinas (GUIMARÃES; LANGONI, 2009).

Por todas essas razões é importante o diagnóstico de mastite em caprinos, bovinos e outras espécies domésticas que fazem parte da cadeia alimentar do homem.

Testes como o California Mastitis Test (CMT) que é um método indireto de diagnóstico de fácil aplicabilidade dando uma idéia muito aproximada da situação do rebanho, sendo um método amplamente difundido como auxiliar no diagnóstico de mastite em bovinos, e utilizado como teste de triagem da saúde da glândula mamária caprina (SCHALM; NOORLANDER, 1957; SILVA et al., 2001). Esse método mede indiretamente a concentração de leucócitos no leite, que em caprinos deve ser utilizado com algumas restrições devido ao maior número de células somáticas presentes em seu leite. Sendo assim para essa espécie deve-se considerar como negativos os três primeiros níveis: negativo (-); duvidoso (+/-) e fracamente positivos (+). Somente valores acima destes, ou seja, positivo (++) e fortemente positivo (+++) é que devem ser considerados como infecção instalada. (SMITH; ROGUINSKY, 1977; CONTRERAS et al., 1996). Com a finalidade de se evitar falsos positivos deve ser associado ao exame microbiológico do leite devido à fisiologia da glândula mamária caprina.

O teste de Tamis é uma pratica que deve ser rotineiramente utilizada nessa espécie objetivando a detecção de mastite clínica, devendo estar associado a procedimentos de limpeza e higienização dos tetos sendo estes de fundamental importância ao controle da carga microbiana inicial do leite e disseminação de patógenos para outros animais A associação das três formas diagnóstica é de fundamental importância para o controle da saúde da glândula mamária (CASTRO, 1984).

Do grupo de 60 animais submetidos ao exame clínico e a coleta das amostras de leite, sendo efetivamente examinadas e submetidas à coleta 119 glândulas, foram coletadas amostras de leite para exame bacteriológico, obtendo-se 65 (54,62%) de amostras com isolamento e 54 (45,38%) sem nenhum crescimento

Discussão

bacteriano, portanto negativas. Segundo as frequências obtidas entre as culturas positivas e negativas pela análise do valor de P ($P=1,00$), não sendo significativo, este fato ocorreu devido os animais estarem em fase de secagem.

Os achados bacteriológicos para culturas positivas 65 (54,62%) distribuíram-se segundo a classificação das colônias em: 64 (98,46%) de *Staphylococcus ssp* e 1 (1,54%) de *Corynebacterium sp*. Perante os dados encontrados o *Staphylococcus ssp* foram os isolados com maior frequência, sendo considerados os agentes de maior causa de infecções intramamária (IMM) em caprinos e ovinos, e os *Corynebacterium ssp*, que foram isolados em menor número, também causam IMM em pequenos ruminantes porém em menor grau (GOMES et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007).

Ao se analisar as frequências de microrganismo que apresentaram cultura positiva distribuídas em *Staphylococcus ssp* e *Corynebacterium sp* foi encontrado um valor de P menor que 0,001 ($P < 0,001$) sendo extremamente significativo, pois a frequência de isolados *Staphylococcus ssp* foi maior que a de *Corynebacterium ssp*, sendo 64 glândulas positivas para *Staphylococcus ssp*, e apenas uma positiva para *Corynebacterium sp*. corroborando com os achados de literatura (GOMES et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007).

Apesar dos processos inflamatórios serem fisiológicos, os microrganismos isolados são agentes de mastite infecciosa.

Os *Staphylococcus spp*, que foram de isolamento das amostras de leite, distribuíram-se da seguinte forma: 18 (28,12%) *S. epidermides*, 12 (18,75%) *S. kloosii*, 6 (9,37%) *S. simulans*, 5 (7,81%) *S. intermedius*, 4 (6,25%) *S. equorum*, 3 (4,70%) *S. warneri*, 3 (4,70%), *S. hominis subsp. hominis*, 2 (3,12%) *S. xylosus*, 2 (3,12%) *S. caprae*, 2 (3,12%) *S. lentus*, 1 (1,56%) *S. chromogenes*, 1 (1,56%) *S. auriculares*, 1 (1,56%) *S. haemolyticus*, 1 (1,56%) *S. scheleiferi subsp.coagulans*, 1 (1,56%) *S. vitulus* e 2 (3,12%) de *Staphylococcus ssp*.

Segundo Menzies e Ramanoon (2001) as espécies de *Staphylococcus ssp* mais freqüentes isoladas em casos de mastite subclínica são: *S. epidermides*, *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. hycus*, *S. xylosus* e *S. intermedius*, mas algumas outras espécies, incluindo as espécies patogênicas *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. capitus* e *S. warneri* podem ser ocasionalmente isoladas. O *S.lentus* também tem sido isolado de mastite de caprinos, sendo considerada uma bactéria de grande patogenicidade

Discussão

para a espécie, mas sua prevalência não tem sido relatada (POUTREL, 1984a). A espécie *S. haemolyticus* e *S. scheleiferi*, *S. hominis* e *S. vitulus* também tem sido isoladas, porém em menor frequência (CASTRO; LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1992; MAISI; RIIPINEN, 1991). Todas as espécies encontradas no presente estudo já foram isoladas do leite de cabras, mas em relação à frequência de isolamento há uma divergência na própria literatura quanto às espécies de *Staphylococcus* spp (CASTRO; LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1992; POUTREL, 1984b; MAISI; RIIPINEN, 1991; COETRERAS et al., 2007).

Há uma semelhança nos achados de literatura, sobre a frequência de isolamento de *S. epidermides*, sendo uma das espécies mais isoladas de *Staphylococcus* spp causadora de mastite em caprinos após o *S. aureus*. Quando comparou-se os resultados da espécie mais frequente que isolou-se na cultura. Estes resultados corroboraram com os relatados por outros autores (CASTRO; LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1992; CONTRERAS et al., 2007; MENDONÇA et al., 2007).

Os *Staphylococcus* spp são divididos pela prova de coagulase, em *Staphylococcus* coagulase negative (SCN), e *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP). Os SCN são os microrganismos mais prevalentes detectados na pele do úbere, dentro do canal do teto e na glândula mamária de caprinos e ovinos leiteiros. Em caprinos são os microrganismos mais prevalentes de casos de infecções intramamária (IMI) e são isolados, sobretudo de casos de mastite clínica e subclínica (MORONI et al., 2005). O presente estudo verificou que de um total de 62 *Staphylococcus* spp cuja as espécies foram estabelecidas, observou-se 56 (90,32%) *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e 6 (9,68%) *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), sendo portanto os SCN o que apresentou maior frequência estatística ($P < 0,05$) de isolamento.

Das 56 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa que foram identificadas pelas provas bioquímicas utilizadas, predominando a espécie *S. epidermides* com 18 (32,14%), seguidos de *S. kloosii* 12 (21,41%) e *S. simulans* 6 (10,71%), sendo as espécies com a maior frequência dentre os achados. Para os *Staphylococcus* coagulase positivo que foram isolados de 6 (9,68%) culturas positivas a espécie mais frequente foi o *S. intermedius* com (83,33%) dentro das espécies isoladas de SCP. Dados similares foram encontrados por Tonin e Nader

Discussão

Filho (2005) que encontro 92,4% de SCN e 7,6% de SCP identificadas através do exame microbiológico, sendo os *S. epidermides* a espécie mais frequente de isolados de SCP em diversos relatos da literature (CASTRO; LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1992; MENZIES; RAMANOON, 2001) e a *S. intermedius* uma das mais freqüentes de SCP (STAMFORD et al., 2006).

A comparação do teste de Tamis com os resultados microbiológicos do leite das 119 amostras de leite analisadas verificou-se que 58 (48,74%) apresentaram isolamento bacteriológico e 61 (51,26%) não apresentaram isolamento, sendo que das amostras de leite com cultura positiva perante o teste de Tamis que foi dividido em Tamis negativo (normal) e Tamis positivo (seroso, flocos pequenos, grumos e pus); obteve-se assim 45 (77,59%) Tamis negativo e 13 (22,41%) Tamis positivo em isolados de cultura positiva, e 46 (75,41%) Tamis negativo e 15 (24,59%) Tamis positivo em isolados de cultura negativa. As frequências de isolamento não apresentaram diferença estatisticamente significante ($P= 0,8312$). Relacionando os resultados entre Tamis positivo com isolamento bacteriológico positivo 13(22,41%) e Tamis positivo com isolamento bacteriológico negativos 15(24,22%), observa-se mais um dado de que os processos estudados devem-se a mastite fisiológica e não infecciosa.

Devido à fácil aplicabilidade e o baixo custo, o CMT tem sido utilizado como forma de triagem para o controle de mastite subclínica em caprinos devendo estar associado ao exame microbiológico do leite, objetivado evitar falsos positivos devido à fisiologia da glândula mamária de caprinos (SILVA et al., 2001; GOMES et al., 2003; TONIN; NADER FILHO, 2005). Os resultados encontrados no estudo em questão de um total de 119 amostras de leite que foram submetidas ao CMT, 59 (49,58%) tiveram isolamento de microrganismos e 60 (50,42%) não foram passíveis de isolamento. Do total de 59 amostras submetidas ao CMT com cultura positiva observo-se os seguintes resultados: 6 (10,17%) foram negativa, 51 (86,44%) duas cruzes e 2 (3,39%) três cruzes.

Pode-se averiguar elevada frequência de resultados com cultura positivo concentra-se entre CMT 2+ e CMT 3+, perfazendo um total de 53 (89,83%) de bactérias isoladas no CMT, considerado positivo para mastite em caprinos. Segundo Silva et al. (1996) os resultados de CMT escore 2 e 3 podem ser utilizados com indicativo da infecção caprina, porém deve ser associado ao bacteriológico, devendo

Discussão

ser considerada como infecção instada somente os resultados 2+ e 3+ para a espécie caprina devido a fisiologia da glândula (CONTRERAS et al., 1996). Mediante os resultados supracitados pode-se averiguar que esses foram condizentes os resultados da literatura para caprinos.

A frequência dos resultados do CMT cultura positiva 59 (49,58%), e do CMT cultura negativa 60 (50,42%), não se observou uma diferença estatisticamente significativa ($P=1$), entre os parâmetros analisados, fato este que corrobora com os resultados anteriores de que o processo deveria ser fisiológico e não infeccioso devido os animais encontrarem-se em processo de secagem.

Sabendo-se que os *Staphylococcus* spp na atualidade são considerados uma bactéria emergente que vem sendo considerada um risco à saúde pública, medidas de prevenção devem ser tomadas em toda a cadeia de produção leiteira (GOMES et al., 2003; GUIMARAES; LANGONI, 2009). Dentre os *Staphylococcus* spp; os *Staphylococcus* coagulase negativa encontram-se mais frequentemente das amostras coletadas da metade do úbere aparentemente normal, enquanto a outra metade encontra-se com mastite subclínica (POUTREL, 1984b).

Para a averiguação da carga de patógenos existentes no fragmento de glândula mamária de caprinos tuberculina positivo foi realizado o exame microbiológico de um total de 60 fragmentos mamários obtendo-se com resultado, 6 (10,00%) dos fragmentos positivos ao isolamento submetidos à análise diagnóstica e 54 (90,00%) negativos. Dos 6 fragmentos que foram positivos identificou-se 2 (33,33%) *S. intermedius* e *S. simulans* 1 (16,66%) *S. kloosii* e *S. caprae*. Das espécies identificadas foram obtidos 2 (16,66%) de SCP e 4 (66,66%) SCN.

Das amostras analisadas 5 (90,00%) apresentaram isolamento tanto no leite quanto na glândula, sendo 3 (60,00%) CMT negativo e 2 (40,00%) CMT duas cruzes. Para o CMT negativo houve crescimento bacteriano tanto no leite como na glândula de *S. intermedius*, e *S. epidermidis* do leite, onde na glândula se obteve crescimento de *S. simulans*.

Nas amostras CMT duas cruzes obteve-se isolamento de *S. epidermidis* no leite enquanto que na glândula detectou-se *S. kloosii*.

Os dados aqui relatados corroboram com os apresentados na literatura para a mastite em caprinos, pois independente da espécie o gênero *Staphylococcus* ssp o agente de maior frequência de isolamento sendo o maior responsável pela mastite

Discussão

intramamária em caprinos (CONTRERAS et al., 2007). Os SCN são os maiores causadores de mastite subclínica para as cabras (POUTREL, 1984b) e que o SCN pode ser encontrado tanto em úbere sadio como doente. Independente do local coletado essas bactérias foram isoladas tanto no leite com na glândula, sendo os SNC os que apresentaram maior isolamento tanto na glândula quanto no leite de caprinos.

6.1.2 Mastite causada por *Mycobacterium* sp

A mastite causada por *Mycobacterium bovis*, tem sido evidenciada principalmente em animais destinados a produção leiteira. É uma enfermidade que vem acometendo a espécie bovina ao decorrer dos séculos, cuja viabilidade de transmissão do *M. bovis* pelo leite de animais doentes tem sido descrita desde 1902, quando MacFadyean relatou o potencial zoonótico do bacilo devido a sua transmissão pela ingestão de leite de vacas tuberculosas, a crianças com evidências de tuberculose intestinal. Ravel, no mesmo ano, comprovou a transmissibilidade da tuberculose bovina ao homem, pela ingestão de leite através do isolamento do agente (DANKNER et al., 1993; FERREIRA NETO; BERNARDINE, 1997; ABRAHÃO, 1998; SOUZA et al., 1999).

Behring em 1903 defendeu a tese que o leite era a principal fonte de transmissão do bacilo (FELDMAN, 1955; ABRAHÃO, 1998).

A mastite tuberculosa é uma enfermidade que acomete o úbere, mas na grande maioria dos casos não apresenta manifestações clínicas evidentes tanto na glândula quanto no leite (WEIR; BARBOUR, 1950), sendo uma doença progressiva diagnosticada em animais mais velhos (MCKAY, 1941). Podem acometer um ou mais quartos do úbere afetado, sendo mais frequente no quarto posterior podendo estar associada aos linfonodos supramamários da glândula (WEIR; BARBOUR, 1950). Afecções de tuberculose primária no canal do teto são raras, mas podem ocorrer (MCKAY, 1941).

Torrance (1937) ao estudar as vias de infecção da *M. bovis* no úbere concluiu: que pode ocorrer um aumento dos linfonodos suparmamários, mesmos quando o

Discussão

úbere apresenta aspecto normal sendo um forte indicativo de presença de tuberculose na glândula, casos de tuberculose nos linfonodos supramamários podem existir com envolvimento do úbere ou não, ou ainda ser um indicativo de eliminação do bacilo via leite, sugerindo que exames dos linfonodo supramamário ajudam no diagnóstico diferencial de mastite tuberculosa.

Devido ao difícil diagnóstico é uma doença pouco evidenciada, sendo mais diagnosticada em achados de lesões na inspeção frigorífica. Pode ocorrer por via hematogena, mas em muitos casos pode ser uma extensão da doença localizada no tórax ou na cavidade abdominal. McKay (1941) encontrou 28,3% de casos de tuberculose no úbere com focos primários no pulmão.

Segundo Torrance (1937) casos de lesão com envolvimento pulmonar é indício de generalização da doença, com o envolvimento de linfonodo supramamário, pois de 14 casos de tuberculose averiguados através de seus estudos, 13 (92,86%) apresentaram tuberculose generalizada, sendo que três apresentaram evidências de tuberculose miliar.

Alterações na glândula e no leite são difíceis de serem visualizadas, quando ocorrem a doença já se encontra em estado avançado. O úbere apresenta endurecimento progressivo do tecido da glândula do quarto infartado, com início no quarto superior do úbere, estendendo-se gradualmente até que todo o tecido da glândula do quarto infectado esteja envolvido e se apresente fibroso e penduloso. O leite no início não apresenta alterações, com a progressão da doença, a gordura diminui ocorre o aperecimento de grumos finos até transforma-se em secreção de coloração âmbar com conteúdo celular característico de mastite (MCKAY, 1941; WEIR; BARBOUR, 1950).

O primeiro caso de mastite causada por tuberculose em caprinos foi relatada por Griffith (1911⁸ apud MCKAY, 1941, p. 563) que em seus experimentos mostrou que o bacilo era eliminado pelo leite de vacas e de cabras infectadas experimentalmente por via subcutânea ou intravenosa, evidenciando a eliminação dos bacilos 24 horas pós infecção (MCKAY, 1941).

Em 1920 ocorreu o diagnóstico do primeiro relato de tuberculose em uma cabra leiteira naturalmente infectada em achados de lesões *post mortem*, estudos realizados em animais do mesmo rebanho, levaram Golden (1921) a declarar a

⁸ GRIFFITH, A. S. Final report of the Royal Comission on Tuberculosis. **Final Report**, p. 27-29, 1911.

Discussão

viabilidade do leite caprino como forma de transmissão da tuberculose ao homem, evidenciando-se o caráter zoonótico da enfermidade nessa espécie.

A tuberculose pode ocorrer de forma silenciosa em caprinos leiteiro em boas condições físicas, na hipótese de que o leite de cabra era uma forma segura de alimentação tem sido indicado pela classe médica com substituo ao leite de vacas tuberculosa, devido o animal ser erroneamente considerado resistente ao bacilo (GOLDEN, 1921; MURRAY; MCNUTT; PURWIN, 1921).

Beller e Ehrenreich (1941) em seus estudos feitos em abatedouros pela estatística de seus achados declarou que a espécie caprina não é resistente a tuberculose.

Em 1949, em um surto de tuberculose em caprinos naturalmente infectados, Soliman et al. (1953), encontrou 2 cabras com lesões no úbere sendo que uma apresentava manifestações clínicas típicas de mastite tuberculosa apresentando o úbere endurecido, a glândula esquerda encontrava-se fibrosada e pedulosa. Na necropsia do órgão afetado foi encontrado nódulos com cerca de 8 mm de diâmetro afetando o úbere, muitos com áreas de calcificação, encontrado um único bacilo na lesão com característica de BAAR. Nos dois casos das lesões encontradas houve uma associação com os linfonodos supramamários que estavam endurecidos mostrando áreas de calcificação. Ressaltou ainda que estes animais não mantiveram contato com bovinos e nunca foram alimentados com leite de origem bovina. Devido aos dados encontrados na literatura esse pode ser considerado um dos primeiros casos de mastite tuberculosa notificado pela literatura em caprinos.

Atualmente relatou-se um surto em caprinos da raça golden Guernsey na Grã Bretanha causado pelo *Mycobacterium bovis* onde se detectou lesões suspeitas na glândula mamária em duas cabras que foram associadas à matistite crônica com evidencias de infecções causadas por *Mycobacterium* (DANIEL et al., 2009).

Na literatura referente à tuberculose caprina há uma precariedade de dados que possam ser utilizadas como parâmetros para o caso de isolamento de *Mycobacterium bovis* de animais acometidos por essa enfermidade.

De um total de 116 amostras de leite semeadas nos tubos de Stonebrink e Löwenstain-Jensem foram encontrados 12 (10,34%) amostras suspeitas com crescimento no meio de Stonebrink, cujas colônias foram submetidas ao teste de Zielh-Neelsen onde 5 (4,31%) apresentaram característica típicas de bacilo álcool-

Discussão

ácido resistente (BAAR), sendo consideradas positivas. Mohan (1950) utilizando a mesma técnica de Zielh-Neelsen associada ao método de Antiformin, de um total de 332 amostras de leite obteve 2 (0,6%) de positivos, essas amostras foram semeadas em meio de cultura e os achados encontrados em seus estudos foram os mesmos, isto é 2 (0,6%). Apesar da diferença de frequências obtidas entre os achados da literatura e a pesquisa presente, os resultados são de grande valor, devido ao caráter zoonótico da doença.

A importância dos achados relatados tanto na literatura quanto no presente estudo, onde foi possível comprovar a existência do bacilo da tuberculose no leite de caprinos, sem dúvida além de mostrar que a espécie caprina é suscetível a tuberculose, prova que o leite de cabra é uma via de transmissão do *M. bovis* ao homem. Sabendo-se que o homem é tão suscetível ao *M. bovis* quanto ao *M. tuberculosis*, perante o aumento do consumo do leite e derivados lácteos oriundos da espécie, que encontra-se em plena conquista de mercado, sendo a sua utilização recomendada a pessoas com a saúde debilitada e que em algumas países da África e Ásia é a única fonte protéica de alimentação, o risco de casos de tuberculose adquirida é copioso, sendo portanto um risco a saúde pública. Cabendo aqui salientar que torna-se necessária a extensão do programa de controle e erradicação de tuberculose da espécie bovina a caprina com a utilização adequada a cada espécie quanto ao método utilizado para a tuberculinização.

Em um total de 60 amostras de glândula mamária dos animais subjugados ao exame bacteriológico para o isolamento de *Mycobacterium sp* foram encontrados 5 (8,33%) de isolados suspeitos de amostras de glândula mamária que cresceram no meio de Stonebrink e foram sujeitos ao teste de Zielh-Neelsen direto das colônias dos tubos, apenas 1 (1,66%) mostrou-se positivo ao teste com características de BAAR, sendo um indício de *M. bovis*.

Devido à escassez de dados na literatura, torna-se difícil estabelecer algum parâmetro com os resultados obtidos no presente estudo dos fragmentos de glândula mamária em caprinos. Segundo Torrance (1937), lesões no úbere ocorrem com envolvimento dos linfonodos supramamários, mesmo que não ocorram lesões que evidenciem a presença da instalação do agente na glândula, sendo que muitas lesões podem ser subnotificadas devido serem achados de frigorífico. Novas pesquisas devem ser realizadas incluindo além dos fragmentos de glândula mamária

os linfonodos supramamários, para que possa-se estabelecer uma melhor comparação na espécie caprina dos achados de lesões no úbere dessa espécie. O único achado na literatura comprovado de lesões na glândula mamária causadas por tuberculose, ocorreu em duas cabras, relatadas por Soliman et al. (1953) envolvendo os linfonodos supramamários, cujas lesões foram diagnosticadas através de achados de necropsia, sendo assim novos estudos devem ser realizados.

6.2 ESTUDOS ENTRE A FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTOS DE *MYCOBACTERIUM* DO LEITE E DA GLÂNDULA MAMÁRIA COM O TESTE DE ZIELH-NEELSEN (ZN)

Não há diferença estatística ($P = 0,6654$) entre a frequência de culturas positivas do leite, e a frequência de culturas positivas dos fragmentos de glândula mamária obtidas através do teste de Zieh-Neelsen, em 5(4,31%) isolados positivos do leite ao teste de Zielh-Neelsen e 1(1,66%) de isolado da glândula. Através dos resultados supracitados pode-se concluir que para a verificação da frequências de isolamento de *Mycobacterium* em caprinos tuberculina positivo, pode-se utilizar qualquer um dos métodos para se verificar a frequência de microrganismos isolados.

Em um total de 60 fragmento de glândula 7 (11,33%) apresentaram lesões com indício de tuberculose consideradas lesões típicas de tuberculose. As 7 lesões apresentavam-se com aspecto granulomatosa com severo processo inflamatório constituído de grande quantidade de linfócitos e macrófagos, apresentando áreas de necrose com regiões de calcificação, que se assemelhavam a necrose caseosa. Devido todas as sete lesões terem sido negativas a coloração de Zielh-Neelsen, pois não foi possível evidenciar nenhum bacilo presente nestas lesões.

A técnica de imunohistoquímica é uma metodologia que apresenta maior sensibilidade que o diagnóstico realizado pela coloração de Zielh-Neelsen, pois segundo Seva et al. (2002) é capaz detectar bacilos e debris de bacilos em áreas de necrose onde a técnica de Zielh-Neelsen não foi capaz de detectá-los devido sua baixa sensibilidade quando comparada a técnica de imunohistoquímica.

Seva et al. (2002) em seus estudos utilizando a técnica de imunohistoquímica e a de Zielh-Neelsen obteve maiores evidencias quanto a existência de bacilo em

Discussão

lesões de pulmão no método de imunohistoquímica que no de Ziehl-Neelsen, pois as mesmas lesões de pulmão que foram submetidas as duas técnicas, obteve-se maior positividade, mesmo as lesões que foram negativas ao teste ZN, na imunohistoquímica mostrando maior número de imunoreativos.

O fato da coloração de Ziehl não ter sido capaz de detectar, nas lesões aqui referidas, nenhum bacilo não significa que não sejam lesões de tuberculose, pois segundo a literatura em muitas lesões com achados histológicos de tuberculose caprina, não foram capazes de detectar bacilos em achados histológicos principalmente de pulmão, sendo que muitas lesões de pulmão deram positivo no diagnóstico bacteriológico (BERNABÉ et al., 1990-1991a,b; SEVA et al., 2000, 2002). Segundo Seva et al. (2002) os caprinos apresentam uma reação imunológica maior e mais severa que apresentada pelos bovinos, levando ao aparecimento de lesões com pouco ou nenhum bacilo presente. Muitas lesões causadas por *Mycobacterium* podem não ser evidenciadas células gigantes e/ou células epitelióides, podendo não apresentar a formação granulomatosa claramente debilitada por tecido conectivo capsulado, mas apresentam grandes áreas de infiltrado inflamatório (BERNABÉ et al., 1990-1991a,b; SEVA et al., 2000, 2002).

Durante a análise ao microscópio óptico das lâminas do fragmento de glândula mamária foi possível observar um total de 18 (30%) achados histológicos de processo de reparo nas glândulas dos animais que participaram da pesquisa, a presença desses processos nesses fragmentos seria uma evidencia da presença do *Mycobacterium sp* na glândula desses animais, sendo um indicativo que esses animais estavam sendo acometidos por mastite causada por esse agente. Devido a falta de parâmetros da literatura consultada para poder serem analisados perante esses achados, e sabendo-se que a grande quantidade de tecido conjuntivo encontrada na glândula mamária de pequenos ruminantes pode ser fisiológica (JUBB; KENNEDY; PALMER, 1997) torna-se necessária a realização de novos estudos para que se possa saber se o processo de reparo observado no presente estudo é devido a presença do agente ou se foi um achado histológico normal a espécie.

No presente estudo nas lesões de glândula mamária não foi possível evidenciar células epitelióides, nem células gigantes, mas uma grande quantidade

de infiltrado inflamatório com severa quantidade de macrófagos, linfócitos e alguns neutrófilos corroborando com os resultados da literatura

6.3 ESTUDOS DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS COM OS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS DOS FRAGMENTOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Ao serem feitas a analogia dos resultados obtidos entre o exame bacteriológico do leite (cultura positiva e cultura negativa) com o os resultados histológicos (com lesão e sem lesão), foram encontrados os seguintes resultados: 6 (10%) com lesão e cultura positiva e 54 (90%) sem lesão e cultura negativa, através do valor de P ($P \geq 1,00$) que não foi significativo, pode-se concluir que apesar de o teste de CMT ter se apresentado negativo no diagnóstico histopatológico pode-se observar processo inflamatório na lâmina em todos os animais o que reforça o processo de secagem da glândula mamária que os caprinos tuberculina positivo foram submetidos.

6.4 ESTUDO ENTRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO CRÔNICO E O PROCESSO DE REPARO DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A comparação realizada entre as frequências dos processos crônico (histológicos com lesão) e a frequência de negativo (histológico sem lesão) obteve-se um valor de P ($P \leq 0,05$) significante, pois estatisticamente a frequência de processos inflamatórios sem lesão de tuberculose na glândula foi maior que a frequência de processos inflamatórios com lesão na glândula dos animais em estudo.

Quando analisou-se o processo inflamatório histopatologicamente compatível com tuberculose e processo de reparo pode-se verificar que houve maior frequência do processo de reparo ($P \leq 0,05$).

A frequência dos processos negativos histologicamente para tuberculose foi maior que a frequência de processo de reparo ($P < 0,05$) nos fragmentos de glândula mamária de caprinos tuberculina positivo.

Discussão

O estudo das frequências obtidas pelo resultado da soma do processo inflamatório histologicamente compatível com tuberculose mais o processo de reparo (41, 66%), comparada com a frequência de resultados histopatológicos negativos (58,33%), não se verificou diferença estatisticamente significativa ($P \leq 1,00$)

6.5 ESTUDOS ENTRE OS RESULTADOS HISTOLÓGICOS E OS RESULTADOS DO TESTE DE ZIELH-NEELSEN NAS AMOSTRAS DE LEITE E DOS FRAGMENTOS DE GLÂNDULA MAMÁRIA

Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre a frequência de lesões positivas nos achados histológicos com processo inflamatório crônico e a frequência de fragmentos de glândula mamária positivo ao teste de Ziehl-Neelsen ($P \leq 1,00$).

A comparação da frequência do processo inflamatório crônico do diagnóstico histopatológico da glândula com as frequências dos resultados positivos do leite ao teste de ZN demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa ($P \leq 1,00$).

A soma das frequências entre o processo inflamatório compatível com tuberculose e o processo de reparo relacionado aos resultados positivos da glândula mamária no teste de ZN, foi maior do que a quantidade que foi liberada pelo leite (1,66%).

A soma das frequências entre o processo inflamatório histopatologicamente compatível com tuberculose e o processo de reparo, quando comparado com os resultados positivos do leite no teste de ZN, verificou-se que o valor de P foi igual a 0,0001, este fato pode representar que a presença do *M. bovis* pode estar sendo subestimado, representando maior risco a saúde pública.

7 CONCLUSÕES

Através dos resultados averiguados nas condições do presente estudo, ofereceram as seguintes conclusões:

- Apesar de culturas positivas com predominância de *Staphylococcus* spp, os animais não apresentaram processo inflamatório na glândula mamária infeccioso, e sim fisiológico devido à secagem dos mesmos.

- Os resultados do teste de Ziehl-Neelsen no leite de animais tuberculina positivo e nos fragmentos de glândula mamária positiva foram semelhantes estatisticamente, portanto pode-se utilizar qualquer um dos métodos para se verificar a frequência de isolamento de microrganismos em animais tuberculina positivo.

- A frequência de processo granulomatoso nas glândulas mamárias dos animais estudados foi semelhante estatisticamente tanto a frequência do testes de Ziehl-Neelsen no leite quanto no teste de Ziehl-Neelsen no fragmento da glândula. Desta forma a cultura do leite pode ser empregada para se identificar o “status” das glândulas mamárias do rebanho.

- Em relação ao processo de reparo este pode ser fisiológico ou devido à presença de *Mycobacterim*. Novos estudos podem ser feito para a averiguação se esse processo de reparo é fisiológico ou devido ao *Mycobacterium bovis*, pois o processo de reparo pode indicar que pode ocorrer uma frequência maior da presença do microrganismo do que se estima e conseqüentemente maior risco para o consumidor.

REFERÊNCIAS

ABDALA, A.; TARABLA, H.; BERTERO, S.; TORRES, P. **Vigilância epidemiológica de la tuberculosis bovina em el Departamento de Castellanos, Santa Fé.** Buenos Aires. Disponível em: < <http://www.rafaela.inta.gov.ar/anuario1999/p37.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2007.

ABRAHÃO, R. M. C. M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis***: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. 1998. 273 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Archives of Veterinary Science**, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999.

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

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1984. p. 174-185.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v. 1, 461 p.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWES, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463 p.

ALHAJI, I. Bovine tuberculosis: a general review with special reference to Nigeria. **The Veterinary Bulletin**, v. 46, p. 829-837, 1976.

ALMEIDA, C. A. S. **Avaliação do Teste Cervical Comparativo no diagnóstico imunoalérgico da tuberculose em caprinos (*Capra hircus*)**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Referências

ANDERSON, W.; KING, J. M. *Mycobacterium avium* infection a pygmy goat. **Veterinary Record**, v. 133, n. 20, p. 502, 1993.

ANDRADE, G. B.; RIET-CORREA, F.; MILKE, P. V.; MÉNDEZ, M. D. C.; SHILD, A. L. Estudos histológicos e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, n. 3/4, p. 81-86, 1991.

ANDRADE, L.; SANTIAGO, A. C.; ANDRADE, E. M. Caso de tuberculose pulmonar por bacilo bovino na Guanabara. **Revista da Divisão Nacional de Tuberculose**, v. 16, n. 63, p. 372-390, 1972.

ANTENORE, A. 41% da produção de leite é clandestino. **Folha de São Paulo**, 30 ago. 1998a. cad. 3, p. 1.

ANTENORE, A. Fabricantes de queijo fraudam certificado. **Folha de São Paulo**, 30 ago. 1998b. cad. 3, p. 4.

ANTENORE, A. Governo admite comércio de gado com tuberculose no país. **Folha de São Paulo**, 30 ago. 1998c. cad. 3, p. 4.

ANÚARIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro: IBGE, 1994. p. 349-364.

ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* to species rank as *Mycobacterium caprae* comb.nov., sp. nov. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1785-1789, 2003.

ARANAZ, A.; LIEBANA, E.; GOMEZ-MAMPASO, E.; GALAN, J. C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, F.; MATEOS, A.; SÚAREZ, G.; DOMÍNGUEZ, L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1263-1273, 1999.

ARELLANO REYNOSO, B.; RAMÍREZ CASILLAS, I. C.; DÍAZ APARÍCIO, E.; VALERO ELIZONDO, G.; SANTILLÁN FLORES, M. A. Diagnóstico de tuberculosis en hatos de caprinos empleando la prueba intradérmica doble comparativa y cultivo bacteriológico. **Técnica Pecuaria en Mexico**, v. 37, n. 1, p. 55-58, 1999.

AZAMBUJA, R.H.M.; FRANCA, A. P.; LANSINI, V.; SCHONS, S. Prevalência de tuberculose, cisticercose, hidatidose e fasciolose em matadouros frigoríficos do

Referências

estado do Rio Grande do Sul, de 1997 a 2004. **Revista Universidade Rural**, v. 25, p. 415, 2005. Suplemento.

BALIAN, S. C.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Estudo comparativo de dois métodos de descotaminação na pesquisa de micobactérias. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 11-14, abr./jun., 2002.

BARLOW, N. D. Bovine tuberculosis in New Zealand: epidemiology and models. **Trends in Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 119-124, 1994.

BARRERA, L.; KANTOR, I. N. Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 39, n. 3, p. 222-227, 1987.

BARROS, G. C.; LEITÃO, C. H. Influência da mastite sobre as características físico-químicas do leite de cabra. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 12, n. 3/4, p. 45-48, 1992.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988. 380 p.

BEHMER, O. P.; TALOSA, E. M. C.; FREITAS, A. G. **Manual técnico para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDATAR, 1976. 256 p.

BELLER, K.; EHRENREICH, W. Untersuchungen über Ziegen-tuberkulose. **Archiv und Wissenschaft**, v. 77, p. 1-8, 1941.

BENESI, F. J.; PINHEIRO, S. R.; MAIORKA, P. C.; BENITES, N. R.; BIERGEL JUNIOR, E. H.; GREGORY, L. Tuberculosis in goats in Brazil: case report. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24., 2006, Nice, França. **Anais...** Nice, 2006. 1 CD-ROM.

BENESI, F. J.; PINHEIRO, S. R.; MAIORKA, P. C.; SAKAMOTO, S. M.; ROXO, E.; BENITES, N. R.; BIERGEL JUNIOR, E. H.; GREGORY, L. Tuberculose em caprinos (*Capra hircus*): relato de caso. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 217-220, 2008.

BENGIS, R. G.; KRIEK, N. P. J.; KEET, D. F.; RAATH, J. P.; VOS, V.; HUCHZERMEYER, H. F. A. K. An outbreak of bovine tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer*- *Sparrman*) population in Kruger National Park: a

Referências

preliminary report. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 15-18, 1996.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science**, v. 79, n. 1, p. 1-16, 2003.

BERNABÉ, A.; GÓMEZ, M. A.; NAVARRO, J. A.; GÓMEZ, S.; SÁNCHEZ, J.; SIDRACH, J.; MENCHEN, V.; VERA, A.; SIERRA, M. A. Morphopathology of caprine tuberculosis: II. Generalization of tuberculosis. **Annales de Veterinaria (Murcia)**, v.6/7, p. 21-30, 1990-1991a.

BERNABÉ, A.; GÓMEZ, M. A.; NAVARRO, J. A.; GÓMEZ, S.; SÁNCHEZ, J.; SIDRACH, J.; MENCHEN, V.; VERA, A.; SIERRA, M. A. Morphopathology of caprine tuberculosis: I. Pulmonary tuberculosis. **Annales de Veterinaria (Murcia)**, v. 6/7, p. 9-20, 1990-1991b.

BERNABÉ, A.; GÓMEZ, M. A.; NAVARRO, J. A.; GÓMEZ, S.; SÁNCHEZ, J.; SIDRACH, J.; MENCHEN, V. Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. **Small Ruminant Research**, v. 5, n. 4, p. 377-390, 1991.

BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 1981. p. 233-246.

BIER, O. Corinebactérias. In: BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. 22. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1982. p. 572-584.

BIER, O. Microbactérias. In: BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1992. p. 709-724.

BIET, F.; BOSCHIROLI, M. L.; THOREL, M. F.; GUILLOTEAU, L. A. Zoonotics aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare complex* (MAC). **Veterinary Research**, v. 36, p. 411-436, 2005.

BLÁZQUEZ, J.; LOS MONTEROS, L. E. E.; SAMPER, S.; MARTÍNS, C.; GUERREIRO, A.; COBO, J.; VANEMBDEN, J.; BAQUERO, F.; GÓMEZ-MANPASO, E. Genetic characterization of Multidrug- Resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1390-1393, 1997.

BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A. **Medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. p. 345-360.

Referências

BOBENRIETH, R.; BELTRAN, F. El medico veterinário en la proteccion de alimentos y El conytrol de zoonosis. **Boletín de la Oficina Saintaria Panamericana**, v. 97, p. 298-313, 1984.

BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL. Brasília, D.F.: Ministério Agricultura, v. 18, n. 1/4, dez. 1984.

BORSUK, S. **Vetores de expressão em *Mycobacterium bovis* BCG utilizando complementação auxotrófica como marcador de seleção.** 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

BOUVET, E.; CASALINO, E.; MENDOZA-SASSI, G.; LARIVEN, S.; VALLÉE, E.; PERNET, M.; GOTTOT, S.; VACHON, F. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV- infected patients: a case-control study. **AIDS**, v. 7, n. 11, p. 1453-1460, 1993.

BRANDÃO, S.C.C. Leite: legislação, responsabilidade e saúde pública. **Revista Balde Branco**, n. 360, p. 68-71, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual do Ministério da Saúde.** 5 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. 107 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal.** Brasília: PNCEBT. MAPA/DAS/DAS, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal.** Brasília: PNCEBT. MAPA/DAS/DAS, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Combate a Erradicação da Brucelose e Tuberculose.** Brasília, 2001. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br/das/dda>>. Acesso em : 8 ago. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos:** instrução normativa DAS 53 de 12 de julho de 2004. Brasília, 2004. Disponível em : <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em : 08 ago. 2007.

Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**. Brasília, 2001. Disponível em : <<http://www.cbra.org.br/Programa.doc>>. Acesso em : 8 ago. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. **Manual de normas para o controle da tuberculose**. 4. ed. Brasília, 1995. (Série A: normas e manuais técnicos, 13).
- BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTTIERRZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.
- BRUNINI SOBRINHO, R. Tuberculose no homem e nos animais. **Casa da Agricultura**, v. 10, n. 2, p. 17-18, 1988.
- CAFFREY, J. P. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 1- 4, 1994. Disponível em : <<http://www.tecnovet.com.br/buiatria/TbBovNet>>. Acesso em : 10 ago. 2007.
- CALERO, J. R. Incremento de la tuberculosis y coinfeccion con el SIDA. **Anales de La Real Academia Nacional de Medicina**, v. 12, p. 21-42, 1995.
- CAPRINOCULTURA. 2009 In: WIKIPEDIA. Disponível em : <<http://pt.wikipedia.org/wiki/CaprINOCULTURA>>. Acesso em : 8 ago. 2009.
- CARTER, G. R. **Fundamentos da bacteriologia e da micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988. p. 186-192.
- CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M.; EVANS, R. T; FORSTER, F.; NEILL, S. D. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis* – inoculated calves. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 321-337, 1999.
- CASTRO, A. **A cabra**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos, 1984, p. 255-256.
- CASTRO, M. V.; LANGENEGGER, M. C. E. H.; LANGENEGGER, J. Ocorrência e caracterização de *Estafilococos* coagulase negativos em leite de cabras no Estado do Rio de Janeiro. **Semina Ciências Agrárias**, v. 13, n. 1, p. 15-17, 1992.

Referências

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Bacteriología de la tuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: CPZ, 1988a. 63 p. (Série de Monografías Científicas y Técnicas, 11 rev. 1).

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Bacteriología de la tuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: CPZ, 1979. (Série de Monografías Científicas y Técnicas, C.P.Z., 11).

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Guia para Proyectos de Tuberculose Bovina**. Buenos Aires: CPZ, 1972.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis III: sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas: la identificación de micobacterias**. Buenos Aires: CPZ, 1988b. 63 p.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Metodos de laboratorio de micobacteriología veterinaria para el aislamiento e identificación de micobacterias**. Buenos Aires: CPZ, 1973. (Serie de Monografías Científicas y técnicas, C. P.Z., 11).

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Situación de la tuberculosis bovina en America Latina y el Caribe**. Buenos Aires: CPZ, 1988c. (Publicación Especial, 8).

CHEESEMAN, C. L.; WILESMITH, J. W.; STUART, F. A. Tuberculosis in two herds in the badger, a review. **Epidemiology Infection**, v. 103, n. 1, p. 113-125, 1989.

CHIMARA, E.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; MARTINS, M. C.; TELLES, M. A. S.; UEKI, S. Y. M.; FERRAZOLI, L. Molecular characterization of *Mycobacterium kansasii* isolates in the State of São Paulo between 1995-1998. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, p. 739-743, 2004.

CLIFTON-HADLEY, R. S.; WILESMITH, J. W. Tuberculosis in deer: a review. **Veterinary Record**, v. 129, p. 5-12, 1991.

COELHO, H. E. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 2002. p. 56-59.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M.; YATES, M. D. **Organization and practice in tuberculosis bacteriology**. Great Britain: Butterworth, 1985. p. 1-6.

Referências

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

COLLINS, F. M. The immune response to mycobacterial infection: development of new vaccines. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 95-100, 1994.

COLLINS, J. D. Tuberculosis in cattle: new perspectives. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1/2, p. 17-21, 2001.

COMISION NACIONAL DE ZOONOSIS. **La tuberculosis bovina en la Republica Argentina**. Buenos Aires, 1982. p. 39-62.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J. C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**, v. 79, n. 2/3, p. 273-283, 2003.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; CORRALES, J. C.; SANCHEZ, A.; MARCO, J. Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 21, p. 259-264, 1996.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A. J. C.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1/2, p. 145-153, 2007.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1/2, p. 53-63, 1994.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. São Paulo: Varêla, 1983. 823 p.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. São Paulo: Varêla, 1992. 843 p.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. São Paulo: Varêla, 2002. 843 p.

COSIVI, O.; GRANJE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMAYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.;

Referências

MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 59-70, 1998.

COTTER, T. P.; SHEEHAN, S.; CRYAN, B.; O' SHAUGHNESSY, E.; CUMMIS, H.; BREDEN, C. P. Tuberculosis due *Mycobacterium bovis* in humans in the south-west region of Ireland: is there a relationship with infection prevalence in cattle? **Tubercle and Lung Disease**, v. 77, n. 6, p. 545-568, 1996.

COUSINS, D. V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D. M.; BUTLER, W. R.; DAWSON, D.; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M. I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. A tuberculose in seals caused by a novel member of *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1305-1314, 2003.

COUSINS, D. V.; FRANCIS, B. R.; CASEY, R.; MAYBERRY, C. *Mycobacterium bovis* infection in a goat. **Australian Veterinary Journal**, v. 70, n. 7, p. 262-263, 1993.

COUTINHO, A. A. A evolução da caprino-ovinocultura. **Revista O Berro**, v. 98, n. 8, p. 146-148, 2007.

CULLOR, J. S.; TYLER, J. W.; SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. (Ed.). **Tratado de medicina interna dos grandes animais**. São Paulo: Manole, 1994. v. 2, p. 1041-1060.

CYRILLO, F. C. **Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos (*Ovis áries*)**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DALOVISIO, J. R.; STETTER, M.; MIKOTA-WELLS, S. Rhinoceros' rhinorrhea: cause of an outbreak of infection due to airborne *Mycobacterium bovis* in zookeepers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 598- 600, 1992.

DANIEL, R.; EVANS, H.; ROLFE, S.; DE LA RUA-DOMENECH, R.; CRAWSHAW, T.; HIGGINS, R. J.; SCHOCK, A.; CLIFTON-HADLEY, R. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in golden Guernsey goats in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 165, n. 12, p. 335-342, 2009.

DANKNER, W. M.; WAECKER, N. J.; ESSEY, M. A.; MOSER, K.; THOMPSON, M.; DAVIS, C. E. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic

Referências

study of 73 patienta and historical review of forgotten pathogen. **Medicine**, v. 72, n. 1, p. 11-37, 1993.

DARBORN, C. J.; GRANGE, J. M. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 149, p. 405-417, 1993.

DARBORN, C. J.; GRANGE, J. M.; KAZWALA, R. R. The bovine tuberculosis cycle: an African perspective. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 27S-32S, 1996. Supplement.

DAVID, H.; BRUM, L.; PRIETI, E. **Manual de micobacteriologia em saúde pública: princípios e métodos**. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 1994.

DEGRAVES, F. J.; FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis sobre as control. In: Update on bovine mastitis. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 9, n. 3, p. 421-433, 1993.

DEVALLOIS, A.; GOH, K. S.; RASTOGI, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analaysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobactrial sepecies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2969-2973, 1997.

DIB, C. C.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; AMAKU, M.; BENITES, N. R.; PINHEIRO, S. R. Utilização de uma técnica rápida para diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite experimentalmente inoculados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 149-155, 2006.

DULIN, A. M.; PAAPE, M. J.; SCHULTZE, W. D.; WEINLAND, B. T. Effect of parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 11, p. 2426-2433, 1983.

DUMARS, A.; ROBLOT, P.; BURUCOA, C.; ROBLOT, F.; BRETON, I.; BECQ-GIRAUDON, B. Tuberculose generalisée à *Mycobacterium bovis* chez une malade âgée en dehors de línfection à VIH. **La Revue Médecine Interne**, v. 16, n. 2, p. 143-145, 1995.

DUNN, B. L.; NICOPOULOS, C. "Atypical" mycobacterium in milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 52, n. 3, p. 373-376, 1982.

Referências

DVORSKA, L.; MATLOVA, L.; BARTOS, M.; PARMOVA, I.; BARTL, J.; SVASTOVA, P.; BULL, T. J.; PAVLIK, I. Study of Mycobacterium avium complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 239-250, 2004.

EDGINTON, M. TB: past, present and future. **HSTUPDATE**, n. 56, p. 3-6, 2000. Disponível em : <<http://www.hst.org.za/uploads/files/up56pdf>>. Acesso em : 20 nov. 2009.

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

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in nomenclature – genus: Mycobacterium**. 1998. Disponível em : <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>. Acesso em : 02 jan. 2008.

FAALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by Nontuberculous Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 177-225, 1996.

FANNING, A.; EDWARDS, S. Mycobacterium bovis infection in human beings in contact with elk (Cervus elaphus) in Alberta, Canada. **Lancet**, v. 338, p. 1253-1255, 1991.

FELDMAN, J. **Tuberculose humana de origem bovina: contribuição ao seu estudo no Estado de Minas Gerais**. 1955. 239 f. Tese (Concurso para Catedrático de Tisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de Minas Gerais, Minas Gerais, 1955.

FERREIRA NETO, J. S.; BERNARDINE, F. O. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**, v. 11, p. 9-13, 1997.

FESTENSTEIN, F.; GRANGE, J. M. Tuberculosis and the acquired immune deficiency syndrome : a review. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 19-30, 1991.

FISAMOTTI, J.C.; ALITO, A.; BIGI, F.; LATINI, O.; ROXO, E.; CICUTA, M. E.; KANTOR, I. N.; CATALDI, A.; ROMANO, M. I. Mycobacterium bovis isolaty from South America. **Veterinary Microbiology**, v. 60, p. 251-257, 1998.

FLAMAND, J. R. B.; GRETH, A.; HAAGSMA, J.; GRIFFN, F. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of Arabian oryx (Oryx leucoryx): diagnosis and momitoting. **Veterinary Record**, v. 134, p. 155-158, 1994.

Referências

FONSECA, F. C. Como combater a brucelose e a tuberculose. **Agricultura Hoje**, v. 8, n. 84, p. 20-24, 1982.

FONSECA, L. F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. 175 p.

FONTAINE, G. A. Tuberculose dès carnivores: données actuelles et perspectives. **Point Vétérinaire**, v. 26, n. 159, p. 45-48, 1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Anuarios Estadísticos de Agricultura**. Roma. FAOSTAT. FAO, 2004. Disponível em : <<http://www.faostat.fao.org/faostat/>>. Acesso em : 15 out. 2009.

FRANCA, A. P.; AZAMBUJA, R. H. M.; SCHONS, S.; LANSINI, V.; RIVAS, M. F.; OLIVEIRA, J. A. D.; VANEIRO, P. Incidência das doenças de notificação obrigatória ocorridas em matadouros da região rural do Município de Pelotas-RS de 2000 a 2004. **Revista Universidade Rural**, v. 25, p. 409, 2005. Suplemento.

FRIEDEN, T. R.; STERLING, T. R.; MUNSIFF, S. S.; WATT, C. J.; DYE, C. Tuberculosis. **Lancet**, v. 362, n. 9387, p. 887-899, 2003. Disponível em : <<http://www.thelancet.com>>. Acesso em : 8 ago. 2007.

GARNIER, T.; EIGLMEIR, K.; CAMUS, J.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M.; DUTHOY, S.; GRONDIN, S.; LACROIX, C.; MONSEMPE, C.; SIMON, S.; HARRIS, B.; ATKIN, R.; DOGGETT, J.; MAYES, R.; KEATING, L.; WHEELER, P.; PARKHILL, J.; BARRELL, B. G.; COLE, S. T.; GORDON, S. V.; HEWINSON, R. G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 100, n. 13, p. 7877-7882, Jun. 24, 2003. Disponível em : <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1130426100>>. Acesso em : 01 jun. 2009.

GIL, J. **Manual de inspeção sanitária de carnes**: aspectos especiais. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. v. 2, 653 p.

GOLDEN, G. E. Tuberculosis in milk goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 59, n. 1, p. 79-81, 1921.

GOLDSBY, A. R.; KINDT, J. T.; OSBORNE, A. B. **Kuby immunology**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2001. 670 p.

Referências

- GOMES, V.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; GARCIA, M.; BENITES, N. R.; MADUREIRA, K. M. Contagem de células somáticas (CCS) no leite de caprinos. **A Hora Veterinária**, v. 22, n. 131, p. 45- 47, 2003.
- GOODGER, J.; NOLAN, A.; RUSSEL, W. P.; DALLEY, D. J.; THORNS, C. J.; STUART, F. A.; CROSTON, P.; NEWELL, D. G. Serodiagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in badgers: development of an indirect ELISA using a 25 kDa antigen. **Veterinary Record**, v. 135, n. 4, p. 82-85, 1994.
- GRANGE, J. M.; COLLINS, C. H. Bovine tubercle bacilli and disease in animals and man: special article. **Epidemiology and Infection**, v. 99, n. 2, p. 221-234, 1987.
- GRANGE, J. M.; DABORN, C.; COSIVI, O. HIV- related tuberculosis due to mycobacterium bovis. **European Respiratory Journal**, v. 7, p. 1564-1566, 1994.
- GRANGE, J. M.; YATES, M. D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1/2, p. 137-151, 1994.
- GRANGE, J. M. Human and bovine tuberculosis: new threats from an old disease. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 3/4, 1986
- GRAPHAPAD SYSTEMS SOFTWARE STATISTICAL. **Analysis systems for personal computers**. [S.l.: s.n.], 1993. 199 p.
- GREENE, G. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1990. p. 558-566.
- GRIFFIN, J. F. T.; BUCHAN, G. S. Aetiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1/2, p. 193-205, 1994.
- GRIFFITH, A. S.; TYLER, W. H.; CUMMINS, S. L.; MCINTOSH, J.; WHITBY, L. E. H.; BULLOCH, W.; FLEMING, A.; OKELL, C. C.; GLOYNE, S. R. Bacillus tuberculosis. In: FILDES, P.; LEDINGHAM, J. C. G. (Ed.). **A system of bacteriology in relation to medicine**. London: Medical Research Council / His Majesty's Stationery Office, 1930. v. 5, cap. 4, p. 151-325.
- GRIFFITH, A. S. Tuberculosis of the domesticated species of animals. **Journal of Comparative Pathology**, v. 45, p. 109-122, 1928.
- GTHUI, W.; KITTUI, E.S.; JUMA, D. O. ; MWAI, J.; KWAMANGA, D. A Comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Zielh- Neelsen method in

Referências

the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **East African Medical Journal**, v. 70, p. 263-266, 1993.

GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 38-51, 2009.

GUSS, S. B. Dairy goat herd health problems. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 167, n. 12, p. 1076-1079, 1975.

GUTIÉRREZ CANCELA, M. M.; GARCÍA MARÍN, J. F. Comparison of Ziehl-Neelsen Staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. **Journal of Comparative Pathology**, v. 109, n. 4, p. 361-370, 1993.

GUTIÉRREZ, M.; SAMPER, S.; GAVIGAN, J. A.; GARCIA MARIN, J. F.; MARTIN, C. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2953-2956, 1995.

HAAGSMA, J. **Bovine tuberculosis**. [S. l.] : Office International de Epizooties, 1995. 11 p. (Manual amendment, 2).

HADAD, D. J. **Micobactérias isoladas de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana na Grande São Paulo**: aspectos microbiológicos, epidemiológicos clínicos e laboratoriais. 1994. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1994.

HARDIE, R. M.; WATSON, J. M. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. **Epidemiology and Infection**, v. 109, p. 23-33, 1992.

HOGAN, J. S.; WHITE, D. G.; PANKEY, J. W. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 4, p. 873-879, 1987.

HOLPE, J. C.; THOM, M. L.; MCCORNICK, P. A.; HOWARD, C. D. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, n. 3/4, p. 187-195, 2004.

HOPEWELL, P. C.; BLOOM, B. R. Tuberculosis and other mycobacterial diseases. In: MURRAY, J. F.; NADEL, J. A. (Ed.). **Textbook of respiratory medicine**. 2. ed. Philadelphia: Saunders; 1994. p. 1094-1244.

Referências

JUBB, V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 5 ed. San Diego: Academic Journal, 1997. 770p.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4^a ed. San Diego: Academic Press, v. 2, p. 641-652, 1993.

KAKKAR, K. C.; SINGH, C. D. N.; SINHA, B. K. Caprine tuberculosis. **Indian Veterinary Journal**, v. 54, p. 936-937, 1977.

KANTOR, I. N. (Ed.). **Situacion de la tuberculosis bovina en America Latina y el Caribe**. Martinez: CEPANZO; 1988. 23 p. (CEPANZO. Publicacion Especial, 8).

KANTOR, I. N. **Bacteriologia de la tuberculose humana y animal**. [S. l.]: CEPANZO, 1979. 63 p.

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

KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 20-30, 2001.

KENT, P.T.; KUBICA, G. P. Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory. US Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, 1985. 207p.

KLEEBOEG, H. H. Tuberculosis humana de origen bovino y salud pública. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, v. 3, p. 55-76, 1984.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; LANDA, W. N.; SCHREKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W. C. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. cap. 17.

KREEGER-VAN-RIG, N. J. W. **The yeast**: taxonomic study. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1984. 1091 p.

KRIEGER, N. R.; HOLT, J. C. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. v. 2, p. 1435-1457.

Referências

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; MUZZY DE SOUZA, G. R. **Tuberculose**: do ambulatório à enfermaria. Rio de Janeiro: Atheneu; 2000. 303 p.

KRITSKI, A.; DALCOLMO, M.; BIANCO, R. DEL; MELO, F. F.; PINTO, W. P.; SCHECHTER, M.; CASTELO, A. Associação tuberculose e infecção pelo HIV no Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 188, n. 6, p. 542-554, 1995.

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

LANGENERGGER, C. H.; LANGENERGGER, J. Resistência do gambá, *Didelphis albiventris*, à tuberculose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, p. 103-107, 1985.

LANGONI, H.; ARAUJO, W.N.; VITÓRIA, C. Contribuição ao estudo das mastites ovinas :aspectos microbiológicos. **Revista. Napgama**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 3-6, 2004.

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

LEITE, C. Q. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LEMOS, R. A. A. **Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul e diagnóstico**. Campo Grande. Editora UFMS, 1998. 536 p.

LENNETTE, E. H.; SPAUNDING, L. H.; TRAUNT, J. P. **Manual of clinica microbiology**. 4 ed. Washinton: American Society, 1985.

LEPPER, A. W. D.; CORNER, L. A. Naturally occurring mycobacterioses of animals. In: RATLEDGE, C.; STANFORD, J. **The biology of the mycobacteria**. London: Academic Press., 1983. v. 2, p. 417-521.

LERCHE, M. Inspeccion veterinária de la leche. In: OBTENCIÓN higiênica da la leche. Zaragoza: Acribia, 1969.

LESSLIE, I. W. Cross infecttions with mycobacteria between animals and man. **Bulletin of the International Union against Tuberculosis**, v. 41, p. 285-288, 1968.

Referências

LESSLIE, I. W.; FORD, E. J. H.; LINZEL, J. L. Tuberculosis in goats caused by avium type tubercule bacillus. **Veterinary Record**, v. 62, p. 25-27, 1960.

LESSLIE, I W.; MAGNUS, K.; STEWART; C. J. The prevalence of bovine type tuberculosis infections in man in the English rural population. **Tubercle**, v. 53, p. 198-204, 1972.

LEWTER, M. M.; MULLOWENEY, P. C.; BALDWIN, E. W.; WALKER, R.D. Mastitis in goats. **The Compendium on Continuing Education**. Practicing Veterinarian, Tenessee, v.6, n.7, p. 417-424, 1984.

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

LIMA, M. M. **Comparação entre diferentes políticas anti-tuberculose por meio de simulação epidemiológica em Ribeirão Preto/São Paulo 1980 a 1995**. 1995. p. 2-5. Tese (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

LISS, G. M.; WONG, L.; KITTLE, D. C.; SIMOR, A.; NAUS, M.; MARTIQUET, P.; MISENER, C. R. Ocupacional exposure to Mycobacterium bovis infection in deer and elk in Ontario. **Canadian Journal of Public Health**, v. 85, p. 211-24, 1982.

LITTLE, T. W. A.; SWAN, C.; THOMPSON, H. V.; WILLESMTIH, J. W. Bovine tuberculosis in domestic and wild mammals in area of Dorset II. The badger population, its ecology and tuberculosis status. **The Journal of Hygiene**, v. 89, p. 211-224, 1982.

LUKE, D. Tuberculosis in the horse, pig, sheep and goat. **Veterinary Record**, v. 70, n. 26, p. 529-536, 1958.

LUMA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3th ed. New York: McGraw Hill, 1968.

MADRUGA, G. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360 p.

MAISI, P.; RIIPINEN, I. Pathogenicity of different species of staphylococci in caprine udder. **British Veterinary. Journal**, v. 147, p. 126-132, 1991.

Referências

- MARCONDES, A. G.; SHIKAMA, M. L. M.; VASCONCELLOS, S. A.; BENITES, N. R.; MORAIS, Z. M.; ROXO, E.; DIAS, R. A.; LEÃO, S. L. P.; PINHEIRO, S. R. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 361-369, 2006.
- MCKAY, W. M. Bovine tuberculous mastitis. **Veterinary Record**, v. 53, n. 39, p. 565-567, 1941.
- MELO, M. T.; MELO, L. E. H.; SALDANHA, S. V.; EVÊNCIO-NETO, J.; TENORIO, T. G. S.; NASCIMENTO, E. T. S.; FERNANDES, A. C. C. Ocorrência da tuberculose caprina no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 25, 2005. Suplemento 2. Trabalho apresentado na Reunião do Instituto Biológico, 18, São Paulo.
- MENDONÇA, A.; VALENTIM, R.; MAURÍCIO, R.; CARDOSO, M.; CORREIA, T.; COELHO, A. Mastites subclínicas em cabras serranas. Resultados preliminares. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 561/562, p. 175-180, 2007.
- MENZIES, F. D.; NEILL, S. D. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. **The Journal**, v. 160, p. 92-106, 2000.
- MENZIES, P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 333-358, 2001.
- MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. São Paulo: editora Pedagógica Universal, 1980. 227p.
- MILNE, A. H. An outbreak of tuberculosis in goats in Taganyica. **Veterinary Record**, v. 647, p. 374-375, 1955.
- MODA, G.; DABORN, C. J.; GRANGE, J. M.; COSI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tubercle and Lung Disease**, v. 77, p. 103-108, 1996.
- MOHAN, R. Incidence of tuberculosis in goats. **Indian Veterinary Journal**, v. 27, p. 153-157, 1950.
- MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZADA, J.F.; QUINN, P.J. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v.40, n. 1/4, p. 111-124, 1994.

Referências

- MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M.; RUFFO, G.; CARLI, S.; VARISCO, G.; BOETTCHER, P. Subclínical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian Herds. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 1694-1704, 2005.
- MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 153-177, 1994.
- MOTA, P. M. P. C.; NAKAJIMA, M. Tuberculose bovina. In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. **Doenças de bovino de leite adulto**. Coronel Pacheco: EMBRAPA - CNPGL, 1992. p. 97-122.
- MOTA, R. A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 3, p. 57-61, 2008. Trabalho apresentado no 3º Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, em 2007, em João Pessoa.
- MURRAY, C.; MCNUTT, S. H.; PURWIN, P. Tuberculosis of goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 59, n. 1, p. 82-84, 1921.
- NATZKE, R. P.; EVERETT, R. W.; GUTHRIE, R. S.; KEOWN, J. F.; MEEK, A. M.; MERRILL, W. G.; ROBERTS, S. J.; SCHMIDT, G. H. Mastitis control program: effect on milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 9, p. 1256-1260, 1972.
- NAZÁRIO, W.; MARTINI, M.; CAMBIA, A. M. Tuberculose: um poderoso inimigo que deve ser evitado. **Balde Branco**, v. 22, n. 271, p. 24-26, 1987.
- NEILL, S. D.; BYRSON, D. J.; POLLOCK, J. D. Pathogenises of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1/2, p. 79-86, 2001.
- NEILL, S. D.; POLLOCK, J. D.; BYRSON, D. J.; HANNA, J. Pathogenises of tuberculosis in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 41-52, 1994.
- NEWEELL, D. G.; HEWINSON, R. G. Control of Bovine tuberculosis by vaccination. **Veterinary Record**, v. 136, p. 459-463, 1995.
- NOLAN, A.; WIKLEESMITH, J. W. Tuberculosis in badgers (*Meles meles*). **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 179-191, 1994.
- O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, p. 1-46, 1995. Supplement 1.

Referências

- OIE (Organização Internacional de Epizootias). Bovine tuberculosis. 2005. Disponível em : <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2009.
- OLIVEIRA, S. J.; PIANTA, C.; RAMOS, E. T.; AVEVEDO, C. A. P.; ANTUNES, C. A. B.; SILVA, F. M. Saludu publica veterinária: um estúdio sobre tuberculosis em ganado lechero. **Boletín de la Oficina Saintaria Panamericana**, v. 4, p. 142-149, 1983.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. El control de la tuberculosis em las Américas: tuberculosis control in the Americas. **Boletín Epidemiológico**, v. 19, n. 2, p. 1-8, 1998.
- PALMER, M. V.; WATERS, W. R.; WHIPPLE, D. L. Milk containing *Mycobacterium bovis* as source of infection for white-tailed deer farms (*Odocoileus virginianies*). **Tuberculosis**, v. 82, n. 4/5, p. 161-165, 2002.
- PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, I. J.; CHI, K. D. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.
- PAULA, A. Tuberculose: ontem, hoje e amanhã. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 55, n. 1, p. 74-98, 1998.
- PEDELEY, S.; BARTRANN, J.; REES, G.; DUFOUR, A.; COUTRUVO, J. A. Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management. In: EMERGING issues in water and infectious diseases. [S.l.]: IWA, 2004. 273 p. Edição especial.
- PEREIRA, J. J. **Doenças infecciosas**: tuberculose. Florianópolis: [s.n.], 1980. 4 p.
- PERZ, A.; RENEIRO, A.; FORTEIS, A.; MEREGALLI, S.; LOPÉZ, B.; RITACCO, V. Estúdio de *Mycobacterium bovis* em leche mediante métodos bacteriológicos y reacción en cadena de la polimerase. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 34, n. 1, p. 45-51, 2001.
- PESQUISA Pecuária Municipal. In: IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA). 2005. Disponível em : <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em : 18 nov. 2007.

Referências

PIGNATA, W. A.; ALVES, C. J.; AZEVADO, S. S.; DANTAS, A. F.; GOMES, A. A. B.; REMÍGIO, F. R.; LIMA, F. S.; MOTA, P. M. P. Prevalência para a tuberculose caprina no semi-árido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 526-532, 2009.

PINHEIRO, S. R. **Influência da origem da estirpe AN5 de *Mycobacterium bovis*, da temperatura de contato e da matéria orgânica sobre a atividade micobactericida do hipoclorito de sódio ou aldeídos**. 1994. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

PINHEIRO, S. R.; ROXO, E.; ALMEIDA, C. A. S.; VASCONCELLOS, S. A.; SILVA SANTOS, M. C.; MAIORKA, P. C.; MELLVILLE, A. M. P.; BENITES, N. C.; PAES, A. C. Surto de tuberculose em caprinos (*Capras hircus*): relato de caso. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 13., 2007, Campo Grande, M. S. **Anais...** Campo Grande, 2007. p. 34.

POLLOCK, J. D.; MACNAIR, J.; WELSH, M. D.; GIRVIN, R. M.; KENNEDY, H. E.; MACKIE, D. P.; NEILL, S. D. Immune reponses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1/2, p. 103-107, 2001.

POLLOCK, J. D.; MACNAIR, J.; WELSH, M. D.; GIRVIN, R. M.; KENNEDY, H. E.; MACKIE, D. P.; NEILL, S. D. Immune reponses in bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1/2, p. 103-107, 2001.

POLLOCK, J. D.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **The Veterinary Journal**, v. 163, p. 115-127, 2002.

PORTER, J. D. H.; MCADAM, K. P. W. J. (Ed.). **Tuberculosis**: back to future. Chichester: John Wiley & Sons, 1994. p. 14-18. (London School of Hygiene & Tropical Medicine Annual Public Health Forum).

POUTREL, B. Staphylococcus sciuri subsp lentus associated with goat mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 2084-2085, 1984a.

POUTREL, B. Udder infection of goats by coagulase-negative staphylococci. **Veterinary Microbiology**, v. 9, p. 131-137, 1984b.

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

PRODUCTION YEARBOOK. Roma: FAO, 1988. v. 42, p. 192-194.

Referências

PRODUCTION YEARBOOK. Roma: FAO, 1993. v. 47, p. 185-192.

PRODUCTION YEARBOOK. Roma: FAO, 1994. v. 48, 350 p

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. C.; LEONARD, F. C. **Mycobacterium species**. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. London: Blackwell Science, 2002.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J. C.; LEONARD, F. C.; MAGUIRE, D. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RADOSTITS, O. M.; GA Y, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos e eqüinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 541-629, 817-827.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine**: a textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9. ed. Londres: W.B. Saunders, 2000. 1737 p.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura**: criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, 2006.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura**: criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, 1998. 318 p.

RIET-CORREA, F.; GARCIAS, M. Tuberculose. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS, R.A. A. (Org.) **Doenças da ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, v. 1, p. 351-362.

ROLET, S. J.; SCHMIDT, G. Mastitis control program effect on milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 1256-1260, 1972.

ROSEMBERG, G. **Enfermedades de los bovinos**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1983. v. 2 p. 139-151.

ROSEMBERG, V.; TARANTINO, A. B.; PAULA, A. Tuberculose. In: TARANTINO, A. B. **Doenças pulmonares**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 233-297.

Referências

ROTHSCHILD, B. M.; MARTIN, L. D.; LEV, G.; BERCOVIER, H.; BAR-GAL, G. K.; GREENBLATT, C.; DONOGHUE, H.; SIGELMAN, M.; BRITTAN, D. Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct bison dates 17.000 years before the present. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 33, p. 305-311, 2001.

ROXO, E. **Avaliação da resposta imunoalérgica cutânea á tuberculina em bubalinos (*Bubalus bubalus*)**. 1996. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

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

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

RUGGIERO, A. P.; IKUMO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

SALES, A. O.; RODRIGUES, S. J. P.; BACCHI, E. B. Estudos comparativos entre os métodos LSAB + e Herceptest para a detecção de HER-2/neu em carcinoma de mama. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 265-271, 2004.

SANTOS, J. A. **Patologia especial dos animais domésticos**: mamíferos e aves. 2 ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1979. p. 185-186.

SANTOS, L. A. R. **Co-infecção tuberculose/HIV no estado de São Paulo**: contribuição ao processo de vigilância epidemiológica da tuberculose. 1995. ? f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

SANTOS, L. F.; CASTRO, R. S.; COSTA, E. O. California mastitis test e whiteside modificado como critérios de triagem para mastite caprina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 295-298, 1995.

SAURET, J.; JOLIS, R.; AUSINA, V.; CASTRO, E.; CORNUDELLA, R. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. **Tubercle and Lung Diseases**, v. 73, p. 388-391, 1992.

Referências

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development and California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

SCHULTSZ, C.; KUIJPER, E. J.; VAN SOOLINGEN, D.; PRINS, J. M. Disseminated infection due to multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* in a patient who was seropositive for human immunodeficiency virus. **Clinical Infectious Disease**, v. 23, p. 841-843, 1996.

SEVA, J.; HERNÁNDEZ, D.; BERNABÉ, A.; PALLARÉS, F. J.; NAVARRO, J. A. Immunophenotypical characterization of the lymphocyte infiltrate in caprine pulmonary tuberculosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, n. 2/3, p. 96-103, 2000.

SEVA, J.; MENCHÉN, V.; NAVARRO, J. A.; PALLARÉS, F. J.; VILLAR, D.; VÁSQUEZ, F.; BERNABÉ, A. Caprine tuberculosis eradication program: an immunohistochemical study. **Small Ruminant Research**, v. 46, p. 107-114, 2002.

SHARAN, A.; THAKUR, H. N.; PRASAD, L. N.; MUKHERJEE, G.; SINHA, A. K. A note on tuberculosis in goats. **Indian Veterinary Medical Journal**, v. 12, n. 3, p. 184-186, 1988.

SILVA, E. R.; ARAÚJO, A. M.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; SAUKAS, T. N. Associação entre o California Mastitis Test e a contagem de células somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 46-48, 2001.

SILVA, E. R.; SAUKAS, T. N.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Contagem de células somáticas e California Mastitis Test no diagnóstico da mastite caprina subclínica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 78-83, 1996.

SILVA, P. E. G.; PINHEIRO, S. R.; LEAL, M. L. R.; BERTAGNON, H. G.; MOTTA, P. M. P. C.; SINHORINI, I. L.; VASCONCELLOS, S. A.; BENESI, F. J. Teste de tuberculinização em caprinos (*Capra hircus*) experimentalmente sensibilizados. **Ciências Rurais**, v. 36, n. 3, p. 880-886, 2006.

SMITH, B. P. **Medicina Interna de grandes animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2006.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos**. São Paulo: Manole, 1993. 2 v., p. 620-621, 1218.

Referências

- SMITH, M. C.; ROGUINSKY, M. Mastitis and other diseases of the goat's udder. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 12, p. 1241-1248, 1977.
- SOLIMAN, K. N.; ROLLINSON, D. H. L.; BARRON, N. S.; SPRATLING, F. R. An outbreak of naturally acquired tuberculosis in goats. **Veterinary Record**, v. 65, n. 27, p. 421-425, 1953.
- SOUZA, A. V.; SOUSA, C. F. A.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, A. L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 59, p. 22-27, 1999.
- STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* Isolados de leite *in natura*. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.
- STETTER, M. D.; MIKOTA, S. K.; GUTTER, A. F.; MONTERROSO, E. R.; DALOVISIO, J. R.; DEGRAW, C.; FARLEY, T. Epizootic of *Mycobacterium bovis* in a zoologic park. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 12, p. 1618-1621, 1995.
- STONEBRINK, B. The use of a pyruvate containing egg medium in the culture of soniacid resistant strain of *Mycobacterim tuberculosis var. hominis*. **Acta Tuberculosea Scandinavica**, v. 35, p.67-80, 1958.
- SUCCI, R. C. M. Tuberculose. **Clinical Pediatrics**, v. 2, n. 12, p. 30-38, 1976.
- TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BÖTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid indentification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinic Microbiology**, v. 31, p. 175-178, 1993.
- THOEN, C. B. Tuberculosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 9, p. 1045-1048, 1988.
- THOEN, C. O.; KARLSON, A. G.; HIMES, E. M. Mycobacterial infections in animals. **Emerging Infections Disease**, v. 3, p. 960-978, 1981.
- THOMPSON, P. J.; COUSINS, D. V.; GOW, B. L.; COLLINS, D. M.; WILLIAMSON, B. H.; DAGNIA, H. T. Seals, seal trainers, and Mycobacterial infection. **American Review of Respiratory Disease Journal Article**, v. 147, p. 164-167, 1993.

Referências

- THOREL, M. F.; GAUMONT, R. Contribution à l'étude des reactions sérologiques et allergiques chez la chèvre sensibilisée par des antigènes tuberculeux. **Bulletin de L'Académie Vétérinaire de France**, v. 50, p. 549-568, 1977.
- THOREL, M. F.; MOUTOU, F. Tuberculose et animaux sauvages. **Point Vétérinaire**, v. 26, n. 159, p. 27-34, 1994.
- TONIN, F. B.; NADER FILHO, A. Correlação entre o California Mastitis Test e o exame bacteriológico no leite de cabras. **ARS Veterinária**, v. 21, p. 155-159, 2005. Suplemento.
- TORRANCE, H. L. The paths of infection in udder tuberculosis. **Veterinary Record**, v. 49, n. 46, p. 1441-1445, 1937.
- TROWE, M.; DONAGY, J. *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheese. **Dairy Technology**, v. 61, n. 4, p. 317-326, 2008.
- TUBERCULOSE bovina. **Revista Criadores**, v. 42, n. 510, p. 94, 1972.
- TWEDDLE, N. E.; LIVINGSTONE, P. Bovine Tuberculosis control and Eradication Programs in Australia and New Zealand. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 23-29, 1994.
- USABIAGA, J. **Brucelosis y tuberculosis bovina: ¿ control o eliminación?** São Paulo: OMS, 2001. (RMSA 12/15).
- VAITSMAN, J. Importância dos animais na expansão e transmissão da tuberculose humana. **Agricultura Hoje**, v. 1, n. 6, p. 22-23, 1975.
- VASCONCELLOS, S. A. Epidemiologia da tuberculose. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 3, n. 1/2, p. 81-89, 1979.
- WANASINGHE, D. D.; PINTO, M. R. M.; NAVARATNAN, C.; WELIANGE, L. V. Studies in tuberculin sensitivity of livestock in Ceylon. III: patterns of sensitivity in goats. **Ceylon Veterinary Journal**, v. 21, n. 3/4, p. 46-56, 1973.
- WEDLOCK, D. N.; SKINNER, M. A.; LISLE, G. M.; BUDDLE, B. M. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 471-486, 2002.

Referências

WEIR, J.; BARBOUR, D. Tuberculosis of the udder and its differential diagnosis. **Veterinary Record**, v. 62, n. 16, p. 239-243, 1950.

WELLINGTON, M. Tuberculosis in a south Canterbury goat flock. **Surveillance**, v. 16, n. 1, p. 22-23, 1988.

WHITING, T. L.; TESSARO, S. V. Na abattoir study of tuberculosis in herd of farmed elk. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, n. 8, p. 497-501, 1994.

WICKOFF III, J. H. Bovine T lymphocyte responses to Brucella abortus. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 395-415, 2002.

WIESNER, E. **Enfermedades del ganado bovino**. Zaragoza: Acribia, 1973. p. 123-129, 370-371.

WILESMITH, J. W.; LITTLE, T. W. A.; THOMPSON, H. V.; SWAN, C. Bovine tuberculosis in domestic and wild mammals in an area of Dorest. I. Tuberculosis in cattle. **The Journal of Hygiene**, v. 89, p. 195-210, 1982.

WOLINSKY, E. Nontuberculous Mycobacteria and associated diseases. **American Review Respiratory Disease Journal Article**, v. 199, p. 107-159, 1979.

WOOD, P. R.; JONES, S. L. Bovingam na in vitro celular diagnóstico test for bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 81, p. 147-155, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zoonotic tuberculosis (Mycobacterium bovis) memorandum from a WHO meeting with the participation of FAO. **Bulletin of World Health Organization**, v. 72, p. 8510-8857, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet Nº 104** : tuberculosis. Geneva: WHO, 2002. Disponível em :
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>>. Acesso em : 10 dez. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases**. Geneva: WHO, 1984. 49 p. (WHO/VPH, 84.4).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint FAO/WHO. Expert. Committee on Zoonoses. **Third report**. Geneva, 1967. 127 p. (Technical report series, 378).

Referências

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the Who meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) with the participation of FAO.** Geneva, 1993.

YATES, M. D. **The differentiation and epidemiology of tubercle bacilli and study into the identification of certain other mycobacteria.** 1984. Thesis (Master of Philosophy). Londres, 1984.

YATES, M. D.; GRANGE, J. M. Incidence and nature of human tuberculosis due to bovine tubercle bacilli in South-East England: 1977-1987. **Epidemiology of Infection**, v. 101, p. 225-229, 1988.

ZACARÍAS, F.; GONZÁLES, R. S.; CUCHÍ, P.; YÁÑEZ, A.; PERUGA, A.; MAZÍN, R.; BETTS, C.; WEISSENBACHER, M. HIV/AIDS and its interaction with tuberculosis in Latin America and the Caribbean. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 28, p. 312-323, 1994.

ZACHARIAS, F. **Caprinocultura leiteira: mercado e orientações de manejo.** Salvador : EBDA, 2001. 80 p. (EBDA, Documentos, 13).

ZAKI, M. H.; HIBBERD, M. E. The tuberculosis story: from Koch to the year 2000. **CADUEUS**, v. 12, p. 43-60, 1996.

ZINK, A. R.; NERLICH, A. G. Molecular strain identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in archival tissue samples. **Journal of Clinic Pathology**, v. 57, p. 1185-1192, 2004.

APÊNDICE A - Exame clínico dos caprinos estudados

Tabela 10 – Resultado do exame clínico dos 68 caprinos positivos à tuberculina

(Continua)

Cabra	Glândula Mamária	Tamis	CMT	Escore Clínico		Auscultação Pulmonar	
				Glândula	Leite	Interpretação	Auscultação
184	1D	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	2E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração		
108	5D	Grumos	3+	Granulomatoso	Grumos	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	6E	Flocos Pequenos	Negativo	Macio	Flocos Pequenos		
94	7D	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	8E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração		
130	11D	Grumos	2+	Granulomatoso	Flocos Pequenos	Negativo	Normal
	12E	Pus	3+	Ganulomatoso	Pus		
127	15D	Seroso	Negativo	Macio	Seroso	Negativo	Normal
	16E	Seroso	Negativo	Macio	Seroso		
81	17D	Seca	-			Negativo	Normal
	18E	Seca	-				
43	21D	Flocos Pequenos	2+	Granulomatoso	Flocos Pequenos	Negativo	Normal
	22E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração		
133	23D	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	24E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração		
52	25D	Normal	Negativo	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	26E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração		
474	27D	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	28E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração		
21	29D	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	30E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração		
129	31D	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	32E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração		
39	33D	Normal	Negativo	Fibrosado	Seroso	Negativo	Normal
	34E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração

Tabela 10 – Resultado do exame clínico dos 68 caprinos positivos à tuberculina

(Continua)

Cabra	Glândula Mamária	Tamis	CMT	Escore Clínico		Auscultação Pulmonar	
				Glândula	Leite	Interpretação	Auscultação
20	35D	Grumos	2+	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	36E	Grumos	2+	Macio	Sem alteração		
63	37D	Grumos	2+	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	38E	Grumos	2+	Macio	Sem alteração		
86	41D	Normal	2+	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	42e	Normal	2+	Macio	Sem alteração		
197	43D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	44E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
91	45D	Seroso	Negativo	Macio	Sem alteração	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	46E	Seroso	Negativo	Macio	Sem alteração		
101	47D	Normal	2+	Fibrosado	Seroso	Negativo	Normal
	48E	Normal	2+	Fibrosado	Seroso		
144	49D	Normal	2+	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	50E	Normal	2+	Macio	Sem alteração		
57	51D	Normal	2+	Fibrosado	Seroso	Negativo	Normal
	52E	Grumos	2+	Granulomatoso	Seroso		
146	59D	Grumos	2+	Fibrosado	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	60E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
114	61D	Seroso	Negativo	Fibrosado	Seroso	Negativo	Normal
	62E	Seroso	Negativo	Fibrosao	Seroso		
115	63D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	64E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
413	65D	Normal	2+	Macio	Sem alteração	Crepitação Grossa	>Líquido interior Brônquios
	66E	Normal	Negativo	Macio	Sem alteração		
22	67D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	68E	Normal	2+	Ganulomatoso	Seroso		
17	69D	Normal	2+	Macio	Seroso	Negativo	Normal
	70E	Normal	2+	Macio	Seroso		
416	71D	Normal	2+	Fibrosado	Seroso	Negativo	Normal
	72E	Normal	2+	Fibrosado	Seroso		
142	73D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	74E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
157	75D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	76E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
26	77D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios

Tabela 10 – Resultado do exame clínico dos 68 caprinos positivos à tuberculina

(Continua)

Cabra	Glândula Mamária	Tamis	CMT	Escore Clínico		Auscultação Pulmonar	
				Glândula	Leite	Interpretação	Auscultação
156	115D	Normal	2+	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	116E	Normal	2+	Macio	Sem alteração		
254	117D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	118E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
1160	119D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	120E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
255	121D	Normal	2+	Fibrosado	Flocos pequenos	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	122E	Grumos	2+	Fibrosado	Flocos pequenos		
391	125D	Normal	3+	Fibrosado	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	126E	Normal	2+	Fibrosado	Seroso		
469	127D	Normal	2+	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	128E	Normal	2+	Macio	Sem alteração		
406	129D	Normal	2+	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	132E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
407	133D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	134E	Normal	2+	Macio	Sem alteração		
851	135D	Flocos pequeno	2+	Granulomatoso	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	136E	Normal	2+	Macio	Sem alteração		
491	137D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	138E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
323	139D	Normal	2+	Fibrosado	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior brônquios
	140E	Normal	2+	Fibrosado	Seroso		
1039	141D	Normal	2+	Edemaciado	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior Brônquios
	142E	Normal	2+	Macio	Sem alteração		
47B	143D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	144E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
313	145D	Normal	3+	Macio	Seroso	Negativo	Normal
	146E	Normal	2+	Macio	Seroso		
297	147D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior Brônquios
	148E	Normal	Negativo	Fibrosado	Seroso		
1079	149D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior Brônquios
	150E	Normal	2+	Macio	Sem alteração

Tabela 10 – Resultado do exame clínico dos 68 caprinos positivos à tuberculina
(Conclusão)

Cabra	Glândula Mamária	Tamis	CMT	Escore Clínico		Auscultação Pulmonar	
				Glândula	Leite	Interpretação	Auscultação
311	153D	Grumos	2+	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	152E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
497	153D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	154E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
888	156D	Flocos pequeno	2+	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	157E	Normal	2+	Macio	Sem alteração		
163	53D	Normal	Negativo	Granulomatoso	Seroso	Negativo	Normal
	54E	Grumos	2+	Granulomatoso	Seroso		
181	131D	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso	Crepitação Grossa	>Líquido interior Brônquios
	132E	Normal	2+	Granulomatoso	Seroso		
361	83E	Normal	2+	Macio	Sem alteração	Negativo	Normal
	84D	Normal	2+	Macio	Sem alteração

APÊNDICE B - Histopatológico da Glândula Mamária

Tabela 11 – Resultados histopatológicos dos fragmentos de glândula mamária dos 30 animais submetidos à necropsia, positivos à tuberculina

(Continua)

Animal	G.M.	Med	Histopatológico
184	1D	3	Apresenta infiltrado inflamatório MN severo e PMN moderado Apresenta vasos congestos com presença de células plasmática Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
	2E	3	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Mastite crônica
108	5D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Apresenta vasos congestos com presença de células plasmáticas Ácinos com presença de leite Áreas de necrose caseosa Severa formação de granuloma Ver resultados Mastite crônica
	6E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Apresenta vasos congestos com presença de células plasmáticas Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
94	7D	4	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Mastite Crônica
	8E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN severo Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo, Mastite crônica
30	11D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN severo Ácinos com presença de leite Mastite crônica
	12E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
127	15D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN leve Ácinos com leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
	16E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Presença de células plasmáticas Mastite crônica
43	21D	3	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN moderado Ácinos com leite Presença de células plasmáticas Mastite crônica
	22E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PNM moderado Ácinos com presença de leite Mastite crônica

Tabela 11 – Resultados histopatológicos dos fragmentos de glândula mamária dos 30 animais submetidos à necropsia, positivos à tuberculina

(Continua)

Animal	G.M	Med	Histopatológico
81	17D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PM moderado Ácinos com leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
	18E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com leite Mastite crônica
133	23D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com leite Mastite crônica
	24E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
52	25D	3	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN leve Ácinos com leite Vasos congestão Mastite crônica
	26E	2	Apresenta infiltrado inflamatório leve MN e PMN leve Ácinos com leite Vasos congestos Mastite crônica
474	27D	4	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN moderado Ácinos com leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
	28E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Apresenta vasos congestos com presença de células plasmáticas Ácinos com presença de leite Áreas de necrose caseosa Severa formação granulomatosa, Mastite crônica
21	29D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Mastite crônica
	30E	3,5	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
129	31D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Áreas de necrose caseosa Severa formação granulomatosa Mastite crônica
	32E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Mastite crônica

Tabela 11 – Resultados histopatológicos dos fragmentos de glândula mamária dos 30 animais submetidos à necropsia, positivos à tuberculina

(Continua)

Animal	GM	Med	Histológico
20	35D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN leve Ácinos com presença de leite Mastite crônica
	36E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo, Mastite crônica
63	37D	2	Apresenta infiltrado inflamatório leve MN e PMN leve Ácinos com presença de leite Mastite crônica
	38E	3	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN leve Ácinos com presença de leite Mastite crônica
86	41D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Mastite crônica
	42E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Vasos congestos Mastite crônica
197	43D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
	44E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN leve Ácinos com presença de leite Mastite crônica
91	45D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN leve Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
	46E	3	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN leve Ácinos com presença de leite Mastite crônica
101	47D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
	48E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Mastite crônica
144	49D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Áreas de necrose caseosa Severa formação granulomatosa Mastite crônica
	50E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Mastite crônica

Tabela 11 – Resultados histopatológicos dos fragmentos de glândula mamária dos 30 animais submetidos à necropsia, positivos à tuberculina
(Conclusão)

Animal	GM	Med	Histológico
57	51D	3	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN leve Ácinos com presença de leite Mastite crônica
	52E	3	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN leve Mastite crônica
163	53D	3,5	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN leve Ácinos com presença de leite Mastite crônica
	54E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Vasos congestos Apresenta processo de reparo Mastite crônica
146	59D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com presença de leite Apresenta processo de reparo Mastite crônica
	60E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN severo Ácinos com presença de leite Áreas de necrose caseosa/Severa formação granulomatosa Mastite crônica
114	61D	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN moderado Ácinos com leite Mastite crônica
	62E	4	Apresenta infiltrado inflamatório severo MN e PMN severo Ácinos com presença de leite Áreas de necrose caseosa Severa formação granulomatosa Mastite crônica
115	63D	4	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN leve Ácinos com leite Mastite crônica
	64E	3	Apresenta infiltrado inflamatório moderado MN e PMN leve Ácinos com presença de leite Vasos congestos Mastite crônica

APÊNDICE C - Resumo dos resultados encontrados nas 68 cabras tuberculina positivo

Tabela 12 – Resultados dos testes e exames realizados nas amostras de leite e fragmentos de glândula nos caprinos estudados

(Continua)

Animal	GM	T	CMT	M. L.	M. G.M.	TB L	ZNL	TB GM	ZNGM	H.H.E.	H. ZN
184	1D	-	-	#	-	#	#	-	-	-	¥
	2E	-	-	#	-	#	#	-	-		¥
108	5D	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
	6E	+	+	+	+	-	-	-	-		¥
94	7D	-	-	+x	-	-	-	-	-	-	¥
	8E	-	-	-	-	-	-	-	-		¥
130	11D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
	12E	+	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
127	15D	+	-	#	-	#	-	-	-	-	¥
	16E	+	-	#	-	#	-	-	-		¥
81	17D	*	*	*	-	*	-	-	-	-	¥
	18E	*	*	*	-	*	-	-	-	-	¥
43	21D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
	22E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥
133	23D	-	-	#	-	#	#	-	-	-	¥
	24E	-	-	#	-	#	#	-	-		¥
52	25D	-	-	#	-	#	#	-	-	-	¥
	26E	-	-	#	-	#	#	-	-	-	¥
474	27D	-	-	#	-	#	#	+	-		¥
	28E	-	-	#	-	#	#	-	-	+	-
21	29D	-	-	#	-	#	#	-	-		¥
	30E	-	-	#	-	#	#	-	-	-	¥
129	31D	-	-	#	-	#	#	-	-	+	-
	32E	-	-	#	-	#	#	-	-	-	¥
39	33D	-	-	+	#	-	-	#	#	#	#
	34E	-	-	-	#	-	-	#	#	-	¥
20	35D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
	36E	+	+	-	-	-	-	-	-		¥
63	37D	+	+	+x	-	+	-	-	-	-	¥
	38E	+	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
86	41D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	¥
	42E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	¥
197	43D	-	+	+	-	+	-	-	-		¥
	44E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	¥
91	45D	+	-	-	-	-	-	-	-		¥
	46E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	¥
101	47D	-	+	-	-	+	+	-	-		¥
	48E	-	+	+	-	-	-	+	-	-	¥
144	49D	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	50E	-	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
57	51D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
	52E	-	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
163	53D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥
	54E	+	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
146	59D	+	+	+	-	-	-	-	-		-
	60E	-	+	-	+	+	+	-	-	+	¥

Apêndices

Tabela12 – Resultados dos testes e exames realizados nas amostras de leite e fragmentos de glândula nos caprinos estudados

(Continua)

Animal	G.M	T	CMT	M.L	M.GM	TB.L	ZNL	TBGM	ZNGN	HHE	HZN
114	61D	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	62E	+	-	-	+	-	-	-	-	+	¥
115	63D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
	64E	-	+	+	+	-	-	-	-	-	¥
413	65D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
	66E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥
22	67D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
	68E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	¥
416	71D	-	+	+	#	-	-	-	-	#	#
	72E	-	+	-	#	-	-	-	-	#	#
142	73D	-	+	+	#	-	-	-	-	#	#
	74E	-	+	-	#	+	-	-	-	#	#
26	77D	-	+	+	+	-	-	-	-	-	¥
	78E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	¥
100	79D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
	80E	-	+	-	-	-	-	-	-	-	¥
356	81D	-	+	-	#	-	-	-	-	#	#
	82E	-	+	-	#	-	-	-	-	#	#
361	83D	-	+	-	#	-	-	-	-	#	#
	84E	-	+	-	#	-	-	-	-	#	#
269	87D	+	+	+α	#	-	-	-	-	#	#
	88E	+	+	-	#	-	-	-	-	#	#
158	89D	+	+	+	#	-	-	-	-	#	#
	90E	+	+	+	#	-	-	-	-	#	#
244	91D	-	+	+	#	-	-	-	-	#	#
	92E	-	+	+	#	-	-	-	-	#	#
373	95D	-	+	+	#	-	-	-	-	#	#
	96E	-	+	+	#	-	-	-	-	#	#
153	97D	+	+	-	#	-	-	-	-	#	#
	98E	+	+	+α	#	-	-	-	-	#	#
199	99D	-	+	+	#	-	-	-	-	#	#
	100E	-	+	+	#	-	-	-	-	#	#
468	101D	-	+	-	#	-	-	-	-	#	#
	102E	-	+	-	#	-	-	-	-	#	#
	104E	-	+	-	#	+	+	-	-	#	#
31	105D	+	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	106E	+	+	-	#	-	-	#	#	#	#
259	107D	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	108E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
420	109D	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
	110E	*	*	-	#	-	-	#	#	#	#
849	111D	-	+	+	#	+	-	#	#	#	#
	112E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
04	113D	+	+	+	#	-	-	#	#	#	#
	114E	+	+	+	#	-	-	#	#	#	#
156	115D	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
	116E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
254	117D	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	118E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#

Apêndices

Tabela 12 – Resultados dos testes e exames realizados nas amostras de leite e fragmentos de glândula nos caprinos estudados

(Conclusão)

Animal	G.M	T	CMT	M.L	M.GM	TB.L	ZNL	TBGM	ZNGN	HHE	HZN
1160	119D	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
	120E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
255	121D	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	122E	+	+	+	#	-	-	#	#	#	#
469	127D	-	+	-	#	+	-	#	#	#	#
	128E	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
181	131D	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	132E	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
407	133D	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	134E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
851	135D	+	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	136E	-	+	+*	#	-	-	#	#	#	#
491	137D	-	+	+	#	+	-	#	#	#	#
	138E	-	+	+		-	-	#	#	#	#
323	139D	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
	140E	-	+	+*	#	-	-	#	#	#	#
1039	141D	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	142E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
47B	143D	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
	144E	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
313	145D	-	+	+	#	+	+	#	#	#	#
	146E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
297	147D	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
	148E	-	-	+	#	-	-	#	#	#	#
1079	149D	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	150E	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
311	151D	+	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	152E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
497	153D	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
	154E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
888	155D	+	+	+	-	+	+	#	#		¥
	156E	-	+	+	-	-	-	#	#		¥
391	125D	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#
	126E	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
157	75D	-	+	-	-	-	-	#	#	+	-
	76E	-	+	+*	-	-	-	+	-	-	¥
406	129D	-	+	-	#	-	-	#	#	#	#
	130E	-	+	+	#	-	-	#	#	#	#

Legenda: G.M.= Glândula Mamária

T= Tamis

CMT= California Mastitis Test

ML= Microbiológico do Leite

MGM= Microbiológico da Glândula Mamária

TBL = Isolamento de *Mycobacterium* do Leite

ZNL= Teste de Ziehl-Neelsen do Leite

TBGM= Isolamento de *Mycobacterium* da Glândula Mamária

ZNGM= Teste de Ziehl-Neelsen da Glândula Mamária

HHE= Histológico coloração de Hematoxilina-Eusina

HZN= Histológico coloração de Ziehl-Neelsen

#= não coletado

*= animal seco

+* = dois isolamentos

□ = processo de reparo

¥= não realizado