Patrícia Miyuki Ohara

Microbiologia e histopatologia de linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Colheitas efetuadas de Maio/2002 à Janeiro/2004, São Paulo, Brasil.

São Paulo

2006

PATRÍCIA MIYUKI OHARA

Microbiologia e histopatologia de linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Colheitas efetuadas de Maio/2002 à Janeiro/2004, São Paulo, Brasil.

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 Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos

São Paulo

2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1749
FMVZ

Ohara, Patrícia Miyuki

Microbiologia e histopatologia de linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Colheitas efetuadas de maio/2002 à janeiro/2004, São Paulo, Brasil / Patrícia Miyuki Ohara. – São Paulo: P. M. Ohara, 2006.

103 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Sílvia Arruda Vasconcellos.

1. Linfonodos. 2. Bovinos. 3. Microbiologia. 4. Histopatologia. 5. Tuberculose. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Microrganismos isolados de linfadenites negativas para isolamento de *Mycobacterium bovis* em bovinos do Estado de São Paulo, colheitas efetuadas de maio/2002 à janeiro/2004", protocolo nº 857/2006, utilizando 148 fragmentos de linfonodos colhidos de bovinos abatidos em abatedouro, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Negatives lymphadenitis for isolation of *Mycobacterium bovis* in cattle of State of San Paulo, collect in May of 2002 to January of 2004", protocol number 857/2006, under the responsibility of Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 24 de março de 2006

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OHARA, Patrícia Miyuki

Título: Microbiologia e histopatologia de linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Colheitas efetuadas de Maio/2002 à Janeiro/2004, São Paulo, Brasil

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

*"Pai Nosso que estais no céu,
Santificado seja o Vosso Nome,
Venha a nós o Vosso Reino,
Seja feita a Vossa vontade,
Assim na terra como no céu.
O pão nosso de cada dia nos daí hoje;
Perdoai-nos a nossas ofensas assim como nós perdoamos
a quem nos tem ofendido.
E não nos deixeis cair em tentação,
Mas livrai-nos do mal
Amém"*

Dedico à Deus, meus pais (Nelson e Kiyomi), meus irmãos (Gilson e Júlio) e a minha família por todo apoio e dedicação em todos meus momentos

A todos meus animais que sempre estiveram comigo e aqueles que sempre serão lembrados por toda eternidade. Sou-lhes muito grata!

In memoriam: minhas chinchilas: Twingo, Pitchula, Dundunzinho, Snocopy; meus hamsters: Pingó e Penélope; minhas cadelas: Milly, Pink, Kika.... minha sagui: Teça

E aos meus atuais animais que tanto me fazem feliz e que me incentivam a cada dia mais: Pituxa, Wally e Tico

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades.

Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los.

Independentemente das circunstâncias, devemos ser humildes, recatados e despidos de orgulho"

Dalai Lama

Ao Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos pela oportunidade, por todo carinho, dedicação, paciência, ensinamentos e apoio em todos os momentos. Por ser um ótimo orientador.

A Prof. Dr. Sonia Regina Pinheiro por todo apoio, carinho, dedicação e muita força em todos os meus momentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alcides Vaz de Barros Guimarães que tanto me apoiou e incentivou a fazer pós-graduação.

Ao Prof. Dr. José Soares que me deu a oportunidade de conhecer o laboratório de zoonoses bacterianas e seguir o meu caminho.

Ao Prof. Paulo Maiorka pela inestimável ajuda na leitura das lâminas. Não há palavras suficientes que expressem o meu sincero agradecimento: Muito obrigada!

A Dr Eliana Roxo pelas idéias, conhecimentos e ajuda prestada.

Ao Prof Jerez e Prof Simone pela força e confiança.

À Zenaide Maria de Moraes e Gisele Oliveira de Souza por toda paciência, dedicação e ensinamentos.

Ao Emerson Ferraz Coelho,

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Os amigos

*“São tão amigos, que voltam,
São tão fraternos, que se unem.
São tão simples, que cativam.
São tão desprendidos, que doam.
São tão dignos, que amam, compreendem e perdoam.
São tão necessários, que sempre se fazem presentes.
São tão grandes, que se distinguem.
São tão dedicados, que edificam.
São tão preciosos, que se conservam.
São tão irmãos, que partilham.
São tão sábios, que ouvem, iluminam e calam.
São tão raros, que se consagram.
São tão frágeis, que fortalecem.
São tão importantes, que não se esquecem.
São tão fortes, que protegem.
São tão presentes, que participam.
São tão sagrados, que se perenizam.
São tão santos, que rezam.
São tão solidários, que esquecem de si mesmos.
São tão felizes, que fazem a festa.
São tão responsáveis, que vivem na verdade.
São tão livres, que crêem.
São tão fiéis, que esperam.
São tão unidos, que prosperam.
São tão amigos, que doam a vida.
São tão amigos, que se ETERNIZAM...”*

*“Esses são nossos amigos são
aqueles que devemos
guardar em um lugar muito
especial dentro de nossos corações”*

Aos amigos da pós-graduação que passamos por todos momentos de angústia, luta, perseverança e companheirismo: Vanessa Zappa, Eugênia Márcia de Deus Oliveira, Simone Ambrósio, Iara Silveira, Cristina Dibi, Leandro, Maria de Lourdes, Haroldo, Francisco, Rísia, Renata Paixão, Iara, Cristina Brito, Mariana, Flávia, Simone Miyashiro, Luciane, entre outros.

A Daniela Ribeiro pela tradução e força

Aos irmãos Alexandre e Sandra por todo inestimável apoio. Não tenho palavras que descrevam tudo que vocês me ajudaram: Muito obrigada!

Ao laboratório de Doenças Infecciosas: Prof. Dr. Nilson e Priscila pelos ensinamentos e oportunidade.

A todos os funcionários, docentes do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva Saúde Animal – VPS- FMVZ – USP pela amizade, companheirismo e por tudo.

AGRADECIMENTOS

Não importa a ordem da lembrança, a posição profissional, o motivo, a relevância do auxílio prestado... Todos foram muito importantes.... Àqueles que lembrei, deixo transcrito neste papel os meus sinceros agradecimentos...

Àqueles que por um lapso não fiz jus a esta seção, fica consignado em meu coração, o sentimento de gratidão...

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, em especial a Virgínia, Danival e Cristina

A Deyse, secretária da pós graduação por todo incentivo

A toda equipe da biblioteca da FMVZ-USP, principalmente D Elza, por toda ajuda prestada

“O caminho da Sabedoria é não ter medo de errar”

Brida

“É preciso correr riscos, seguir certos caminhos e abandonar outros.

Nenhuma pessoa é capaz de escolher sem medo.”

Brida

“Faça a sua parte e não se preocupe com os outros. Acredite que Deus também fala com eles, e que estão tão empenhados quanto você em descobrir o sentido desta vida.”

Brida

RESUMO

OHARA, P. M. **Microbiologia e histopatologia de linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Colheitas efetuadas de Maio/2002 à Janeiro/2004, São Paulo, Brasil.** [Microbiology and histopathology of bovine lymph nodes with lesions macroscopically suggestive of tuberculosis, collected from May/2002 to January/2004, São Paulo, Brazil]. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Linfonodos de 146 bovinos com lesões macroscópicas identificadas como sugestivas de tuberculose pelos Serviços de Inspeção Federal e Estadual de abatedouros do Estado de São Paulo, Brasil, no período de Maio de 2002 à Janeiro de 2004, conservadas em solução de borato de sódio em temperatura ambiente por no máximo 60 dias, negativos nos cultivos de micobactérias nos meios de Lowëstein-Jensen e Stonebrink com descontaminação por Petroff e HPC e conservadas por congelamento, foram submetidos a novos cultivos em Agar Sangue, Agar MacConkey e Agar Sabouraud bem como ao exame histopatológico pelas colorações de Hematoxilina-Eosina e Ziehl-Neelsen. Nos cultivos houve isolamentos de *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. solitarius*, *S. arlettae* e *S. epidermidis*. Não houve correlação entre as bactérias isoladas e a localização dos respectivos linfonodos. Os exames histopatológicos classificaram 49 animais isentos de qualquer lesão microscópica, 4 positivos para micobactérias sp, 18 fortemente sugestivos para micobactérias sp e 45 como processos atribuídos a outros agentes que não micobactérias. Não houve correlação entre o aspecto histológico dos linfonodos e o tipo de microrganismo isolado. Os microrganismos isolados foram considerados como contaminantes que tiveram acesso aos materiais durante os procedimentos de abate.

Palavras-chave: Linfonodos. Bovinos. Microbiologia. Histopatologia. Tuberculose.

ABSTRACT

OHARA, P. M. **Microbiology and histopathology of bovine lymph nodes with lesions macroscopically suggestive of tuberculosis, collected from May/2002 to January/2004, São Paulo, Brazil.** [Microbiologia e histopatologia de linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Colheitas efetuadas de Maio/2002 à Janeiro/2004, São Paulo, Brasil] 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Lymph nodes of 146 bovines presenting lesions identified macroscopically as suggestive of tuberculosis by the Federal and State Inspection Services of abattoirs at the State of São Paulo, Brazil, from May, 2002 to January, 2004, that were preserved in sodium borate solution at room temperature for no longer than 60 days, negative to mycobacteria culturing on Lowenstein-Jensen and Stonebrink media, decontaminated by Petroff and HPC methods and kept frozen, were subjected to new cultivations on blood, MacConkey and Sabouraud agars as well as to histopathological examination by Hematoxilin-Eosin and Ziehl-Neelsen coloration techniques. *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. solitarius*, *S. arlettae* and *S. epidermidis* were isolated by culturing. No correlation between the isolated bacteria and the respective lymph nodes localization was found. The histopathological classification of the animals was: 49 presented microscopically no lesion, 4 were *Mycobacterium* sp. positive, 18 were strongly suggestive of *Mycobacterium* sp. and 45 were attributed to agents other than mycobacteria. There was no correlation between the histological aspect of the lymphnodes and the microorganisms isolated. The isolated microorganisms were considered as contaminants that had access to these materials during the slaughter procedures.

Keywords: Lymphatic nodes. Bovine. Microbiology. Histopathology. Tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de granuloma: estrutura circular constituída pela área de necrose de caseificação, ao centro presença de calcificações, sendo esta necrose delimitada por um grupo de células inflamatórias mononucleares com predomínio de macrófagos que estão em um acúmulo concêntrico (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....57
- Figura 1b- Amostra positiva para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....58
- Figura 2a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de granuloma: estrutura circular constituída pela área de necrose de caseificação, ao centro presença de calcificações, sendo esta necrose delimitada por um grupo de células inflamatórias mononucleares com predomínio de macrófagos que estão em um acúmulo concêntrico (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....58
- Figura 2b- Amostra negativa para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....59
- Figura 3a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de calcificação: imagem basofílica, necrose de caseificação: área eosinofílica com perda das estruturas celulares e inflamação crônica: com predomínio de células mononucleares e fibrose (HE objetiva 40 X) – São Paulo – 2006.....59
- Figura 3b- Amostra positiva para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....60
- Figura 4a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de células gigantes do tipo de Langhans: os núcleos se arranjam junto a membrana citoplasmática formando um anel ou ferradura (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....60
- Figura 4b- Amostra negativa para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....61

Figura 5a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de calcificação: imagem basofílica, necrose de caseificação: área eosinofílica com perda das estruturas celulares e inflamação crônica: com predomínio de células mononucleares e fibrose (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....	61
Figura 5b- Amostra negativa para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....	62
Figura 6 – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de necrose de caseificação: área eosinofílica com perda das estruturas celulares (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....	62
Figura 7 – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de calcificação: área mais basofílica (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....	63
Figura 8 –Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de elevado número de células mononucleares com predomínio de linfócitos, núcleo amplo mostrando um processo de inflamação crônica, áreas com presença de debris celulares e substância amorfa eosinofílica caracterizando um processo de necrose de caseificação (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....	63
Figura 9 – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de calcificação: representada pela área mais basofílica e necrose de caseificação: área eosinofílica com perdas das estruturas celulares (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006.....	64
Figura 10 – Linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém com cultivos negativos para micobactérias segundo o resultado do exame histopatológico, Hematoxilina Eosina e Ziehl Neelsen - São Paulo – 2006	66
Figura 11 – Linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém com cultivos negativos para micobactérias submetidos ao cultivo de outros microrganismos aeróbios segundo o tipo de microrganismo isolado - São Paulo – 2006.....	67

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1- Linfonodos ou conjunto de linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo a denominação e o número de amostras examinadas - São Paulo – 2006.....53
- Quadro 2 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas para tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo o número de identificação, denominação, cultivo e histopatológico - São Paulo – 2006.....97

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, porém com cultivos negativos para micobactérias submetidos ao cultivo de outros microrganismos aeróbios segundo a denominação do linfonodo examinado e microrganismo isolados - São Paulo – 2006.....68
- Gráfico 2 - Linfonodos da cabeça e pescoço de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo de micobactérias: segundo tipos os de microrganismo aeróbio isolados – São Paulo – 2006.....69
- Gráfico 3 - Linfonodos da região torácica de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo de micobactérias: segundo os tipos de microrganismo aeróbio isolados – São Paulo – 2006.....70
- Gráfico 4 - Linfonodos abdominais de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo de micobactérias: segundo os tipos de microrganismo aeróbio isolados – São Paulo – 2006.....71
- Gráfico 5 - Linfonodos abdominais de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo de micobactérias: segundo os tipos de microrganismo aeróbio isolados – São Paulo – 2006.....72

LISTA DE ABREVIATURAS

HIV	“Human Immunodeficiency virus”
7H10	Meio sólido de cultivo para micobactérias
7H11	Meio sólido de cultivo para micobactérias
Map	<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>
MAI	<i>Mycobacterium avium intracellulare</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SISP	Serviço de Inspeção do Estado de São Paulo
HPC	<i>Hexadecyl Pyridinium Choride</i>
BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
<i>E. asini</i>	<i>Enterococcus asini</i>
<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus avium</i>
<i>E. canis</i>	<i>Enterococcus canis</i>
<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>Enterococcus cecorum</i>
<i>E. columbae</i>	<i>Enterococcus columbae</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Enterococcus dispar</i>
<i>E. durans</i>	<i>Enterococcus durans</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. flavescens</i>	<i>Enterococcus flavescens</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
<i>E. gilvus</i>	<i>Enterococcus gilvus</i>
<i>E. haemoperoxidus</i>	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>E. malodoratus</i>	<i>Enterococcus malodoratus</i>
<i>E. moraviensis</i>	<i>Enterococcus moraviensis</i>
<i>E. mundtii</i>	<i>Enterococcus mundtii</i>

<i>E. pallens</i>	<i>Enterococcus pallens</i>
<i>E. phoeniculicola</i>	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>
<i>E. pseudoavium</i>	<i>Enterococcus pseudoavium</i>
<i>E. raffinosus</i>	<i>Enterococcus raffinosus</i>
<i>E. raffi</i>	<i>Enterococcus ratti</i>
<i>E. saccharolyticus</i>	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>
<i>E. saccharominimus</i>	<i>Enterococcus saccharominimus</i>
<i>E. solitarius</i>	<i>Enterococcus solitarius</i>
<i>E. sulfureus</i>	<i>Enterococcus sulfureus</i>
<i>E. villorum</i>	<i>Enterococcus villorum</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
CO ₂	Gás carbônico
β	Beta
°C	Graus Celsius
NaCl	Cloreto de sódio
X	Vezez
x ²	Qui-quadrado
μm	Micrômetro
Na ₂ B ₄ O ₇ *10H ₂ O	Solução saturada de borato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO DE LITERATURA	33
3 OBJETIVOS	51
4 MATERIAL E MÉTODO	53
4.1 Natureza das amostras	53
4.2 Procedimentos microbiológicos	55
4.3 Procedimento histopatológico	56
4.4 Tratamento estatístico.....	64
5 RESULTADOS	66
5.1 Análise estatística	73
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81
 APÊNDICE	 97

1 INTRODUÇÃO

As doenças dos animais tornam-se relevantes quando determinam a diminuição da produção e oferta de bens e serviços para uma população, e comprometem a saúde humana.

O exame dos linfonodos dos animais de produção por ocasião do abate tem sido uma importante estratégia para o rastreamento e localização dos focos de algumas doenças transmissíveis.

Tradicionalmente inicia-se o combate à tuberculose bovina com estratégias de controle, que têm como objetivo a diminuição constante do número de focos, o que é feito com a certificação de propriedades livres, que envolve a realização de testes indiretos em massa e operações de saneamento quando animais positivos são encontrados. Esse procedimento demanda alto investimento já que a redução na prevalência de focos é alcançada a médio e longo prazo. A fase subsequente é a da erradicação, na qual o objetivo é a eliminação de todos os focos. Essa transição envolve a adoção de um sistema de vigilância para detecção e saneamento de focos. Uma boa alternativa para tanto, é a utilização das informações geradas nos abatedouros de animais. Nesta situação, as lesões constatadas por ocasião do abate devem ser colhidas e enviadas aos laboratórios de diagnóstico. Após a confirmação bacteriológica do foco, a propriedade de origem é rastreada e saneada com emprego sistemático de testes tuberculínicos e eutanásia dos animais reagentes.

Além do *Mycobacterium bovis* outros microrganismos e parasitas podem ser responsáveis por linfadenites em bovinos: *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Rhodococcus equi*, *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Dermatophilus congolensis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces bovis*, *Actinobacillus lignieresii*, *Enterococcus spp* e larvas de Pentastomida.

A identificação dos agentes responsáveis por lesões tuberculóides em bovinos no Brasil poderá oferecer subsídios ao sistema de vigilância epidemiológica do PNCETB (Plano Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e Brucelose), permitindo o diagnóstico diferencial e a orientação racional sobre a destinação da carcaça dos animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O exame dos linfonodos dos animais de produção por ocasião do abate tem sido uma importante estratégia para o rastreamento e localização dos focos de algumas doenças transmissíveis (BRADLEY; JERICHO, 1997). Com a implantação dos planos de controle e erradicação das doenças de importância epizootica, e incremento das perdas econômicas causadas por patologias sub-clínicas esta conduta tem sido valorizada (LADDS, 1986).

A inflamação granulomatosa foi reconhecida como entidade há mais de cem anos e até hoje continua a gerar dúvidas e controvérsias (ADAMS, 1976). Parte-se da dificuldade em definir granuloma. Inicialmente o termo foi adotado por Rudolph Virchow para designar uma massa semelhante a um tumor, nódulo ou tecido de granulação. Perez-Tamayo (1987) relata que o termo granulomatoso tem sua origem no aspecto macroscópico deste tecido de granulação observado nas feridas de cicatrização.

Adams (1976) define o granuloma como uma coleção compacta, organizada, de fagócitos mononucleares maduros, acompanhada ou não por necrose.

Warren (1976) definiu o granuloma como sendo uma reação inflamatória crônica focal, caracterizada pelo acúmulo e proliferação de leucócitos, principalmente do tipo mononuclear.

Perez-Tamayo (1987), infere ser o granuloma um padrão peculiar de inflamação crônica, caracterizado pela presença de coleções de macrófagos modificados denominados de células epitelióides, geralmente circundados por um halo de linfócitos.

Sheffield (1990) descreveu a resposta granulomatosa como uma reação imunológica especializada, caracterizada pela presença de células epitelióides, macrófagos e linfócitos.

O granuloma ou inflamação crônica granulomatosa se forma quando da presença nos tecidos animais de determinadas bactérias e parasitas tais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Schistosoma mansoni*, *Paracoccidioides brasiliensis* ou determinados materiais irritantes como talco, sílica, berílio ou zircônio (BOROS, 1978). A formação do granuloma inicia-se por afluxo de células polimorfonucleares no sítio de inoculação, que são substituídas em seguida por células mononucleares,

como macrófagos, histiócitos, células gigantes, células epitelióides, linfócitos e fibroblastos. A lesão granulomatosa se forma independentemente da imunidade sistêmica, contudo os linfócitos sensibilizados são capazes de modular o volume da lesão e a cronicidade da doença parece estar ligada à capacidade de sobrevivência do microrganismo no interior dos macrófagos do hospedeiro (ROXO, 1992).

O granuloma pode ainda ser definido como um tipo de inflamação crônica, na qual há o predomínio de células do sistema mononuclear fagocitário, podendo haver também a participação de eosinófilos nos granulomas de origem parasitária e micótica (BRITO; FRANCO, 1994).

Robbins, Kumar e Cottrán (1991) definem o granuloma como sendo um padrão especial de inflamação crônica, na qual o tipo celular predominante é o macrófago ativado, transformado em célula epitelióide e circundado por um colar de células mononucleares, principalmente de linfócitos.

As divergências quanto ao estabelecimento de um conceito de granuloma, podem ser em parte atribuídas a grande variedade de agentes ditos granulomatogênicos e de doenças no qual o granuloma é o principal substrato morfológico (PERRONE, 1996).

Os granulomas são classificados em não imunogênicos, por corpo estranho ou de baixo “turn-over” quando induzidos por fatores relativamente inertes como microesferas de plástico, bentonina, carragenina, sílica, fator corda ou parede de *Streptococcus*. Já os chamados imunogênicos, epitelióides ou de alto “turn-over” são induzidos por reações de hipersensibilidade (BRITO; FRANCO, 1994). Neste grupo estão os agentes de origem bacteriana: como a tuberculose, a hanseníase, a brucelose; agentes micóticos: como a histoplasmose e blastomicose, e por último os agentes parasitários: como a esquistossomose, além de alguns metais como o zircônio e o berílio, e irritantes artificiais como a bentoína (MARIANO, 1995). Embora de naturezas diversas, todos tem em comum o fato de serem de difícil degradação (SPECTOR; REICHLID; RYAN, 1970) e suscitarem imunidade mediada por células T.

As células que compõem o granuloma típico são os macrófagos, as células epitelióides, as células gigantes multinucleadas e os linfócitos (PERRONE, 1996).

As células gigantes são observadas em algumas lesões granulomatosas, como as tuberculosas observadas em humanos, bovinos e algumas outras espécies animais. Podem ser observados dois tipos de células gigantes: as do tipo de

Langhans, que apresentam os núcleos dispostos na periferia do citoplasma e as do tipo corpo estranho, onde os núcleos encontram-se dispersos no citoplasma celular, de modo aleatório. Estas células gigantes do tipo de Langhans podem ser originadas a partir da maturação de células do tipo corpo estranho (MARIANO, 1995).

As células epitelióides são as células características do processo inflamatório granulomatoso, observadas principalmente no centro do granuloma, formando palissadas ao redor da área de necrose. Ao microscópio óptico exibem citoplasma fracamente eosinofílico e um núcleo pálido e alongado (PERRONE, 1996).

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa de caráter crônico que ressurge nos dias de hoje como uma “emergência global”, sendo a principal causa de morte humana provocada por um único agente. A estimativa para este século, para os anos de 2000 à 2020, é de que aproximadamente um bilhão de pessoas estarão infectadas por esta doença; destas, 200 milhões ficarão doentes e 35 milhões irão morrer de tuberculose, caso o controle não seja eficiente e rígido (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Desde a década de 1990, a tuberculose é preocupante como zoonose, principalmente nos países em desenvolvimento, onde o conhecimento do problema é escasso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993). Em algumas regiões do Mundo a tuberculose é considerada reemergente pois tem sido encontradas estirpes multiresistentes aos antibióticos, com maior frequência em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV). A participação dos reservatórios silvestres e a elevada capacidade de persistência dos microrganismos no ambiente facilitam a ocorrência e a disseminação da infecção. A principal estratégia para o controle desta doença é o esforço conjunto dos sistemas de saúde pública e saúde animal, aprimoramento dos serviços de diagnóstico e desenvolvimento de vacinas (ABALOS; RETAMAL, 2004).

Nos bovinos os granulomas tuberculosos podem ser encontrados em qualquer linfonodo, mas ocorrem com maior frequência nos linfonodos bronquial, retrofaríngeo e mediastínico (CORNER, 1994). Os gânglios acometidos podem alcançar a espessura do braço de um homem. Estão espessados, apresentam edema perifocal e a sua superfície de corte exhibe caseificação radial. Nos pulmões, abscessos miliares podem disseminar-se, causando broncopneumonia supurativa (BEER, 1999). O pus tem uma coloração característica de creme a alaranjado,

variando de consistência cremosa espessa a de queijo que se esfarela. As lesões crônicas são caracteristicamente discretas, contendo material caseoso espesso, amarelo a alaranjado, quase sempre calcificado e rodeado por uma cápsula fibrosa espessa que rangem ao corte pela ocorrência dos sais de cálcio (CORNER, 1994; SANTOS, 1979).

Os microrganismos causadores da tuberculose são bactérias imóveis em forma de bacilos sem cápsula, não formadoras de esporos, fracamente gram-positivas, álcool-ácido resistentes e pertencentes à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*, que na atualidade reúne mais de 70 espécies conhecidas. As principais espécies de importância epidemiológica para o homem formam o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que inclui o *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* (patogênico apenas para a ratazana – *Microtis agrestis*), o *Mycobacterium africanum* (ainda não isolado no Brasil) e o *Mycobacterium canettii*, não patogênico para o homem (ABRAHÃO, 1998; BIER, 1961; BROSCHE et al., 2002; COLLINS; GRANGE, 1983; CORNER, 1994; GRANGE, 1996). Devido a associação com o vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) a tuberculose de origem bovina no homem que se manifesta em infecções pulmonares e genito-urinárias poderá se expandir pelo mundo todo (ACHA; SZYFRES, 2001; GRANGE, 1996). Do ponto de vista de profilaxia é importante que se classifique a espécie do agente etiológico, para que sejam adotadas as devidas medidas específicas de controle e combate (CORRÊA; CORRÊA, 1992). As micobactérias do complexo tuberculosis crescem em meios de cultura compostos por gema de ovo e amido e também em meios semi-sintéticos, que apresentam uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, elementos inorgânicos e o verde de malaquita empregado para inibir contaminantes (COLLINS; GRANGE, 1983; CORRÊA; CORRÊA, 1992; KANTOR, 1988). Dentre estes o de Löwenstein-Jensen e os a base de ágar, Middlebrook 7H10 e 7H11 tem sido os mais frequentemente empregados (ABRAHÃO, 1998).

O *Mycobacterium bovis* não se desenvolve adequadamente em meios glicerinados; por isso sua cultura e isolamento geralmente é efetuada no meio de Stonebrink que é constituído por piruvato de sódio ao invés de glicerol. Recomenda-se também a utilização de pequena concentração de CO₂ (menos que 5%), por este microrganismo ser microaerófilo (ABRAHÃO, 1998).

O diagnóstico definitivo da tuberculose baseia-se no isolamento, prova “padrão ouro”, que assume grande importância na confirmação dos focos, ponto fundamental para os sistemas de vigilância. As técnicas bacteriológicas clássicas empregadas apresentam baixa sensibilidade devido aos métodos drásticos de descontaminação do material, que além de destruir os contaminantes também podem inativar alguns bacilos, o que dificulta assim o “primo-isolamento”. Ressalte-se ainda a necessidade de uma abundância de massa bacilar e do crescimento fastidioso, que estes microrganismos apresentam, quatro à seis semanas, em meios de culturas apropriados (AMBRÓSIO, 2005; CORNER, 1994; HAAGSMA, 1995; WARDS; COLLINS; LISLE, 1995; ZANINI et al., 2001).

A racionalização de ações sanitárias destinadas ao controle da tuberculose exige a intensificação dos conhecimentos da cadeia de transmissão da doença com o detalhamento dos diferentes componentes: fontes de infecção, vias de eliminação, vias de transmissão e portas de entrada. (CÔRTEZ, 1993). Desta forma, já foi citado que o aperfeiçoamento no método microbiológico convencional para um rápido diagnóstico representa um fator importante na luta contra a tuberculose, no sentido de que identifica e elucida pelo menos três dos quatro itens relacionados com a cadeia epidemiológica (MARCONDES, 2002).

Os métodos de diagnóstico molecular representam um grande avanço na epidemiologia das doenças infecciosas, pois podem proporcionar importantes conquistas em sensibilidade, especificidade e capacidade de revelar quantidades muito pequenas de bacilos, mesmo que estejam mortos e sobretudo em curto espaço de tempo. Além disto, permitem o rastreamento das fontes de infecção pela comparação das características moleculares das estirpes isoladas. Entretanto, ainda estão restritos a um pequeno número de laboratórios especializados (ZANINI et al., 2001).

Tradicionalmente inicia-se o combate à tuberculose bovina com estratégias de controle, que têm como objetivo a diminuição constante do número de focos, o que é feito com a certificação de propriedades livres, que envolve a realização de testes indiretos em massa e operações de saneamento quando animais positivos são encontrados. Esse procedimento demanda alto investimento já que a redução na prevalência de focos é alcançada a médio e longo prazo (KANTOR; RITACCO, 1994). A fase subsequente é a da erradicação, na qual o objetivo é a eliminação de

todos os focos. Essa transição envolve a adoção de um sistema de vigilância para detecção e saneamento de focos. Uma boa alternativa para tanto, é a utilização das informações geradas nos abatedouros de animais (BROWN; HERNANDEZ-ANDA, 1997). Nesta situação, as lesões constatadas por ocasião do abate devem ser colhidas e enviadas aos laboratórios de diagnóstico. Após a confirmação bacteriológica do foco, a propriedade de origem é rastreada e saneada com emprego sistemático de testes tuberculínicos e eutanásia dos animais reagentes (ROSALES-RODRIGUEZ, 2005).

A Paratuberculose bovina, também conhecida como doença de Johne é uma enterite crônica que acomete os ruminantes, principalmente os bovinos (CHIODINI; VAN KRUIJNINGEN; MERKAL, 1984). Seu agente etiológico é o *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map), patógeno intracelular que se replica nos macrófagos da lâmina própria do intestino delgado. Os animais acometidos apresentam diarreia crônica e intermitente, emagrecimento, diminuição da produtividade e maior susceptibilidade a infecções, podendo ir à óbito (COLLIS, 1996; GONZÁLEZ et al., 2005).

Nos Estados Unidos da América o Map representa uma das mais prevalentes e custosas doenças infecciosas do gado leiteiro aonde acarreta consideráveis prejuízos econômicos e também apresenta potencial zoonótico pois é o agente etiológico da Doença de Crohn em humanos (HARRIS; LAMMERDING, 2001).

A forma mais comum da transmissão do Map é a ingestão de água ou de alimentos contaminados com fezes, mas os microrganismos eliminados pelo leite podem infectar os bezerros pela via oral (MANNING; COLLINS, 2001; SWEENEY; WHITLOCK; ROSENBERGER, 1992).

O Map atravessa a mucosa intestinal através das células M das placas de Peyer localizadas no íleo. Ocorre então a fagocitose e multiplicação dos microrganismos no interior dos macrófagos, com a formação de um granuloma no local de entrada. Posteriormente, o agente migra para os linfonodos próximos e em seguida para os mesentéricos, ducto torácico e circulação sistêmica, localizando-se principalmente na lâmina própria do intestino delgado. Há então uma reação granulomatosa difusa do intestino com consequência a síndrome de má absorção e perda de proteínas (HINES; KREEGER; HERRON, 1995).

Na Paratuberculose as lesões macroscópicas da mucosa intestinal tem aspecto difuso e granulomatoso, não há áreas de necrose, hiperemia ou fibrose

reacional. As lesões microscópicas são do tipo nodular (tuberculóide) ou difuso (lepromatoso), a lâmina própria está envolvida por macrófagos gigantes, as vilosidades estão distorcidas, enrugadas e os macrófagos repletos de bacilos (BALSEIRO et al., 2003). A quantidade de microrganismos presente nos linfonodos é mais elevada em estágios avançados da doença (CARRIGAN; SEAMAN, 1990; CLARKE, 1997; CORPA et al., 2000; PÉREZ; GARCÍA-MARÍN; BADIOLA, 1996). A histopatologia pode falhar em detectar a doença no estágio sub-clínico, pois as lesões estão mais localizadas e podem conter poucas células gigantes (AUSTRALIAN ANIMAL HEALTH COUNCIL, 2001). Os principais achados histopatológicos consistem em enterite, linfangite e linfadenite granulomatosa associados à presença de bacilos álcool-ácido resistentes em macrófagos (CHIODINI; VAN KRUIJNINGEN; MERKAL, 1984; KREEGER et al., 1991). Alterações vasculares degenerativas nas artérias e no endocárdio, referidas como arteriosclerose, também são descritas e provavelmente são ocasionadas por distúrbios metabólicos associados à infecção (BUERGELT et al., 1978).

O *Mycobacterium avium paratuberculosis* é membro da família *Mycobacteriaceae*, pertencente ao Complexo *Mycobacterium avium intracellulare* (MAI), constituído por: *Mycobacterium avium avium*, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Mycobacterium avium silvaticum* e *Mycobacterium intracellulare*. É um patógeno intracelular, recoberto por uma complexa parede lipídica (HARRIS; BARLETTA, 2001), seu crescimento é mais fastidioso que o das outras micobactérias, sendo necessário de oito à dez semanas de incubação e exigindo presença de micobactina no meio de cultura empregado. O meio mais utilizado é o meio de Herrold's Egg Yolk-HEYM (COLLINS, 1996).

No Brasil ainda não há dados epidemiológicos amplos sobre a Paratuberculose nem sobre o seu impacto na economia leiteira (FERREIRA et al., 2005).

A infecção pelo *Rhodococcus equi* anteriormente referido como *Corynebacterium equi* apresenta baixa patogenicidade para os bovinos, mas eventualmente causa granulomas nos linfonodos (FLYNN et al., 2001), e também pode ser detectada na inspeção pós-morte (COSTELLO et al., 1998; MCKENZIE; DONALD, 1979). É muito observada nos linfonodos traqueobrônquico e mediastínico, mas também pode acometer os linfonodos retrofaringeo, mandibular e mesentérico. As lesões tendem a ser encapsuladas com aspecto tuberculóide. As

lesões microscópicas tem aspecto de granulomas caseosos e podem ser classificadas em quatro zonas: centro de necrose com infiltrado de neutrófilos e mineralização, zonas de macrófagos com freqüente formação de células gigantes, células mononucleares e uma zona periférica de tecido fibrosado. Pela coloração de hematoxilina-eosina as linfadenites por *Rhodococcus equi* nem sempre podem ser diferenciadas das lesões de tuberculose (LADDS, 1986). Muitas vezes apresentam-se como infiltrados de neutrófilos com áreas centrais caseosas e a presença do agente etiológico é confirmada pela coloração de Brown e Brenn. A similaridade da resposta celular na tuberculose e linfadenites por *Rhodococcus equi* decorre da composição da parede celular e das estruturas antigênicas do agente causal (JUBB; KENNEDY, 1970; MCKENZIE; DONALD, 1979; WOOLCOCK; RUDDUCK, 1973).

As lesões provocadas pelo *Rhodococcus equi* são similares as causadas pelo *Mycobacterium bovis* pois nos dois casos é observada área central com necrose caseosa e mineralização. A característica principal de diferenciação no caso do *Rhodococcus equi* é o infiltrado de neutrófilos com áreas necróticas (MCKENZIE; DONALD, 1979).

O *Rhodococcus equi* é um cocobacilo, pleomórfico, Gram positivo, aeróbio, parcialmente ácido resistente, não formador de esporos, imóvel, amplamente distribuído na natureza, solo e nas fezes de herbívoros e animais selvagens (PRESCOTT, 1991; PRESCOTT; TRAVERS; YAGER-JOHNSON, 1984). É um patógeno intracelular o que explica a lesão típica de piogranuloma (TAKAI; SASAKI; TSUBAKI, 1995).

Nos bovinos, as lesões granulomatosas causadas por infecções de organismos filamentosos do grupo Nocardia-Streptomyces tem sido freqüentemente observadas nos linfonodos pulmonares e menos freqüentemente nos mesentéricos e vísceras como pulmão e fígado. Lesões recentes em linfonodos e vísceras apresentam-se como nódulos acinzentados tendendo para o branco, mas em estágios avançados são amareladas, caseosas e possuem um variável grau de mineralização e fibrose. As lesões podem apresentar de um à dez centímetros de diâmetro (LADDS, 1986). Apesar de ser uma doença infecciosa, ela não é contagiosa sendo resultado de contaminação das feridas pelo solo ou o uso de equipamentos mau higienizados (MONLUX WILLIAM; MONLUX ANDREW, 1972).

As lesões microscópicas em linfonodos de bovinos infectados por microrganismos do grupo Nocardia-Streptomyces são de difícil confirmação quanto

a presença de filamentos, sendo necessária a pesquisa cuidadosa das áreas granulomatosas contíguas a zona de necrose (LADDS, 1986).

As *Nocardias* estão presentes no solo e desempenham papel ativo na decomposição da matéria orgânica. São aeróbias, Gram positivas, parcialmente ácido-resistentes, formam largos filamentos ramificados que se fragmentam em formas cocóides e bacilares. A *Nocardia asteroides* é mais rara e a *Nocardia caviae* é a responsável por mastite bovina, também podem ser observadas quadros pulmonares, abortamentos, linfadenites e lesões em diferentes órgãos (CORTI; FIOTI, 2003; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

As Actinomicoses e Actinobaciloses são as mais freqüentes causas de linfadenites em bovinos, caracterizam-se pela presença de “granulomas de enxofre” com tamanho uniforme e coloração amarela, mas é necessário enfatizar que lesões semelhantes também podem ser provocadas por *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus aureus* (botromicose), *Dermatophilus congolensis*, *Corynebacterium pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (LADDS, 1986). Na actinobacilose os granulomas e drusas encontram-se predominantemente nos tecidos moles na pele, hipoderme e órgãos internos e usualmente estão rodeados de proliferações conjuntivas (BEER, 1988).

O *Actinomyces bovis* é o principal agente da actinomicose nos bovinos e ocasionalmente em outras espécies animais. A freqüência desta doença está ligada as práticas de manejo do gado. Na maioria das espécies animais apresenta-se em forma de casos esporádicos. É um habitante da boca dos bovinos (ACHA; SZYFRES, 2001).

Nos bovinos a porta de entrada dos processos patológicos provocados pelo *Actinomyces bovis* são ferimentos da mucosa bucal ou dos alvéolos dentários provocados por fragmentos pontiagudos presentes nos alimentos (RADOSTITS; GAY; HINCHCLIFF, 2002).

No bovino o *Actinomyces bovis* pode se localizar em todo o maxilar, provocando a formação de um tecido granulomatoso com um a dois milímetros de diâmetro, facilmente distinguíveis dos abscessos formados por uma simples bactéria piogênica. Estas áreas necróticas transformam-se em abscessos que fistulam e eliminam um pus de aspecto viscoso, inodoro de coloração amarelada. Este pus contém grânulos amarelo-claro, denominados “grânulos de enxofre” que

ao microscópio aparecem como rosetas. Em qualquer local acometido a lesão é tipicamente granulomatosa (ACHA; SZYFRES, 2001).

A doença provocada pelo *Actinomyces bovis* só é reconhecida quando começam a aparecer alterações morfológicas. O osso maxilar torna-se espessado, o que prejudica a mastigação. Os gânglios linfáticos submaxilares apresentam-se endurecidos e aumentados de volume. Na actinomicose dos lábios, pode-se notar a presença de nódulos ovóides ou arredondados, localizados na submucosa de um ou dos dois lábios. A língua está aumentada de volume e as vezes projetada para fora da boca, apresentando na sua face superior ulcerações cobertas por líquido fétido. No epitélio das faces superior e laterais da língua são observadas numerosas formações nodulares de coloração avermelhada e grande quantidade de pequenas elevações arredondadas. A base do processo inflamatório é o granuloma actinomicótico que contém em sua porção central, drusas redondas, ovaladas e polimorfas de 20 micrômetro à um milímetro, coradas de azul pela técnica hematoxina-eosina, exibindo em sua porção periférica, uma coroa radial de massas eosinofílicas. As drusas são encontradas no centro de acumulações microssupurativas de leucócitos, neutrófilos polimorfonucleares, que estão rodeados por uma longa camada de células constituídas por macrófagos epitelióides que contêm células gigantes de Langhans, assim como outras células inflamatórias. Um denso tecido inflamatório que contém abundantes filamentos constitui por um lado, a terminação do granuloma e por outro, reúne vários nódulos isolados para formação de complexos maiores (BEER, 1988). Em corte são visualizados na intimidade dos tecidos nódulos contendo pus amarelado, elástico que constituem o aspecto lesional típico da actinogranulomatose (GIL, 2000). Na glândula mamária, podem aparecer nódulos pequenos situados debaixo da pele. Em outros órgãos pode ser observado um tumor duro que ao ser seccionado, revela a presença de nódulos actinomicóticos do tamanho de um grão de feijão. As lesões ainda podem ser encontradas na pele, pulmão, pleura, fossas nasais e gânglios linfáticos (HIPÓLITO; FREITAS; FIGUEIREDO, 1965).

O *Actinomyces bovis* é aeróbio facultativo que cresce em meios de cultivo adicionados de fluídos orgânicos. O meio indicado é o de Loeffler em anaerobiose. Em meio de ágar sangue as colônias são pequenas e hemolíticas (HIPÓLITO; FREITAS; FIGUEIREDO, 1965). Em preparações de grânulos repletos de pus, corados pelos métodos de Gram e Kinyoun constata-se a presença de filamentos

Gram positivos, não ácido resistentes ou formas pleomórficas, ocasionalmente ramificadas do tamanho de um bacilo (COTTRAL, 1978).

O primeiro relato do gênero *Actinobacillus*, família *Brucellaceae* foi efetuado na Argentina por Lignières e Spitz (1902), em abscessos subcutâneos múltiplos na cabeça e pescoço de bovinos. Estas lesões crônicas eram similares as denominadas de actinomicoses, pois nas duas infecções são observados pequenos grânulos de pus. Entretanto, na maioria dos casos o agente infeccioso foi distinto do *Actinomyces bovis* e a doença caracterizada por lesões com pequenos cocos Gram negativos foi nomeada de Actinobacilose. Há seis membros deste gênero que possuem importância significativa como causa de doenças nos animais: *Actinobacillus lignieresii*, *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus capsulatus*, *Actinobacillus equuli*, *Actinobacillus seminis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2004; RYCROFT; GARSIDE, 2000).

Os *Actinobacillus spp* são cocos Gram negativos, pleomórficos, imóveis, que crescem em ágar MacConkey, produzem galactosidase, são aeróbios e fermentam carboidratos sem produzir gás (RYCROFT; GARSIDE, 2000).

No pus da lesão o *Actinobacillus lignieresii* apresenta-se sob a forma de bastonetes encerrados no interior de pequenos grânulos, bem menores que os “grânulos de enxofre” encontrados na actinomicose (LADDS, 1986).

Em bovinos a infecção pelo *Actinobacillus lignieresii* ocorre frequentemente na língua ou no sulco da língua (RYCROFT; GARSIDE, 2000). No Canadá a inspeção em abatedouros revelou que as infecções sub-clínicas são comuns, com a presença de granulomas nos linfonodos da cabeça e na língua em aproximadamente 3% dos bovinos abatidos (BRADLEY; JERICHO, 1997).

A actinobacilose tem predisposição por acometer as estruturas tissulares moles e é uma doença de evolução crônica. A infecção natural é produzida através de mucosas feridas. O aparecimento da doença é facilitado pela ingestão de plantas espinhosas, bem como por doenças carenciais e outros fatores predisponentes (BEER, 1988). No maxilar e pescoço aparecem tumefações duras e lobuladas, que se desenvolvem lentamente e tendem a crescer. Posteriormente, surgem áreas mais amolecidas que flutuam à pressão dos dedos, podendo ulcerar e sair um pus de aspecto mucóide, caseoso e sem mau cheiro. As lesões também podem se localizar na língua, gânglios linfáticos da cabeça, paredes do estômago e outros órgãos. A língua quando lesada adquire grande consistência à palpação, e é

conhecida como “língua-de-pau”. É comum haver linfadenite, que independe das lesões na língua. Pode haver um aumento visível e palpável dos linfonodos submaxilares e parotídeos. Os granulomas também podem ser encontrados em locais atípicos e visíveis como narinas externas, pele e inclusive nas pálpebras (HIPÓLITO; FREITAS; FIGUEIREDO, 1965; REBHUN; KING; HILLMAN, 1988).

Nas lesões macroscópicas da actinobacilose podem ocorrer áreas supurativas com inflamação aguda circundadas por uma zona de tecido proliferativo. No centro do abscesso há uma massa espessa, consistente e presença de pus com pequenos grânulos amarelo-acinzentados “grânulos de enxofre” com um milímetro de diâmetro (MONLUX WILLIAM; MONLUX ANDREW, 1972).

O exame microscópico das lesões pelo *Actinobacillus lignieresii* revela a presença de granulomas constituídos por células epitelióides e algumas células gigantes. No centro desta lesão, há o desenvolvimento de focos purulentos circunscritos por uma espessa parede fibrosa (REBHUN; KING; HILLMAN, 1988; RYCROFT; GARSIDE, 2000).

Na família *Micrococcaceae* constituída pelos gêneros *Micrococcus*, *Stomacoccus* e *Planococcus* e *Staphylococcus* apenas o último pode causar infecções em humanos e animais. Das 20 espécies de *Staphylococcus* descritas, cinco são de importância veterinária: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subespécie *coagulans* (BEER, 1988; CARTER; CHENGAPPA, 1991).

Os Estafilococos estão entre os patógenos mais comumente encontrados na prática clínica, podem estar presentes no trato respiratório superior e em outras superfícies epiteliais de todos os animais de sangue quente (mamíferos e aves). São bactérias imóveis, Gram positivas, não fastidiosas, de aproximadamente um micrômetro de diâmetro que tendem a se agrupar em arranjos na forma de cachos de uva e sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C. A maioria das espécies são anaeróbias facultativas, oxidase negativa, catalase positiva, imóveis e não formadoras de esporos (QUINN, 2005).

As infecções causadas pelos Estafilococos podem ter origem endógena ou exógena. Muitas delas são oportunistas, associadas a traumas, imunossupressão, infecção parasitária ou fúngica, distúrbios endócrinos, metabólicos ou condições alérgicas (QUINN, 2005).

Algumas doenças estafilocócicas de importância em animais domésticos são: mastite, epidermite exsudativa, botromicose e pioderma (QUINN, 2005).

Além das infecções piogênicas, os *Staphylococcus aureus* podem ser responsáveis por infecções nosocomiais, intoxicações alimentares, osteomielites, pioartrites, endocardites, síndrome do choque tóxico e um amplo espectro de outras desordens (HAJJEH et al., 1999; MARTINS, 1999; RUBIN et al., 1999; TODD, 1998; ÜGUR; CEYLAN, 2003; WILLETT et al., 1992). Estes microrganismos são bactérias comensais da pele e membranas mucosas, presentes nos tratos respiratório superior e digestivo de seres humanos e animais. São Gram positivos, imóveis, aeróbios, coagulase positiva e não ácido-resistentes (CARTER; CHENGAPPA, 1986).

Embora todos os animais de sangue quente possam ser acometidos clinicamente por estafilococos coagulase-positivo, a prevalência e a forma dessas interações varia com a espécie de hospedeiro. Os *Staphylococcus aureus* concorrem com *Streptococcus agalactiae* como causa principal da mastite bovina. A infecção instala-se pelo canal do teto, e seu curso varia de subclínico a supurativo agudo, gangrenoso ou crônico, dependendo da estirpe, da dose infectante e da resistência do hospedeiro. Às vezes, mastites bovinas são causadas por estafilococos coagulase-negativos, notadamente *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus sciuri*.

A Botromicose é a denominação das lesões granulomatosas crônicas provocadas pelo *Staphylococcus aureus* no úbere de éguas, vacas, porcas e cordão espermático de cavalos, pós castração. Usualmente estas lesões são supurativas e septicêmicas (BEER, 1988; CARTER; CHENGAPPA, 1991).

A infecção pelo *Staphylococcus aureus* costuma provocar uma resposta inflamatória caracterizada pela mobilização de neutrófilos ao sítio de infecção, com a formação de abscessos que ao se romperem eliminam o pus para o exterior (CARTER; CHENGAPPA, 1991).

O *Staphylococcus aureus* é caracterizado por apresentar resistência a novobiocina e por produzir: coagulase, termonuclease, acetona, beta galactosidase, fosfatos, alfa toxina (hemolisina), ácidos do manitol, maltose, xilose, sucrose e trealose, proteína A e fator de aglutinação na parede celular (APHA, 2001).

A maioria das infecções estafilocócicas é provocada por estirpes coagulase positivas, mas algumas coagulase negativas de baixa virulência também são

capazes de causar doenças em animais, tais como o *Staphylococcus epidermidis*, que parece ser a espécie estafilocócica, coagulase negativa, com o mais elevado potencial de patogenicidade (MARTINS, 1999; QUINN, 2005).

O *Staphylococcus epidermidis* é o maior causador de infecção nosocomial associada a contaminação de instrumentos cirúrgicos (CHRISTENSEN; BALDASSARRI; SIMPSON, 1994; KLOOS; BANNERMAN, 1994) e também tem sido frequentemente isolado de mastites subclínicas (WATTS; OWENS, 1989). Ao contrário de outras espécies de estafilococos, coagulase negativa, envolvidos nos casos de mastite, o *Staphylococcus epidermidis* não é frequentemente encontrado na microbiota normal da pele ou das membranas mucosas de bovinos (DEVRIESE; KEYSER, 1980). Entretanto é a espécie mais encontrada na pele de humanos (KLOOS, 1980). Thorberg et al. (2006) comprovaram que as infecções de úberes dos bovinos podem ser originadas de humanos (WATTS; OWENS, 1989).

As larvas e ninfas da classe Pentastomida causam inflamações nos tecidos que podem se confundir com a tuberculose. As lesões são encontradas em linfonodos mesentéricos e menos freqüentemente no fígado, pulmão e coração. As lesões macroscópicas causadas por estes parasitas apresentam-se, inicialmente como uma reação inflamatória aguda que evolui para crônica seguindo a rota de migração das larvas e ninfas. Os linfonodos acometidos apresentam-se hipertrofiados, com coloração cinza esverdeada bem como focos de necrose caseosa calcificados e infiltrados por tecido conjuntivo (MONLUX WILLIAM; MONLUX ANDREW, 1972).

A primeira resposta celular decorrente da presença das larvas e ninfas de Pentastomídeos nos tecidos animais é a infiltração de neutrófilos e eosinófilos, seguida do acúmulo de macrófagos, linfócitos, células plasmáticas e pouca células gigantes. Com o progresso do processo inflamatório, macrófagos e eosinófilos tornam-se predominantes, os exsudatos possuem leucócitos e podem se tornar caseosos e calcificados. Na área acometida há infiltração por tecido conjuntivo (MONLUX WILLIAM; MONLUX ANDREW, 1972).

As bactérias do gênero *Enterococcus* ou *Enterococci* (antigamente conhecidas pela nomenclatura “faecal” ou Lancefield *Streptococcus* do grupo D) pertencem ao grupo de microorganismos conhecidos como bactérias de ácido láctico (BAL) (DEVRIESE; POT, 1995). Os Enterococos são ubiqüitários, mas habitam predominantemente o trato digestivo de humanos e animais (GIRAFFA;

CARMINATI; NEVIANI, 1997; LINDEN; MILLER, 1999). São cocos Gram positivos, não esporulados, catalase negativa, oxidase negativa, anaeróbios facultativos que podem se apresentar um a um, em pares ou em cadeias. A classificação taxonômica, do gênero *Enterococcus* tem sido revista (DEVRIESE; POT; COLLINS, 1993; DEVRIESE; POT, 1995; HARDIE; WHILEY, 1997; SCHLEIFER; KILPPER-BÄL, 1984; STACKEBRANDT; TEUBER, 1988). Em 1984, a hibridização DNA-DNA e o sequenciamento 16S RNAr indicaram que as espécies de *Streptococcus faecium* e *Streptococcus faecalis* são suficientemente distintas de outros *Streptococcus* diferindo em características morfológicas, antigênicas e fisiológicas. Schleifer e Kilpper-bäl (1984) propuseram transferir as espécies *Streptococcus faecium* e *Streptococcus faecalis* para o gênero *Enterococcus*. Há 28 espécies classificadas como: *E. asini*, *E. avium*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus* e *E. villorum*, que foram adicionadas a este gênero com base na estrita evidência filogenética (DESCHEEMAER et al., 1997; DEVRIESE; POT, 1995; MORENO et al., 2006).

Os Enterococos não estão apenas associados aos animais de sangue quente, mas podem ser encontrados em qualquer parte da natureza como no solo, água, animais, aves, plantas, vegetais e insetos (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997; MUNDIT, 1986).

A importância dos enterococos para saúde pública e em alimentos está direcionada por ser um habitante regular do intestino, sendo um indicador de contaminação fecal e por estar envolvido em doenças transmitidas por alimentos (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999). Ecologicamente, os Enterococos são tipicamente bactérias produtoras de ácido lático e autóctones da microbiota intestinal do homem e dos animais de produção (FRANZ et al., 2003; KLEIN, 2003; MUNDIT, 1986). Conseqüentemente também participam da fermentação dos alimentos (KLEIN, 2003). Há algumas especificidades quanto ao hospedeiro, em humanos as espécies mais freqüentes são os *E. faecalis* e *E. faecium*, enquanto nas aves domésticas e suínos o *E. faecium* é o predominante (MUNDIT, 1986).

Os Enterococos podem ter acesso aos alimentos de origem animal in natura (carne e leite) por contaminação fecal ou ambiental (DACK, 1956; STILES, 1989).

Destaca-se ainda a possibilidade de sobrevivência e multiplicação, até mesmo em alimentos fermentados (GIRAFFA, 2002; GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997). São tolerantes a altas temperaturas e resistem aos procedimentos usuais de pasteurização do leite e derivados (FRANZ; SCHILLINGER; HOLZAPFEL, 1996; GORDON; AMAND, 1991; HOUBEN, 1982; OLASUPO et al., 1994). O acesso aos alimentos também pode ocorrer por contaminação cruzada nos estágios finais do processamento de fatiamento e embalagem (HUGAS; GARRIGA; AYMERICH, 2003). Sobrevivem em condições ambientais adversas, colonizam diversos nichos e podem servir como indicadores da qualidade sanitária dos alimentos (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999; GIRAFFA, 2002; MUNDIT, 1986).

No processamento de carnes (MAGNUS; MCCURDY; INGLEDEW, 1988; SANZ PEREZ et al., 1982), os enterococos são geralmente indesejáveis, pois por serem termotolerantes acabam deteriorando os alimentos. A resistência ao calor pode ser influenciada por ingredientes acrescentados aos alimentos tais como: sal e nitrito. Destaque-se contudo que na indústria láctea, os enterococos tem sido empregados como starters para a fabricação de muitos tipos de queijos (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997).

O uso indiscriminado de drogas promotoras de crescimento em alimentos fornecidos aos animais tem causado um aumento na resistência de enterococos aos antibióticos que parece estar contribuindo para a sua disseminação na população humana (BATES, 1997; BATES; JORDENS; GRIFFITHS, 1994; GIRAFFA, 2002; VAN DEN BOGAARD; JENSEN; STOBBERINGH, 1997).

Os animais domésticos como aves e bovinos excretam enterococos quando são muito novos (DEVERIESE et al, 1992). Nas fezes de suínos, aves, carneiros e bovinos a presença do *Enterococcus faecalis* é rara (DEVERIESE et al., 1992; KJELLANDER, 1960; POURCHERET et al., 1991).

Durante o procedimento do abate dos animais a presença de enterococos no trato gastrointestinal dos mesmos pode propiciar a contaminação da carne (KNUDTSON; HARTMAN, 1993).

A temperatura ótima para o crescimento dos enterococos é de 35°C, mas a maioria das espécies pode crescer entre 10-45°C. O crescimento em caldo tripticase soja contendo 6,5% de NaCl e a hidrólise da esculina em presença de sais biliares possibilita a diferenciação com os Streptococos. Algumas espécies são móveis. A expressão de um fenótipo hemolítico é altamente variável entre as

diferentes espécies de enterococos assim como entre estirpes de uma mesma espécie. Por exemplo, algumas estirpes de *Enterococcus faecalis* são β hemolíticas em meios enriquecidos com sangue de coelho ou cavalo, sendo não hemolíticas em meios com sangue de carneiro (HARDIE; WHILEY, 1997; MORRISON; WOODFORD; COOKSON, 1997).

A principal mudança patológica de uma infecção causada pelos enterococos é a presença de uma inflamação aguda. Contudo o mecanismo pelo qual este microrganismo induz a resposta inflamatória ainda não se encontra totalmente compreendido (JOHNSON, 1994).

3 OBJETIVOS

Tendo em vista a variedade de microrganismos e parasitas capazes de ocasionar linfadenites em bovinos, cujo aspecto macroscópico pode confundir-se com as lesões da tuberculose pelo *Mycobacterium bovis* foi delineado o presente trabalho que tem por objetivos:

1. Isolar e tipificar microrganismos aeróbios presentes em linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose e negativas para o cultivo de *Mycobacterium bovis*.
2. Verificar a existência de correlação entre as bactérias isoladas e a localização dos respectivos linfonodos.
3. Verificar a existência de correlação entre o aspecto histológico dos linfonodos e o tipo de microrganismo isolado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A relação dos materiais examinados, os procedimentos microbiológicos, histopatológicos e tratamento estatístico dos resultados são relacionados a seguir.

4.1 Natureza das amostras

Foram utilizados fragmentos de linfonodos com lesões granulomatosas de 148 carcaças de bovinos condenadas por suspeita de tuberculose durante a rotina de inspeção sanitária, em abatedouros submetidos ao Serviço de Inspeção Federal (SIF) ou Serviço de Inspeção do Estado de São Paulo (SISP) no período de Maio/2002 à Janeiro/2004. Após a colheita os fragmentos de linfonodos foram armazenados em frascos contendo solução saturada de borato de sódio sem refrigeração. Entre a colheita e o processamento não foi excedido o prazo de dois meses.

No quadro 1 - São reunidos os resultados dos cultivos segundo a denominação dos linfonodos examinados que permitiram a identificação individual. As amostras constituídas pela mistura de mais de um linfonodo foram referidas como conjuntos.

(continuação)	
LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	NÚMERO DE AMOSTRAS EXAMINADAS
apical	3
apical, esofágico, mediastínico, pré-escapular, pré-peitoral, retrofaringeo, traqueo-brônquico	1
apical, mesentérico, pré-crural, poplíteo, pré-peitoral	1
atloidiário, sub-ilíaco, pré-peitoral, traqueo-brônquico	1
esofágico	2
esofágico, mediastínico, mesentérico, parotídeo	1

Quadro 1- Linfonodo ou conjunto de linfonodos de bovinos com lesões sugestivas para tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo a denominação e o número de amostras examinadas - São Paulo – 2006

No quadro 1 - São reunidos os resultados dos cultivos segundo a denominação dos linfonodos examinados que permitiram a identificação individual. As amostras constituídas pela mistura de mais de um linfonodo foram referidas como conjuntos.

(continuação)	
LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	NÚMERO DE AMOSTRAS EXAMINADAS
esofágico, mesentérico, traqueo-brônquico	1
esofágico, retrofaringeo	1
hilo-hepático	6
hilo-hepático, mesentérico	2
hilo-hepático, mesentérico, traqueo-brônquico	1
hilo-hepático, pré-escapular, pré-peitoral	1
hilo-hepático, pré-peitoral	1
hilo-hepático, retrofaringeo, traqueo-brônquico	1
isquiático	1
mediastínico	24
mediastínico, hilo-hepático	1
mediastínico, hilo-hepático, pré-peitoral, retrofaringeo, sub-lingual	1
mediastínico, hilo-hepático, traqueo-brônquico	1
mediastínico, mesentérico, retro-mamário, sub-lingual, traqueo-brônquico	1
mediastínico, pré-peitoral	1
mediastínico, retrofaringeo	7
mediastínico, sub-ilíaco	1
mediastínico, traqueo-brônquico, apical, hilo-hepático	1
mesentérico	7
mesentérico, hilo-hepático	1
mesentérico, mediastínico, pré-crural	1
mesentérico, retro mamário	1
parotideo	3
parotideo, sub-lingual	1
pré-escapular	5
pré-peitoral	5
retrofaringeo, mesentérico, sub-ilíaco	1
retrofaringeo, pré-escapular	1
retrofaringeo, mandibular	1
retrofaringeo	35
retrofaringeo, mandibular	1
retro-mamário	6
sub-ilíaco, pré-crural	1

Quadro 1- Linfonodo ou conjunto de linfonodos de bovinos com lesões sugestivas para tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo a denominação e o número de amostras examinadas - São Paulo – 2006

No quadro 1 - São reunidos os resultados dos cultivos segundo a denominação dos linfonodos examinados que permitiram a identificação individual. As amostras constituídas pela mistura de mais de um linfonodo foram referidas como conjuntos.

(conclusão)	
LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	NÚMERO DE AMOSTRAS EXAMINADAS
sub-lingual	5
traqueo-brônquico	9
traqueo-brônquico, mesentérico, retro mamário, sub-lingual	1
traqueo-brônquico, sub-lingual	1
TOTAL	148

Quadro 1- Linfonodo ou conjunto de linfonodos de bovinos com lesões sugestivas para tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo a denominação e o número de amostras examinadas - São Paulo – 2006

As amostras utilizadas no presente estudo foram inicialmente (AMBRÓSIO, 2005; ROSALES-RODRIGUES, 2005) submetidas ao cultivo para micobactérias adotando-se o procedimento de descontaminação de Petroff (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972). As que apresentaram resultados negativos para micobactérias foram reexaminadas com o emprego do método de descontaminação de HPC (Hexadecyl Pyridinium Choride) (CORNER; TRAJSTAMAN, 1988).

Após a realização dos cultivos para isolamento de micobactérias, as porções remanescentes das amostras foram acondicionadas em sacos estéreis Stomacker® e congeladas a – 20°C.

4.2 Procedimentos microbiológicos

As amostras foram descongeladas e descontaminadas por três procedimentos sucessivos de imersão em álcool absoluto e flambagem em bico de

bünsen. A seguir em equipamento de Fluxo Laminar, foram maceradas (gral e pistilo estéreis), homogeneizadas com cinco ml do caldo infusão cérebro-coração (caldo BHI) e semeadas em placas de Petri contendo os meios de Ágar Sangue¹ (ágar base acrescido de 7% de sangue de carneiro), Ágar MacConkey² e Ágar Saboraud³. As leituras foram efetuadas as 24, 48 e 72 horas de cultivo.

Após 24 horas de incubação em aerobiose à 37°C no caldo infusão cérebro-coração (caldo BHI), as amostras foram semeadas, em placas de Petri contendo os meios de Ágar Sangue e Ágar MacConkey e incubadas à 37°C em aerobiose com leituras as 24, 48 e 72 horas de cultivo. As colônias observadas foram analisadas quanto as características fenotípicas: tamanho, forma, pigmento, catalase e produção de hemólise (LENNETTE, 1985) . As lâminas, coradas pelo método de Gram, foram examinadas com objetiva de imersão, no aumento de 100 X.

As placas de Ágar Saboraud destinadas ao cultivo de fungos permaneceram em temperatura ambiente e foram submetidas a leituras diárias durante três semanas.

Os microrganismos isolados foram identificados por suas características bioquímicas: para cocos gram positivos e catalase negativa: BHI + 6,5% NaCl, lactose, maltose, sorbitol, sacarose, trealose, gelatina, Meio de Edward's e Camp test. Para cocos gram positivos e catalase positiva: uréia, lactose, maltose, trealose, sacarose, manitol e coagulase (KRIEG; HOLT, 1994; MURRAY et al., 1999).

4.3 Procedimento histopatológico

Uma alíquota da amostra congelada foi transferida para frascos com solução de formol a 10%, permanecendo em temperatura de refrigeração (4 à 8°C) durante 24 horas. A seguir foi conservada em temperatura ambiente até serem submetidos as técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Foram utilizadas as técnicas de coloração: Hematoxilina-Eosina e Ziehl-Neelsen.

1. Blood Agar base- Oxoid- Hampshire- U.K; 2. Mac Conkey agar- Oxoid- Hampshire- U.K; 3. Saboraud dextrose agar- Oxoid- Hampshire- U.K

Foram considerados positivos para micobactérias as amostras cujos resultados apresentaram: calcificação, necrose, células gigantes, inflamação crônica e coloração Ziehl Neelsen positiva; como fortemente sugestivas para micobactérias: calcificação, necrose, células gigantes, inflamação crônica e coloração Ziehl Neelsen negativa ou necrose, inflamação crônica, calcificação e coloração Ziehl Neelsen positiva ou células gigantes e coloração de Ziehl Neelsen negativa; como sugestivas para micobactérias: calcificação, necrose, inflamação crônica e coloração Ziehl Neelsen negativas. Foram considerados negativos para micobactérias: necrose ou calcificação ou inflamação crônica ou necrose e calcificação.

Na figura 1a são apresentadas as amostras positivas para micobactérias no exame histopatológico que apresentaram: calcificação, necrose de caseificação, células gigantes do tipo de Langhans, inflamação crônica principalmente de macrófagos e menor quantidade de linfócitos jovens (constituição de um granuloma) e coloração Ziehl Neelsen positiva (figura 1b).

Figura 1a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de granuloma: estrutura circular constituída pela área de necrose de caseificação, ao centro presença de calcificações, sendo esta necrose delimitada por um grupo de células inflamatórias mononucleares com predomínio de macrófagos que estão em um acúmulo concêntrico (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Figura 1b- Amostra positiva para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Na figura 2a são apresentadas as amostras fortemente sugestivas para micobactérias no exame histopatológico que apresentaram: calcificação, necrose de caseificação, células gigantes do tipo de Langhans, inflamação crônica principalmente de macrófagos e menor quantidade de linfócitos jovens (constituição de um granuloma) e coloração Ziehl Neelsen negativa (figura 2b).

Figura 2a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de granuloma: estrutura circular constituída pela área de necrose de caseificação, ao centro presença de calcificações, sendo esta necrose delimitada por um grupo de células inflamatórias mononucleares com predomínio de macrófagos que estão em um acúmulo concêntrico (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Figura 2b- Amostra negativa para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Na figura 3a são apresentadas as amostras fortemente sugestivas para micobactérias no exame histopatológico que apresentaram: calcificação, necrose de caseificação e inflamação crônica principalmente de macrófagos e menor quantidade de linfócitos jovens e coloração Ziehl Neelsen positiva (figura 3b).

Figura 3a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de calcificação: imagem basofílica, necrose de caseificação: área eosinofílica com perda das estruturas celulares e inflamação crônica: com predomínio de células mononucleares e fibrose (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Figura 3b- Amostra positiva para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Na figura 4a são apresentadas as amostras fortemente sugestivas para micobactérias no exame histopatológico que apresentaram: células gigantes do tipo de Langhans e coloração Ziehl Neelsen negativa (figura 4b).

Figura 4a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de células gigantes do tipo de Langhans: os núcleos se arranjam junto a membrana citoplasmática formando um anel ou ferradura (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Figura 4b- Amostra negativa para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Na figura 5a são apresentadas as amostras sugestivas para micobactérias no exame histopatológico que apresentaram: calcificação, necrose de caseificação e inflamação crônica principalmente de macrófagos e menor quantidade de linfócitos jovens e coloração Ziehl Neelsen negativa (figura 5b).

Figura 5a – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de calcificação: imagem basofílica, necrose de caseificação: área eosinofílica com perda das estruturas celulares e inflamação crônica: com predomínio de células mononucleares e fibrose (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Figura 5b- Amostra negativa para presença de bacilo álcool ácido resistente (ZN objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Na figura 6 são apresentadas as amostras negativas para micobactérias no exame histopatológico que apresentaram: necrose de caseificação.

Figura 6 – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de necrose de caseificação: área eosinofílica com perda das estruturas celulares (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Na figura 7 são apresentadas as amostras negativas para micobactérias no exame histopatológico que apresentaram: calcificação.

Figura 7 – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de calcificação: área mais basofílica (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Na figura 8 são apresentadas as amostras negativas para micobactérias no exame histopatológico que apresentaram: inflamação crônica.

Figura 8 –Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de elevado número de células mononucleares com predomínio de linfócitos, núcleo amplo mostrando um processo de inflamação crônica, áreas com presença de debris celulares e substância amorfa eosinofílica caracterizando um processo de necrose de caseificação (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

Na figura 9 são apresentadas as amostras negativas para micobactérias no exame histopatológico que apresentaram: necrose de caseificação e calcificação.

Figura 9 – Fotomicrografia de linfonodo de bovino com presença de calcificação: representada pela área mais basofílica e necrose de caseificação: área eosinofílica com perdas das estruturas celulares (HE objetiva 40 X) – São Paulo - 2006

4.4 Tratamento estatístico

A análise dos resultados empregou o teste de Qui-quadrado, populações independentes, para analisar a hipótese de associação entre tipo de microrganismo isolado e as respectivas localizações. O teste do Qui-quadrado de MacNemar foi empregado para comparar as proporções de microrganismos isolados. O nível de significância adotado foi de 0,05 (SIEGEL, 1981).

5 RESULTADOS

O exame histopatológico foi efetuado em 146 amostras pois houve duas amostras não disponíveis.

No apêndice A, quadro 2 são apresentados os resultados individuais dos exames microbiológicos e histopatológicos das amostras trabalhadas.

Na figura 10 são apresentados os resultados dos exames histopatológicos de linfonodos de bovino, com lesões sugestivas de tuberculose, porém negativas para micobactérias segundo o tipo de lesão encontrada. Constata-se a existência de 49/146 (33,56%) negativas, 4/146 (2,73%) positivas para micobactérias sp, 18/146 (12,32%) fortemente sugestivas para micobactérias sp, 31/146 (21,23%) sugestivas de micobactérias sp e 45/146 (30,82%) atribuídas a outros processos que não micobactérias.

Figura 10 – Linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém com cultivos negativos para micobactérias segundo o resultado do exame histopatológico, Hematoxilina Eosina e Ziehl Neelsen - São Paulo – 2006

O exame microbiológico das 148 amostras de linfonodos bovinos com lesões sugestivas para tuberculose, porém negativas para micobactérias, demonstrou crescimento de outros microrganismos aeróbios.

Na figura 11 - São apresentados os resultados dos exames microbiológicos de linfonodos de bovinos, com lesões sugestivas de tuberculose, porém negativas para micobactérias segundo o tipo de microrganismo isolado, constata-se a existência de 76/148 (51,35%) negativas para microrganismos aeróbios, 70/148 (47,29%) com isolamento de *Enterococcus spp* e 3/148 (2%) com isolamento de *Staphylococcus spp*.

Figura 11 – Linfonodos de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém com cultivos negativos para micobactérias submetidos ao cultivo de outros microrganismos aeróbios segundo o tipo de microrganismo isolado - São Paulo – 2006

No gráfico 1 - São reunidos os resultados dos cultivos segundo a denominação dos linfonodos examinados que permitiram a identificação individual. As amostras constituídas pela mistura de mais de um linfonodo foram referidas como conjuntos.

Gráfico 1- Linfonodos de bovino com lesões sugestivas de tuberculose, porém com cultivos negativos para micobactérias submetidos ao cultivo de outros microrganismos aeróbios segundo a denominação do linfonodo examinado e microrganismo isolados - São Paulo – 2006

Nos gráficos 2 à 5 só foram demonstrados os resultados dos cultivos positivos de linfonodos com identificação individual. Os conjuntos dos linfonodos examinados não foram incluídos nesta análise.

No gráfico 2 - São apresentados os resultados nos cultivos de microrganismos aeróbios dos linfonodos da cabeça de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas para tuberculose, porém negativas nos cultivos para micobactérias. Houve isolamentos dos gânglios retrofaríngeos, parotídeos e sub-linguais, no entanto, os de maior frequência foram os retrofaríngeos com predomínio de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

Gráfico 2 – Linfonodos da cabeça e pescoço de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo de micobactérias: segundo os tipos de microrganismo aeróbio isolados – São Paulo – 2006

No gráfico 3 - São apresentados os resultados dos cultivos de microrganismos aeróbios dos linfonodos da região torácica de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas nos cultivos para micobactérias. Houve isolamentos dos gânglios mediastínicos, traqueobrônquicos e esofágicos, no entanto, os de maior frequência foram os mediastínicos com o predomínio de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus solitarius*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus arlettae*.

Gráfico 3 - Linfonodos da região torácica de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo de micobactérias: segundo os tipos de microrganismo aeróbio isolados – São Paulo – 2006

No gráfico 4 - São apresentados os resultados dos cultivos de microrganismos aeróbios dos linfonodos abdominais de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas nos cultivos para micobactérias. Houve isolamentos dos gânglios esofágicos, mesentéricos, retro-mamários, hilo-hepáticos e apicais, no entanto, os de maior frequência foram os retro-mamários e hilo-hepáticos com predomínio de *Enterococcus faecalis*.

Gráfico 4 - Linfonodos abdominais de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo de micobactérias: segundo os tipos de microrganismo aeróbio isolados – São Paulo – 2006

No gráfico 5 - São apresentados os resultados dos cultivos de microrganismos aeróbios dos linfonodos da carcaça de bovinos com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas nos cultivos para micobactérias. Houve isolamentos dos gânglios pré-escapulares, isquiáticos e pré-peitorais, no entanto, os de maior frequência foram os pré-escapulares com predomínio de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

Gráfico 5 - Linfonodos abdominais de bovinos, com lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo de micobactérias: segundo os tipos de microrganismo aeróbio isolados – São Paulo – 2006

5.1 Análise Estatística

Devido ao pequeno número de isolamentos de *E. faecalis* e *E. faecium*, a análise estatística das associações pelo teste de Qui-quadrado exigiu o agrupamento dos conjuntos de linfonodos cabeça e pescoço com os linfonodos da região torácica e os linfonodos abdominais com os linfonodos da carcaça.

As amostras constituídas por mistura de linfonodos de diversas regiões do corpo do animal foram desconsideradas.

A análise comparativa das proporções das duas espécies de Enterococos isoladas: *E. faecium* (18/125) e *E. faecalis* (36/125) revelou a existência de diferença significativa, χ^2 de MacNemar ($p < 0,05$).

No relativo a distribuição dos isolamentos de *E. faecium*, considerando-se as associações: cabeça/ tórax (11/89) e abdômen/ carcaça (7/40), não houve diferença significativa. Teste de Qui-quadrado $p > 0,05$. Para o *E. faecalis*, respectivamente (23/89) e (13/40) a conclusão foi a mesma $p > 0,05$.

No Teste de McNemar houve diferença significativa entre as espécies de enterococos isoladas: *E. faecalis* e *E. faecium* ($p < 0,05$).

Não foi possível a aplicação do teste de Qui-quadrado nos isolados de *Enterococcus solitarius* (1%), *Staphylococcus epidermidis* (1%) e *Staphylococcus arlettae* (1%), devido ao baixo número de isolamentos.

Não foi possível a aplicação de nenhuma análise estatística para as amostras histopatológicas, devido ao baixo número de resultados.

6 DISCUSSÃO

Do ponto de vista do inspetor no abatedouro, os resultados do histopatológico confirmaram que 36,28% das amostras com lesões sugestivas para micobactérias e negativas no cultivo, foram classificadas como fortemente suspeitas para micobactérias sp, o que indica ter sido o processo de escolha correto. De fato as técnicas microbiológicas clássicas utilizadas para o isolamento de micobactérias apresentam baixa sensibilidade, Rosales-Rodriguez (2005), pois os processos de descontaminação que objetivam inativar outras bactérias presentes na amostras, também podem afetar o crescimento do *M. bovis* (CORNER, 1994). Destaque-se que a má conservação das amostras durante o transporte para o laboratório também pode prejudicar o resultado dos cultivos (CORNER, 1994; RICHARDS; WRIGHT, 1983). Ambrósio (2005) referiu que a descontaminação pelo método de HPC (cloreto de hexadecilpiridínio) foi a que apresentou maior sucesso para isolamento de BAAR.

Os resultados histopatológicos dos linfonodos de bovinos revelaram que em 33,56% das amostras com cultivo negativos para micobactérias não foi constatado qualquer lesão na histopatologia, devido a conservação da amostra, a escolha dos fragmentos para corte histopatológico e exame microbiológico.

Das 146 amostras provenientes do método de visualização de bacilos álcool ácido resistentes pela coloração de Ziehl-Neelsen, 18/146 (12,32%) apresentaram resultados fortemente sugestivos e 31/146 sugestivos para micobactérias sp, pois a coloração de Ziehl-Neelsen foi negativa. Apesar da coloração por Ziehl-Neelsen ser um método rápido e de baixo custo a mesma só consegue revelar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes em concentrações superiores a 10^4 bactérias por mL e não distingue membros da família *Mycobacteriaceae* (BARKSDALE; KIM, 1977) de outros microrganismos como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* que apresentam as mesmas características tintoriais (PRITCHARD, 1988).

Para as amostras fortemente sugestivas no exame histopatológico (12,32%) apresentando necrose, células gigantes, inflamação crônica, calcificação e coloração de Ziehl-Neelsen negativa ou necrose, inflamação crônica, calcificação e coloração de Ziehl Neelsen negativa ou células gigantes e coloração de Ziehl Neelsen negativa e com crescimento de outros microrganismos aeróbios, este resultado pode ter sido consequência da utilização da solução saturada de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) bórax, como meio conservante das lesões, o qual preserva as

micobactérias no tecido por até 60 dias em temperatura ambiente (HERNÁNDEZ DE HANDA et al., 1997; RICHARDS; WRIGHT, 1983), mas pode ter inibido o crescimento de outros microrganismos, permanecendo apenas os mais resistentes.

Nos cultivos efetuados em Agar Sangue após 24 horas de enriquecimento em meio BHI houve crescimento de colônias: branco-acizentadas, com presença de hemólises alfa e beta, brilhantes, cremosas, catalase positivas e cocos gram positivos ou catalase negativas. Contudo algumas amostras cresceram na primeira semeadura e com as mesmas características após 24 horas no meio BHI. Nos demais meios: Ágar MacConkey e Ágar Saboraud não houve presença de colônias ou contaminantes.

Das 148 amostras de linfonodos de bovinos colhidas em abatedouros com lesões sugestivas para tuberculose, porém negativas para o cultivo de micobactérias, houve isolamento de microrganismos em 47,29%. Os microrganismos isolados foram: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. solitarius*, *S. arlettae* e *S. epidermidis*. No Canadá Bradley e Jericho (1997) encontraram linfadenites na cabeça de bovinos com isolamentos de: *Staphylococcus spp*, *Aeromonas spp*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Actinobacillus spp*.

Dos microrganismos isolados no presente estudo não se pode excluir a hipótese da possível inativação de microrganismos sensíveis a solução de borato de sódio utilizada como substituto a conservação por refrigeração. O maior isolamento de enterococos pode ter sido a extrema resistência do mesmo a condições de salinidade (THIAN; HARTMAN, 1981) bem como sua presença no ambiente das linhas de abate (KNUDTSON; HARTMAN, 1993).

Os locais de maior isolamento de *Enterococcus spp* foram os linfonodos da cabeça e pescoço (gânglios retrofaríngeos) e da região torácica (mediastínico e traqueobrônquico). Nos EUA, Jett et al. (1994) observaram que o *Enterococcus faecalis* foi o microrganismo mais freqüentemente isolado em todas as localizações dos gânglios.

No presente estudo houve maior isolamento de *E. faecalis* que *E. faecium* na proporção 2:1, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$). De fato Vancanneyt et al. (2002), demonstraram que o *Enterococcus faecalis* possui mais fatores de virulência que o *Enterococcus faecium* e que a proporção de casos de infecção por *E. faecalis* para outras espécies de *Enterococcus* é de 10:1.

Houve considerável número de isolamentos de *E. faecalis* e *E. faecium* nos linfonodos da carcaça, principalmente nas amostras constituídas por conjunto de diversos gânglios, sugerindo uma possível contaminação durante o procedimento de abate (KNUDTSON; HARTMAN, 1993). De fato estes microrganismos tem sido frequentemente encontrado em diversos materiais: fezes humanas, esterco animal, fertilizantes provenientes de adubos animais, carcaça e água servida (KÜHN et al., 2003). Destaque-se contudo que os enterococos podem resistir a altas temperaturas 60°C por 30 minutos (HARDIE; WHILEY, 1997; MORRISON et al., 1997), bem como aos processos de pasteurização do leite e seus derivados (FRANZ; SCHILLINGER; HOLZAPFEL, 1996; GORDON; AMAND, 1991; HOUBEN, 1982; OLASUPO et al., 1994). Assim os isolamentos obtidos no presente estudo podem ter sido decorrentes das condições higiênico sanitárias, existentes durante a colheita e bem como do procedimento de secção empregado durante a inspeção que pode ter gerado contaminações.

Até o presente momento não há registros do isolamento de *Enterococcus solitarius* em linfonodos de bovinos de abate. Já o *Staphylococcus epidermidis* tem relevância em medicina veterinária, pois as infecções em úberes de animais podem ser decorrentes de humanos (THORBERG et al., 2006; WATTS; OWENS, 1989). Contudo no Canadá outras espécies de *Staphylococcus arlettae* tem sido isoladas de carcaças de bovinos condenadas pela inspeção veterinária (BRADLEY; JERICO, 1997).

Todas as espécies de enterococos isoladas no presente estudo, podem ter sido devido a contaminação estabelecida durante o processo do abate, pois os exames histopatológicos confirmaram a presença de inflamação crônica, usualmente não provocada por estes microrganismos (JOHNSON, 1994). De fato uma vez introduzido na cadeia de processamento do alimento, os enterococos podem contaminar o produto e não ser necessariamente indicadores de poluição fecal (BARNES; INGRAM, 1955; KJELLANDER, 1960; POURCHER, 1991; RAMADAN; SABIR, 1963).

7 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, foram obtidas as seguintes conclusões:

1. Em linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo para micobactérias foram isolados os seguintes microrganismos aeróbios: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. solitarius*, *S. arlettae* e *S. epidermidis*.
2. Não houve correlação entre as bactérias isoladas e a localização dos respectivos linfonodos.
3. Em linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, porém negativas no cultivo para micobactérias, o exame histopatológico confirmou alguns linfonodos com lesões fortemente sugestivas ou positivas para micobactéria.
4. Não houve correlação entre o aspecto histológico dos linfonodos e o tipo de microrganismo isolado.
5. Os microrganismos isolados foram considerados como contaminantes que tiveram acesso aos materiais durante o procedimento de abate.

REFERÊNCIAS

ABALOS, P.; RETAMAL, P. Tuberculosis: uma zoonosis re-emergente?. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, v. 23, n. 2, p. 583-694, 2004.

ABRAHÃO, R. M. C. M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: Considerações gerais e a importância dos reservatórios animais**. 1998. 318 p. Tese (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Tuberculosis zoonótica. In: _____. **Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v. 1, p. 266-283. (Publicación Científica y Técnica n. 580).

ADAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. A review. **American Journal of Pathology**, v. 84, n. 1. p. 164-191, 1976.

AMBROSIO, S. R. **Métodos bacteriológicos aplicados à tuberculose bovina: comparação de três métodos de descontaminação e de três protocolos para criopreservação de isolados**. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001, 676 p.

AUSTRALIAN ANIMAL HEALTH COUNCIL. A Guide to Johne's disease in Australia- **Nacional Johnes's Disease Program**. 2001. CD-ROM.

BALSEIRO, A.; PRIETO, J. M.; ESPI, A.; PÉREZ, V.; GARCÍA MARÍN, J. F. Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenterio lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. **Veterinary Journal**, v. 166, p. 210-212, 2003.

BARKSDALE, L.; KIM, K. *Mycobacterium*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 217-372, 1977.

BARNES, E. M.; INGRAM, M. The identity and origin of faecal streptococci in canned hams. **Annual Institution Pasteur Lille**, v. 7, p. 115-119, 1955.

BATES, J. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevant of farm animals to human infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 37, p. 89-101, 1997.

BATES, J.; JORDENS, J. Z.; GRIFFITHS, D. T. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 34, p. 507-514, 1994.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Roca, 1988, v. 2, 380 p.

BIER, O. Micobactérias. In: _____ **Bacteriologia e imunologia**. 19. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1961. p. 500-525.

BOROS, D. L. Granulomatous inflammations. **Progress on Allergy**, v. 24, p. 183-267, 1978.

BRADLEY, J. A.; JERICO, K. W. F. Risk assessment: abscessation of head lymph nodes and carcass inspection at two high-line-speed beef abattoirs in Western Canada. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 157-160, 1997.

BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, p. 185-192, 1994.

BROSCH, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOLLIGEN, D.; COLE, A. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

BROWN, W.; HERNANDEZ ANDA, J. H. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 4, p. 557-559, 1998.

BUERGELT, C. D.; HALL, C.; MCENTEE, K.; DUNCAN, J. R. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. **Veterinary Pathology**, v. 15, p. 196-207, 1978.

CARRIGAN, M. J.; SEAMAN, J. T. The pathology of Johne's disease in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 67, p. 47-50, 1990.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4th ed. Philadelphia: London, 1991. 284 p.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis animal**. Buenos Aires: CPZ, 1972. 48 p. (Nota técnica, 26).

CHIODINI, R.; VAN KRUININGEN, H.; MERKAL, R. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): current status and future prospects. **Cornell Veterinary**, v. 74, p. 218-262, 1984.

CHRISTENSEN, G. D.; BALDASSARRI, L.; SIMPSON, W. A. Colonisation of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: BISNO, A. L.; WALDVOGEL, F. A. (Ed.). **Infections associated with indwelling medical devices**. 2nd ed. Washington. D.C. USA: American Society for Microbiology. 1994. p. 45-78.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. Revised definition of *Actinobacillus* sensu stricto isolated from animals. A review with special emphasis on diagnosis. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 13-30, 2004.

CLARKE, C. J. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. **Journal of Comparative Pathology**, v. 116, p. 217-261, 1997.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M. A review The bovine tubercle bacillus. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 13-29, 1983.

COLLINS, M. T. Diagnosis of paratuberculosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 12, n. 2, 1996.

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

CORNER, L. A.; TRAJSTAMAN, A. C. An evaluation of 1-Hexadecyl Pyridinium Chloride as a descontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. **Veterinary Microbiology**, v. 18, p.127-134, 1988.

CORPA, J. M.; GARRIDO, J.; GARCÍA MARÍN, J. F.; PÉREZ, V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 255-265, 2000.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Tuberculose. In: _____. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi. 1992, p. 317-337.

CÔRTEZ, J. A. **Epidemiologia**: conceitos e princípios fundamentais. São Paulo: Varela. 1993. 227 p.

CORTI, M. E.; FIOTI, M. F. V. Nocardiosis: a review. **International Journal Infectious Diseases**, v. 7, p. 243-250, 2003.

COSTELLO, E.; QUIGLEY, F.; FLYNN, O.; GOGARTY, A.; MC GUIRK, J.; DOLAN, L. Laboratory examination of suspect tuberculous lesions detected on abattoir post mortem examination of cattle from non-reactor herds. **Irish Veterinary Journal**, v. 51, p. 248-250, 1998.

COTTRAL, G. E. (Ed.). **Manual of standardized methods for veterinary microbiology**. Ithaca, Nueva York: Cornell University Press, 1978. p.

DACK, G. M. **Food poisoning**. 3rd ed. Chicago, IL: The University of Chicago Press, 1956.

DESCHEEMAEKER, P.; LAMMENS, C.; POT, B.; VANDAMME, P.; GOOSSENS, H. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 555-561, 1997.

DEVRIESE, L. A.; KEYSER, H. D. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. **Journal Dairy Research**, v. 47, p. 155-158, 1980.

DEVRIESE, L. A.; LAURIER, L.; DE HERDT, P.; HAESBROUCK, F. Enterococcal and Streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. **Journal Applied Microbiology**, v. 72, p. 29-31, 1992.

DEVRIESE, L. A.; POT, B. The genus *Enterococcus*. In: WOOD, B. J.; HOLZAPFEL, W. H. (Ed). The lactic acid bacteria. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, Blackie Academic & Professional, London , UK: 1995. v. 2, p. 327-367.

DEVRIESE, L. A.; POT, B; COLLINS, M. D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal Applied Bacteriology**, v. 75, p. 399-408, 1993.

FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; RISTOW, P. C. L. V. B.; LILENBAUM, W. Paratuberculose bovina: uma mini-revisão. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. v. 11, n. 36. p. 40-53, 2005.

FLYNN, O.; QUIGLEY, F.; COSTELLO, E.; O'GRADY, D.; GOGARTY, A.; MC GUIRK, J.; TAKAI, S. Virulence-associated protein characterization of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 221-228, 2001.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 1-24, 1999.

FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **International Journal Food Microbiology**, v. 29, p. 255-270, 1996.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods- a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 105-122, 2003.

GIL, J. I. **Manual de inspecção sanitária de carnes**. Lisboa. Serviço de educação. Fundação Calouste Gulbenkian. 2000. v. 2, 653 p (Aspectos Especiais, 2).

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **Microbiology Reviews**, v. 26, p. 163-171, 2002.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potencial technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 732-738, 1997.

GONZÁLEZ, J.; GEIJO, M. V.; GARLÍA-PARIENTE, C.; VERNA, A.; CORPA, J. M.; REYES, L. E.; FERRERAS, M. C.; JUSTE, R. A.; GARCIA MARIN, J. F.; PÉREZ, V. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. **Journal of Compared Pathology**, v. 133, p. 184-196, 2005.

GORDON, C. L.; AMAND, M. H. Thermal susceptibility of *Streptococcus faecium* strains isolated from frankfurters. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 609-612, 1991.

GRANGE, J. M. Human and bovine tuberculosis – New threats from an old disease. **British Veterinary Journal**, v.152, n. 3, p. 3-5, 1996.

HAAGSMA, J. **Bovine tuberculosis**. Geneve: Office International des Épizooties, 1995. 11 p. (Manual Amendment, 2).

HAJJEH, R. A.; REINGOLD, A.; WEIL, A.; SHUTT, K.; SCHUCHAT, A.; PERKINS, B. A. Toxic shock syndrome in the United States: surveillance update, 1979-1996. **Emerging Infection Disease**, v. 5, p. 807-810, 1999.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal Applied Microbiology**, v. 83, 1S-11S, 1997. Symposium Supplement.

HARRIS, J. E.; LAMMERDING, A. M. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*: current issues. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 12, p. 2103-2110, 2001.

HARRIS, N. B.; BARLETTA, R. G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 489-512, 2001.

HERNANDEZ DE ANDA, J.; EVANGELISTA, T. R.; VALENCIA, G. L.; HODGERS, M. M. Na abattoir monitoring system for diagnosis of tuberculosis in cattle in Baja

Califórnia, México. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, n. 6, p. 709-711, 1997.

HINES, M. E.; KREEGER, J. M.; HERRON, A. J. *Mycobacterial* infections of animals: pathology and pathogenesis. **Laboratorial Animal Science**, v. 45, p. 334-351, 1995.

HIPÓLITO, O.; FREITAS, M. G.; FIGUEIREDO, J. B. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. 4. ed. Belo Horizonte: Melhoramentos, 1965.

HOUBEN, J. H. Heat resistance of *Streptococcus faecium* in pasteurized ham. **Fleischwirtschaft**, v. 62, p. 490-493, 1982.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M. T. Functionalty of enterococci in meta products. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 223-233, 2003.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 462-478, 1994.

JOHNSON, A. P. Reviews: The pathogenicity of enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, p. 1083-1089, 1994.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C. **Pathology of domestic animals**. 2nd ed. New York; London: Academic Press, 1970. p. 238-240.

KANTOR, I. N. **Centro Panamericano de Zoonosis. Bacteriologia de la tuberculosis**. Buenos Aires: Organizacion Mundial de la Salud, 1988. 63 p. (Série de Monografias Cientificas e Técnicas n.11/rev.1).

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 5-14, 1994.

KJELLANDER, J. Enteric *Streptococci* as indicators of fecal contamination in water. **Acta Pathology Microbiology, Scand**, v. 48, p. 1-124, 1960. Supplement 136.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 123-131, 2003.

KLOOS, W. E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Annual Review Microbiology**, v. 34, p. 559-592, 1980.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Review**, v 7, p. 117-140, 1994.

KNUDTSON, L. M.; HARTMAN, P. A. Enterococci in pork processing. **Journal Food Protection**, v. 56, p. 6-9, 1993.

KREEGER, J. M. Ruminant paratuberculosis – a century of progress and frustration. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, v. 3, p. 373-383, 1991.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. 964 p.

KWON-CHUNG, K. L.; BENNETT, J. F. **Medical micology**. Philadelphia.: Lea & Febiger, 1992.

LADDS, P. W. **A colour atlas of lymphnode pathology in cattle**. Australia: Iowa State University Press, 1986. p. 7-14.

LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HANSLER JR, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1985. 1149 p.

LIGNIÉRES, J.; SPITZ, G. **Bulletin et Mémoires**. Société Centrale de Médecine Vétérinaire. Quoted from 'Pasteurella and Actinobacillus'. In: PARKER, M. T.; DUERBEN, B. I. Topley & Wilson's **principles of bacteriology**. London: Edward Arnold, 1902, v. 20, p. 487-546.

LINDEN, P. K.; MILLER, C. B. Vancomycin-resistant enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, v. 33, n. 2, p. 113-120, 1999.

MAGNUS, C. A.; MCCURDY, A. R.; INGLEDEW, W. M. Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham. **Journal Canadian Institute Food Science Technology**, v. 21, p. 209-212, 1988.

MANNING, E. J. B.; COLLINS, M. T. *Mycobacterium avium paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. **Revue Science Technique Officine International Epizootie**, v. 20, n. 1, p. 133-150, 2001.

MARCONDES, A. G. **Padronização da técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 para isolamento de *Mycobacterium bovis***. 2002. 115 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARIANO, M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 2, p. 161-176, 1995.

MARTINS, L. M. Staphylococcus. S/l: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. p.149-156.

MCKENZIE, R. A.; DONALD, B. A. Lymphadenitis in cattle associated with *Corynebacterium equi*: a problem in bovine tuberculosis diagnosis. **Journal Comparative Pathology**, v. 89, p. 31-38, 1979.

MONLUX, W. S.; MONLUX, A. W. **Atlas of meat inspection pathology. Agriculture Handbook**, n. 367. Washington: United States Department of Agriculture. 1972, 172 p.

MORENO, M. R. F.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1-24, 2006.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. *Enterococci* as emerging pathogens of humans. **Journal Applied Microbiology**, v. 83, p. 89S-99S, 1997. Symposium Supplement.

MUNDIT, J. O. Enterococci. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Eds). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London: The Williams & Wilkins Co. 1986. p. 1063-1066. v. 2.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7. ed. Washington: American Society for Microbiology. 1999. p.

OLASUPO, N. A.; SCHILLINGER, U.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from 'Wara'- a fermented skimmed cow milk product from West Africa. **Letters Applied Microbiology**, v.19, p. 438-441, 1994.

PÉREZ, V.; GARCÍA MARÍN, J. F.; BADIOLA, J. J. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 114, p. 107-122, 1996.

PEREZ-TAMAYO, R. Inflammation. In **Introducción a la Patología**. 2. ed, Buenos Aires: Panamericana, 1987, p. 180-245.

PERRONE, E. A. **Estudo histológico, morfométrico e imuno-histoquímico do granuloma induzido experimentalmente pelo *Mycobacterium bovis* e submetido ao tratamento pela isoniazida em hamster (*Mesocricetus auratus*).** 1996. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

POURSCHER, A. M.; DEVRIESE, L. A.; HERNANDEZ, J. F.; DELATTRE, J. M. Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis*, and *Enterococci* as indicators of the origin of faecal pollution of waters. **Journal Applied Bacteriology**, v. 70, p. 525-530, 1991.

PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology Review**, v. 4, p. 20-34, 1991.

PRESCOTT, J. J.; TRAVERS, M.; YAGER-JOHNSON, J. A. Epidemiological survey of *Corynebacterium equi* infectious on five Ontario horse farms. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p. 10-13, 1984.

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

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Gênero *Staphylococcus*. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 55-61.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.

RAMADAN, F. M.; SABIR, M. S. Differentiation studies of fecal streptococci from farm animals. **Canadian Journal Microbiology**, v. 9, p. 443-450.

REBHUN, W. C.; KING, J. M.; HILLMAN, R. B. Atypical *Actinobacillosis* granulomas in cattle. **Cornell Veterinarian**, n. 78, p. 125-130, 1988.

RICHARDS, W. D.; WRIGHT, H. S. Preservation of tissue specimens during transport to mycobacteriology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 393-395, 1983.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. **Robbins patologia estrutural e funcional**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 53-57, p. 308-313.

ROSALES-RODRIGUEZ, C. A. **Sistema de detecção de focos de tuberculose bovina no Estado de São Paulo utilizando métodos moleculares e epidemiológicos**. 2005. 86 f. Tese (Doutorado Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ROXO, E. **Patogenia comparada das cepas de micobactérias BCG e H37Rv em hamster (*Mesocricetus auratus*). Influência das vias sanguíneas**. 1992. 54 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

RUBIN, R. J.; HARRINGTON, C. A.; ROON, A.; DIETRICH, K.; GREENE, J. A.; MOIDUDDIN, A. The economic impact of *Staphylococcus* infection in New York City hospitals. **Emergenging Infectious Disease**, n. 5, p. 9-17, 1999.

RYCROFT, A. N.; GARSIDE, L. H. *Actinobacillus* species and their role in animal disease. **The Veterinary Journal**, v. 159, p. 18-36, 2000.

SANTOS, J. A. Inflamações – Tuberculose. **Patologia especial dos animais domésticos (Mamíferos e aves)**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1988, p. 190- 195.

SANZ PEREZ, B.; LOPEZ LORENZO, P.; GARCIA, M. L.; HERNANDEZ, P. E.; ORDOÑEZ, J. A. Heat resistance of enterococci. **Milchwissenschaft**, v. 37, p. 724-726, 1982.

SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nom. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal System Bacteriology**, v. 34, p. 31-34, 1984.

SHEFFIELD, E. A. The granulomatous inflammatory response. **Journal of Pathology**, v. 160, p. 1-2, 1990.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica**. São Paulo: Maegraw-Hill, 1981, 350 p.

SPECTOR, W. G.; REICHOLD, N.; RYAN, G. B. Degradion of granuloma inducing microorganisms by macrophages. **Journal of Pathology**, v. 101, p. 339-354, 1970.

STACKEBRANDT, E.; TEUBER, M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, p. 317-324, 1988.

STILES, M. E. Less recognized or presumptive foodborne pathogenic bacteria. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker Inc. 1989, p. 674-734.

SWEENEY, R. W.; WHITLOCK, R. H.; ROSENBERGER, A. E. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 166-171, 1992.

TAKAI, S.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. *Rhodococcus equi* infection in foals: current concepts and implication for future research. **Journal Equine Science**, v. 6, p. 105-119, 1995.

THIAN, T. S.; HARTMAN, P. A. Gentamicin-thallous-carbonate medium for isolation of fecal streptococci from foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 41, p. 724-728, 1981.

THORBERG, B. M.; KÜHN, I.; AARESTRUP, F. M.; BRÄNDSTROM, B.; JONSSON, P.; DANIELSSON-THAM, M. L. Pheno and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. **Veterinary Microbiology**, p. 1-10, 2006.

TOOD, J. K. Toxic shock syndrome. **Clinical Microbiology, Review**, n. 1, p. 432-446, 1998.

ÜGÜR, A.; CEYLAN, Ö. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus spp.* **Archives of Medical Research**, v. 34, p. 130-136, 2003.

VANCANNEYT, M.; LOMBARDI, A.; ANDRIGHETTO, C.; KNIJFF, E.; TORRIANI, S.; BJORKROTH, K. J.; FRANZ, C. M.; FOULQUIE MORENO, M. R.; REVETS, H.; DE VUYST, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; DELLAGLIO, F.; HOLZAPFEL, W. H. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1381-1391, 2002.

VAN DEN BOGAARD, A. E.; JENSEN, L. B.; STOBBERINGH, E. E. Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1558-1559, 1997.

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

WARREN, K. S. A functional classification of granulomatous inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 278, p. 7-18, 1976.

WATTS, J. L.; OWENS, W. E. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. **Research Veterinary Science**, v. 41, p. 1-4, 1989.

WILLETT, H. P. *Staphylococcus*. In: JOKLIK, W. K.; WILLETT, H. P.; AMOS, D. B.; WILFERT, C. M. (Ed.): **Zinsser microbiology**. 20th ed. Norwalk, CT, USA: Appleton and Lange, 1992. p. 401-416.

WOOLCOCK, J. B.; RUDDUCK, H. B. *Corynebacterium equi* in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, p. 319, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the who meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*)**. Geneva: FAO/WHO/CDS/VPH. 1993, 27 p. (Nota técnica. n. 130).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the who meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*)**. Geneva. FAO/WHO/CDS/VPH. 2004.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M. T. P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIORAVANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C. E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p.1-5, 2001.

APÊNDICE A

No apêndice A, quadro 2 são apresentados os resultados individuais dos exames microbiológicos e histopatológicos das amostras trabalhadas.

(Continuação)

IDENTIFICAÇÃO	LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	CULTIVOS	HISTOPATOLÓGICO	
			HE	ZN
1	mediastínico, retrofaringeo	NEGATIVO	N+C+IC	N
2	mesentérico, hilo-hepático	NEGATIVO	N+C	N
3	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N
4	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecium</i>	N+C	N
5	mesentérico, retro mamário	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C	N
6	retrofaringeo	<i>Staphylococcus arlettae</i>	IC	*
7	traqueo-brônquico, mesentérico, retro-mamário, sub-lingual	NEGATIVO	N+C+IC+CG	N
8	mesentérico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	P
9	apical, mesentérico, pré-crural, poplíteo, pré-peitoral	NEGATIVO		
10	retrofaringeo	NEGATIVO	NDN	N
11	retrofaringeo, mandibular	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC+CG	N
12	mediastínico	NEGATIVO	NDN	N
13	parotideo	NEGATIVO	NDN	N

Quadro 2 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo o número de identificação, denominação, cultivo e histopatológico - São Paulo – 2006

(Continuação)

IDENTIFICAÇÃO	LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	CULTIVOS	HISTOPATOLÓGICO	
			HE	ZN
			NDN	N
14	traqueo-brônquico	NEGATIVO	N+C	N
15	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	N	N
16	retrofaringeo	NEGATIVO	NDN	N
17	parotideo, sub-lingual	NEGATIVO	N+C	*
18	retrofaringeo	NEGATIVO	IC	N
19	esofágico	NEGATIVO	N	N
20	mediastínico, traqueo-brônquico, apical, hilo-hepático	NEGATIVO	N+C+IC	N
21	esofágico, mesentérico, traqueo-brônquico	<i>Enterococcus faecalis</i>	*	*
22	mediastínico	NEGATIVO	N+C+IC	N
23	sub-ilíaco, pré-crural	NEGATIVO	NDN	N
24	mediastínico	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N
25	retrofaringeo	NEGATIVO	N+C+IC	N
26	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	P
27	esofágico, retrofaringeo	NEGATIVO	N+C+IC	P
28	retro-mamário	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
29	traqueo-brônquico, sub-lingual	NEGATIVO	NDN	N
30	retrofaringeo	NEGATIVO	N+C	P
31	mesentérico	NEGATIVO	N+C+IC	N
32	mediastínico, pré-peitoral	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
33	retro-mamário	<i>Enterococcus faecalis</i>	FIBROSE+N	N
34	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>		

Quadro 2 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo o número de identificação, denominação, cultivo e histopatológico - São Paulo – 2006

(Continuação)

IDENTIFICAÇÃO	LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	CULTIVOS	HISTOPATOLÓGICO	
			HE	ZN
			NDN	N
35	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecium</i>	C	N
36	traqueo-brônquico	NEGATIVO	FIBROSE+ABSCESSO	P
37	hilo-hepático	<i>Enterococcus solitarius</i>	N+C	N
38	esofágico	<i>Enterococcus faecium</i>	N	N
39	mediastínico	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
40	Isquiático	<i>Enterococcus faecium</i>	N+C+IC	N
41	mediastínico	NEGATIVO	N+C+IC PARASITA?	N
42	traqueo-brônquico	NEGATIVO	N+C+IC	N
43	traqueo-brônquico	NEGATIVO	NDN	N
44	mediastínico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC+CG	P
45	mediastínico, retrofaringeo	NEGATIVO	N+C+IC	N
46	mediastínico, retrofaringeo	NEGATIVO	N+C+IC+CG	N
47	retrofaringeo	NEGATIVO	N+C	N
48	retrofaringeo	NEGATIVO	N+C	N
49	mediastínico	NEGATIVO	NDN	N
50	traqueo-brônquico	NEGATIVO	N+C	N
51	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
52	hilo-hepático, mesentérico	NEGATIVO	IC	N
53	retro-mamário	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
54	mediastínico	NEGATIVO	N+C+IC	N
55	hilo-hepático, mediastínico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
56	pré-peitoral	NEGATIVO		N

Quadro 2 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo o número de identificação, denominação, cultivo e histopatológico - São Paulo – 2006

(Continuação)

IDENTIFICAÇÃO	LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	CULTIVOS	HISTOPATOLÓGICO	
			HE	ZN
			N+C+IC	N
57	hilo-hepático	NEGATIVO	NDN	N
58	sub-lingual	NEGATIVO	NDN	N
59	retrofaringeo	NEGATIVO	NDN	N
60	retrofaringeo	NEGATIVO	NDN	N
61	pré-peitoral	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C	N
62	mesentérico	NEGATIVO	NDN	N
63	apical	<i>Enterococcus faecalis</i>	C	N
64	mediastínico, retrofaringeo	NEGATIVO	N+C+FIBROSE	N
65	atloidiano, sub-ilíaco, pré-peitoral, traqueo-brônquico	<i>Enterococcus faecium</i>	N+IC+CG	P
66	pré-escapular	NEGATIVO	NDN	N
67	traqueo-brônquico	NEGATIVO	NDN	N
68	sublingual	NEGATIVO	FIBROSE	N
69	pré-escapular	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N
70	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC+CG	N
71	mediastínico, retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C	N
72	mediastínico	NEGATIVO	NDN	N
73	mediastínico	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N
74	retrofaringeo	NEGATIVO	NDN	N
75	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecium</i>	C+N	N
76	hilo-hepático	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
77	mediastínico	NEGATIVO	N+C+IC	N
			FIBROSE	N
78	sublingual	NEGATIVO		N

Quadro 2 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo o número de identificação, denominação, cultivo e histopatológico - São Paulo – 2006

(Continuação)

IDENTIFICAÇÃO	LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	CULTIVOS	HISTOPATOLÓGICO	
			HE	ZN
79	retro-mamário	NEGATIVO	IC	N
80	sublingual	NEGATIVO	N+C+IC	N
81	esofágico, mediastínico, mesentérico, parotídeo	NEGATIVO	N+C+IC+CG	N
82	retrofaringeo	NEGATIVO	NDN	N
83	apical	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
84	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecium</i>	N+C+IC	N
85	parotídeo	NEGATIVO	N+C+IC+CG	P
86	retrofaringeo	NEGATIVO	NDN	*
87	retrofaringeo, mesentérico, sub-iliaco	NEGATIVO	N+C+IC	P
88	pré-escapular	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N
89	pré-escapular	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N
90	mesentérico	NEGATIVO	N+C	N
91	pré-peitoral	NEGATIVO	FIBROSE	N
92	mesentérico	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N
93	retrofaringeo, mediastínico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
94	retrofaringeo	NEGATIVO	N+C	N
95	mediastínico	<i>Staphylococcus arlettae</i>	N+C+CG	N
96	mediastínico	NEGATIVO	N+C+IC	P
97	mediastínico, mesentérico, retro--mamário, sub-lingual, traqueo-brônquico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
98	hilo-hepático, pré-escapular,pré-peitoral	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	P
99	mediastínico	NEGATIVO	N+C+IC	P

Quadro 2 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo o número de identificação, denominação, cultivo e histopatológico - São Paulo – 2006

(Continuação)

IDENTIFICAÇÃO	LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	CULTIVOS	HISTOPATOLÓGICO	
			HE	ZN
100	mediastínico	NEGATIVO	N+C	P
101	mesentérico	NEGATIVO	FIBROSE+IC	N
102	mediastínico	<i>Enterococcus solitarius</i>	N	N
103	mediastínico	NEGATIVO	N+C VEGETAL	N
104	mediastínico	NEGATIVO	IC	N
105	mediastínico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC+CG	P
106	mediastínico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
107	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
108	hilo-hepático, pré-peitoral	NEGATIVO	N+C	N
109	pré-peitoral	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N
110	mediastínico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C	N
111	retrofaringeo	NEGATIVO	NDN	N
112	mediastínico	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
113	mediastínico, sub-ilíaco	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
114	mediastínico	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	N+C+IC	N
115	hilo-hepático	NEGATIVO	N+C+IC	N
116	hilo-hepático	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
117	traqueo-brônquico	<i>Enterococcus faecalis</i>	IC+C	N
118	parotideo	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
119	mediastínico, retrofaringeo	NEGATIVO	FIBROSE	N
			N+C+IC	P
120	sublingual	<i>Enterococcus faecalis</i>		

Quadro 2 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo o número de identificação, denominação, cultivo e histopatológico - São Paulo – 2006

(Continuação)

IDENTIFICAÇÃO	LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	CULTIVOS	HISTOPATOLÓGICO	
			HE	ZN
121	pré-escapular	NEGATIVO	NDN	N
122	mediastínico, hilo-hepático, pré-peitoral, retrofaringeo, sub-lingual	<i>Enterococcus faecium</i>	N+C+IC+CG	N
123	retrofaringeo,mandibular	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
124	mesentérico, mediastínico,pré-crural	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
125	hilo-hepático	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C	N
126	hilo-hepático, mesentérico, traqueo-brônquico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	P
127	retrofaringeo	NEGATIVO	NDN	N
128	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
129	retro-mamário	NEGATIVO	NDN	N
130	retrofaringeo, pré-escapular	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
131	hilo-hepático, retrofaringeo, traqueo-brônquico	NEGATIVO	N+C+IC+CG	N
132	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
133	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
134	retro-mamário	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	P
135	traqueo-brônquico	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N
136	mediastínico,mesentérico	<i>Enterococcus faecalis</i>	NDN	N
137	mesentérico	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ni+IC	N
138	apical, esofágico,mediastínico,pré-escapular,pré-peitoral,retrofaringeo,traqueo-brônquico	NEGATIVO	N+C+IC	N
139	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C	N
140	mediastínico, hilo-hepático, traqueo-brônquico	<i>Enterococcus faecalis</i>	N+C+IC	N
141	retrofaringeo	NEGATIVO	N+C+IC	N

Quadro 2 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo o número de identificação, denominação, cultivo e histopatológico - São Paulo – 2006

(Conclusão)

IDENTIFICAÇÃO	LINFONODO OU CONJUNTO DE LINFONODOS	CULTIVOS	HISTOPATOLÓGICO	
			HE	ZN
142	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecium</i>	N+C	N
143	apical	NEGATIVO	HEMOSSIDEROSE	N
144	pré-peitoral	NEGATIVO	NDN	N
145	mediastínico, hilo-hepático	NEGATIVO	N+C+IC	P
146	traqueo-brônquico	NEGATIVO	NDN	N
147	retrofaringeo	NEGATIVO	N+C+IC	N
148	retrofaringeo	<i>Enterococcus faecium</i>	NDN	N

Quadro 2 - Linfonodos de bovinos com lesões sugestivas de tuberculose, colhidos em abatedouros do Estado de São Paulo no período de Maio/2002 à Janeiro/2004, segundo o número de identificação, denominação, cultivo e histopatológico - São Paulo – 2006

IC: inflamação crônica

C: calcificação

CG: células gigantes

N: necrose

NDN: nada digno de nota

* não disponível