

STEPHANIE CAROLINE GUEIROS SILVA

**AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, BACTERIOLÓGICA,
HISTOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES PULMONARES
SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE EM BOVINOS ABATIDOS NO
MATADOURO PÚBLICO DE GARANHUNS – PE**

**GARANHUNS
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES**

STEPHANIE CAROLINE GUEIROS SILVA

**AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, BACTERIOLÓGICA,
HISTOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES PULMONARES
SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE EM BOVINOS ABATIDOS NO
MATADOURO PÚBLICO DE GARANHUNS – PE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção parcial do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Bersane
Araújo de Medeiros Torres

**GARANHUNS
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES**

**AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, BACTERIOLÓGICA,
HISTOLÓGICA E MOLECULAR DE LESÕES PULMONARES
SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE EM BOVINOS ABATIDOS NO
MATADOURO PÚBLICO DE GARANHUNS – PE**

Dissertação de Mestrado elaborada por
STEPHANIE CAROLINE GUEIROS SILVA

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Bersane Araújo de Medeiros Torres
Presidente da Banca – Unidade Acadêmica de Garanhuns/ UAG

Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas
Centro de Saúde e Tecnologia Rural/ UFCG

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Carlos e Cristiane, a
minha irmã Beatrice, a minha avó
Maria José e a minha gata Dolores.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me acompanhar, proteger e dar forças para prosseguir nessa jornada.

Aos meus pais Maria Cristiane e Carlos Roberio, pelos ensinamentos, amor e carinho, sempre me apoiando em minhas decisões.

A minha querida irmã Beatrice, pela cumplicidade e amor, sempre ao meu lado em todos os momentos. E ao meu cunhado Vinícius pela amizade.

Aos meus avós maternos Manoel Gueiros (*In memorian*) e Maria José e aos meus avós paternos Valdemar Antônio e Alcione Alves, por todo carinho.

Aos meus primos-irmãos Arianne e Gustavo, pelo companheirismo, fazendo os dias mais engraçados.

A minha gata Dolores, pela pureza e inocência que somente um animal pode transmitir.

A toda minha família pelos bons momentos vivenciados.

A minha orientadora Profa. Dra. Márcia Bersane Araújo de Medeiros Torres, pela orientação, ensinamento, conselhos e confiança depositado a mim.

Aos meus amigos Naiara, Amanda, Allison, Érica, Diogo, Pamella e Igor pelas reuniões, risadas e amizade.

Aos colegas e amigos de Pós-graduação Joyce, Ueliton, Carlos, Marlos, Fernando, Jonas, Adony, Paula e Francisco pelos conhecimentos trocados, momentos de descontração e principalmente pela amizade consolidada.

Aos amigos que estão e passaram pelo Laboratório de Anatomia e Patologia Animal: Saulo, Diego, Tássio, Davi, Talita, Almir, Eustáquio, Maura e professora Daniela Oliveira, por toda ajuda, dedicação e amizade.

Ao senhor Ivanildo pela alegria e gentileza de sempre.

Aos Médicos Veterinários, Marcos André e Marcos Maranhão, responsáveis pelo Serviço de Inspeção no Matadouro Público de Garanhuns –PE, onde foi realizado este estudo, e a todos os funcionários e colegas, Luciano, José e senhor Mano, que gentilmente nos ajudaram nas coletas.

Aos professores Sérgio Santos, Wilton Júnior, Flávio Dantas e a Renata Cezar e Maria das Neves pelo auxílio nas etapas de processamento das amostras.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, pelos conhecimentos e ciência compartilhada.

A Mariana, Andreza e a professora Karina Burguer pelas orientações e ensinamentos no período que estagiei na UNESP.

Aos motoristas da Unidade Acadêmica de Garanhuns, Fábio Henrique, Fábio, Sílvio, Álvaro e Geraldo por nos levarem até ao matadouro para as coletas, pela ajuda e amizade durante estes dois anos.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste estudo.

Muito obrigada!

“O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quando o destino.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A tuberculose bovina é uma doença que apresenta um significativo reflexo econômico na economia do país, uma vez que afeta a saúde pública de forma direta e indiretamente. Devido ao abate diário de animais infectados pela referida doença nos matadouros públicos, essa situação é preocupante, pois se sabe que o diagnóstico no matadouro é realizado pela avaliação macroscópica de lesões suspeitas, o que pode levar a um diagnóstico equivocado. Objetivou-se com este estudo realizar uma avaliação morfológica, molecular e microbiológica de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no matadouro público de Garanhuns - PE. A pesquisa foi realizada no matadouro público de Garanhuns, Agreste de Pernambuco, durante o período de janeiro de 2014 a julho de 2015, com 32 amostras colhidas de pulmões provenientes do abate de 3.180 bovinos. Posteriormente foi realizado o diagnóstico pelo cultivo microbiológico, a coloração histopatológica e a identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) por meio da coloração de Zihel-Neelsen (ZN) tanto por esfregaço direto quanto por corte histológico dos tecidos. A PCR foi realizada a partir de DNA extraído das colônias isoladas, pela Reação em Cadeia da Polimerase (multiplex PCR e a PCR). Macroscopicamente uma frequência total de 1% (32/3.180) dos pulmões avaliados apresentaram lesões sugestivas. Na análise histopatológica 75% (24/32) amostras tinham granulomas tuberculoides. Houve presença de BAAR em 46,88% (15/32) esfregaços e 4,16% (1/24) em corte histológico pelo ZN. Na bacteriologia revelou que em 68,75% (22/32) amostras houve crescimento bacteriano. Na identificação molecular, a partir da cultura microbiológica, amplificaram um total de 91% (18/22), destas amostras 90% (18/20) amplificaram *M. bovis* e 10% (2/20) amostras amplificaram *Mycobacterium* sp. Portanto a utilização de métodos diagnósticos sensíveis na inspeção e o conhecimento de diagnósticos diferenciais da doença são imprescindíveis na prevenção e controle da tuberculose.

Palavras-chave: granuloma, *Mycobacterium* sp., zoonose.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a disease that has significant economic importance, since it directly and indirectly affect public health. Due to the daily slaughter of animals infected by that disease in public slaughterhouses, this situation is worrying, since it is known that the diagnosis at the slaughterhouse is conducted by macroscopic evaluation of suspicious lesions, which can lead to a misdiagnosis. The objective of this study perform a morphological, molecular and microbiological evaluation suggestive of tuberculosis lesions in cattle slaughtered in the abattoir of Garanhuns - PE. The survey was conducted in the abattoir of Garanhuns, Agreste of Pernambuco, during the period from January 2014 to July 2015, with 32 samples taken from the lungs of 3,180 cattle slaughter. Subsequently diagnosis was performed by microbiological cultivation, histopathological staining and identification of alcohol-acid resistant bacilli (AFB) by staining Zihel-Neelsen (ZN) either by direct smear and by histological section of tissue. PCR was performed from DNA extracted from the colonies isolated by polymerase chain reaction (multiplex PCR and PCR). Macroscopically 1% (32 / 3,180) of the lungs were presented lesions suggestive. Histopathology 75% (24/32) samples had tuberculous granulomas. There was presence of AFB in 46.88% (15/32) smears and 4.16% (1/24) in histological sections by ZN. In bacteriology revealed that in 68.75% (22/32) samples were bacterial growth. In the molecular identification 90% (18/20) of the samples amplified *M. bovis* and 10% (2/20) samples amplified *Mycobacterium* sp. Therefore the use of sensitive diagnostic methods for the inspection and knowledge of differential diagnosis of the disease are essential in the prevention and control of tuberculosis.

Keywords: granuloma, *Mycobacterium* sp., zoonosis.

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1. Diagnóstico histopatológico, número de amostras e percentual de lesões pulmonares sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no matadouro público de Garanhuns/PE, durante o período de janeiro de 2014 a julho de 2015.....	51
--	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Histórico.....	15
3.2 Agente etiológico.....	16
3.3 Importância dos matadouros na inspeção de carnes.....	16
3.4 Epidemiologia.....	17
3.5 Patogenia.....	20
3.6 Sinais clínicos.....	21
3.7 Lesões macroscópicas e microscópicas.....	22
3.8 Diagnóstico.....	23
3.8.1 Clínico.....	23
3.8.2 Alérgico-cutâneo.....	24
3.8.3 Histopatológico.....	24
3.8.4 Baciloscopia.....	25
3.8.5 Bacteriológico.....	25
3.8.6 Molecular.....	26
3.8.7 Imunohistoquímica.....	27
3.9 Diagnóstico diferencial.....	27
4.Prevenção e controle.....	28
5. REFERENCIAS.....	29
6. ARTIGO CIENTIFÍCO.....	36
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
8. ANEXO.....	48

1. INTRODUÇÃO

O Brasil lidera o *ranking* de maior exportador de carne bovina do mundo desde 2008 e as estatísticas mostram crescimento também para os próximos anos. A previsão é de que a exportação de carne bovina crescerá a uma taxa de 2,15% ao ano (BRASIL, 2015).

Apesar do crescimento em produção e exportação de produtos agropecuários, o Brasil tem enfrentado grande competitividade internacional traduzida através das exigências cada vez maiores, estabelecidas pelos países importadores, compondo as barreiras sanitárias. As exigências giram em torno da produção, com destaque para o bem estar animal e o controle sanitário dos rebanhos, o que irá refletir em produtos sem risco sanitário, com qualidade e assim, competitividade nos mercados (COSTA, 2012).

A tuberculose bovina está incluída na lista de doenças de notificação compulsória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Esta lista reúne as enfermidades transmissíveis consideradas importantes sob o ponto de vista socioeconômico e/ou sanitário, e cujas repercussões no comércio internacional de animais e produtos de origem animal são consideráveis (OIE, 2012).

A tuberculose é uma doença que apresenta um significativo reflexo econômico, pois afeta a saúde pública. Devido ao abate diário de animais infectados pela referida doença nos matadouros públicos, essa situação é preocupante, pois se sabe que o diagnóstico no matadouro restringe-se apenas a avaliação macroscópica de lesões suspeitas, o que pode levar a um diagnóstico equivocado dessa patologia (SILVA, MOURA, REIS, 2011).

No Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), matadouros são estabelecimentos dotados de instalações adequadas para a matança de quaisquer das espécies de açougue, visando o fornecimento de carne e demais produtos ao comércio interno. Esses estabelecimentos são inspecionados pelos órgãos responsáveis, com o intuito de assegurar a qualidade dos produtos ofertados, como também conhecer as principais patologias que podem comprometer a saúde humana durante o consumo desses alimentos (BRASIL, 2013).

Biffa et al. (2012), relataram que a identificação de alterações anatomopatológicas sugestivas de tuberculose durante a inspeção *post mortem* nos matadouros-frigoríficos, juntamente com a realização dos métodos diretos de diagnóstico da infecção, são

importantes ferramentas na vigilância epidemiológica. Encontrando-se o Médico Veterinário em situação difícil, quanto à identificação da lesão na sala de abate.

Lima et. al (2007) observaram em estudo realizado no abatedouro frigorífico de Mossoró - RN, que os órgãos mais acometidos por patologias corresponderam, em ordem decrescente, ao pulmão, rim, vesícula biliar e fígado. Em pesquisa conduzida por Marino et al., (2007) durante o período de 2001 a 2006 de 146751 bovinos abatidos, 11274 animais apresentaram lesões pulmonares. Dentre as lesões encontradas se destacou em 3907 (34,6%) pulmões com aspiração de sangue, 3721 (33,0%) enfisema pulmonar, seguido de 2421 (21,5%) aspiração de conteúdo ruminal e de 1225 (10,9%) congestão.

Segundo Corner, (1994) dados de literatura demonstram que cerca de 70,0 a 90,0% das lesões presuntivas de tuberculose são encontradas durante o exame *post mortem* de carcaças em abatedouros frigoríficos. Caracterizadas por lesões nodulares denominadas tubérculos, que podem localizar-se em qualquer órgão ou tecido (SHITAYE et al., 2006)

Tendo em vista que a produção de leite é importante para economia e tem relevante papel na alimentação da população, realizar uma pesquisa que vise detectar a frequência de lesões sugestivas de tuberculose é de grande importância para estimar o grau de exposição da população nesta região. Devido à escassez de pesquisas, deste tipo, no Agreste de Pernambuco, o objetivo deste estudo é realizar um levantamento de tuberculose bovina através de avaliação macroscópica, histológica, bacteriológica e molecular em lesões sugestivas da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Realizar uma avaliação morfológica, molecular e microbiológica de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no matadouro público de Garanhuns - PE.

2.2 Específicos

- Verificar a ocorrência de lesões sugestivas de tuberculose no parênquima pulmonar de bovinos;
- Avaliar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) compatíveis com *Mycobacterium* spp. através de *imprint* e cortes histológicos de lesões pulmonares utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen.;
- Avaliar achados histopatológicos das lesões pulmonares com características macroscópicas sugestivas de tuberculose;
- Realizar o isolamento de micobactérias por meio de cultura bacteriológica nas amostras;
- Pesquisar a presença de DNA do *M. bovis* e *M. tuberculosis* a partir dos isolados da cultura microbiológica;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico

Desde os primórdios da história há relatos de tuberculose nas diferentes civilizações. Historicamente, mesmo antes da ocupação humana de regiões que, atualmente, correspondem à Europa, o agente dessa enfermidade já provocava a doença em animais. No entanto, somente após o processo de domesticação dos bovídeos, ocorrido entre 8000 – 4000 anos antes de Cristo (a. C.) que surgiram evidências arqueológicas de infecção humana pelo micro-organismo (ROSEMBERG, 1999).

No Egito, quase todo conhecimento sobre tuberculose refere-se aos faraós e altos sacerdotes. A primeira evidência mais segura da doença, constatou-se em 44 múmias bem preservadas, datando de 3.700 a 1.000 a.C. Uma múmia apresentava o pulmão preservado, com lesões pleuropulmonares e sangue na traqueia (ROSEMBREG, 1999).

O reconhecimento para determinar que a etiologia fosse similar para homens e animais levou um longo período de tempo. Em meados do século XIX, aproximadamente metade da população inglesa tinha tuberculose nodular, de ossos e articulações, cuja origem era bovina. Em 1847 Virchow descreveu as lesões características ou tubérculos no homem e considerava lesões tuberculosas em serosas de animais como sendo neoplasmas similares aos linfossarcomas humanos (CORRÊA E CORRÊA, 1992).

Villeim em 1865 descreveu pela primeira vez, o reconhecimento da tuberculose como doença causada por um agente infeccioso em animais e, historicamente, a transmissibilidade do agente a partir de material humano aos animais. Contudo, foi Robert Koch que em 1882 descobriu o agente infeccioso, corando-o pela fucsina-anilina e isolando-o em meio de cultura em 1884 (ROXO, 1996).

Em 1889, Theobald Swit isola *Mycobacterium bovis* e em 1902, Ravenel obteve a primeira prova definitiva da transmissão do agente ao homem, decorrente da ingestão de alimentos contaminados. Em 1908, Mantoux instituiu o teste alérgico para diagnóstico e em 1931 Kuhnau sugeriu que a transmissão do agente poderia ocorrer através da ingestão de carne, somente quando o animal era afetado por uma tuberculose generalizada e neste caso, seria condenado durante a inspeção realizada nos matadouros (SOUZA et al., 1999).

3.2. Agente etiológico

As micobactérias são micro-organismos pertencentes à ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. A doença é causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis* e, com menor frequência, por *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium tuberculosis* (RIET-CORREA et al., 2007).

São bastonetes curtos aeróbicos, imóveis, não capsulados, não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, medindo de 0,5 a 7,0 µm de comprimento por 0,3 µm de largura. São corados a quente pela tintura de carbol, resistindo ao descoramento pelos ácidos inorgânicos, conferindo a denominação de báculo álcool-ácido resistente (BAAR) (LAGE et al., 1998).

O bacilo é moderadamente resistente ao calor, dessecação e diversos desinfetantes. Resistem muitas horas ou dias aos desinfetantes comuns; apenas alguns fenóis orgânicos conseguem destruí-las (ácido fênico, cresol, lisol, creolina, todos a 3%). Sobrevivem de seis meses a quatro anos em pastagens, aviários, matéria orgânica, fezes, cama de galinha e em locais onde se enterram cadáveres contaminados pelo bacilo (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

As principais espécies de importância epidemiológica para o homem pertencem ao complexo *M. tuberculosis*, que são as principais causadoras de tuberculose nos mamíferos, e compreende: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* patogênico apenas para Rato do Campo de Rabo Curto (*Microtus agrestis*), o *Mycobacterium africanum* (ainda não isolado no Brasil) e *Mycobacterium canetti*, não patogênico para o homem (CORNER, 1994; BROSCHE et al., 2002).

3.3. Importância dos matadouros na inspeção de carnes

Os matadouros são uma excelente ferramenta de detecção de doenças de importância econômica e de saúde pública e uma importante fonte alternativa de dados (AMEH, 2010). Toda observação e informação obtida através de inspeções em matadouros podem contribuir para a compreensão das doenças nos animais de abate (RAJI; SALAMI; AMEH, 2010).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) reconhece que um sistema de vigilância para tuberculose bovina a partir de matadouro é parte essencial de um programa de controle e erradicação da doença. E

salienta a importância do serviço de inspeção de origem animal comunicar ao serviço de defesa sanitária animal oficial os achados sugestivos de tuberculose em carcaças e vísceras (BRASIL, 2006).

A partir de informações obtidas de inspeções em matadouros, pesquisadores de diversas partes do mundo têm determinado a prevalência da tuberculose nos países ou em regiões específicas (BERRIAN et al, 2012), demonstrando como essa metodologia permite elucidar a dispersão da doença e fatores associados à sua ocorrência, além de fornecer os dados epidemiológicos necessários para o controle dessa enfermidade (PAOLI, 2013).

Segundo Araújo (2004), estudos realizados no país, a partir de exames de carcaças em matadouros-frigoríficos, estimaram uma prevalência de tuberculose bovina de 0,17% em Minas Gerais, 5,16% no Pará e 0,64% no Rio Grande do Sul. Esta diferença está relacionada ao grau de desenvolvimento regional, principalmente no que se refere ao estabelecimento de medidas sanitárias no rebanho.

O rastreamento de focos a partir de matadouros é uma importante estratégia, principalmente quando um programa de controle atingiu grande parte dos rebanhos e a frequência da doença sofreu declínio. Essa metodologia de trabalho tem sido utilizada em diversos países e apresenta bons resultados na erradicação e vigilância epidemiológica da doença (TWEDDLE e LIVINGSTONE, 1994).

3.4. Epidemiologia

Na saúde pública a doença foi reconhecida primeiramente pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pelo Comitê Consultivo em Tuberculose no ano de 1950.

O comitê reconheceu a ocorrência de infecção humana da tuberculose bovina nos países onde a doença é prevalente nos rebanhos bovinos além do risco de transmissão do agente pelo contato direto entre animais infectados e trabalhadores de fazendas e seus familiares, assim como, produtos contaminados (COSIVI et al., 1998).

Estima-se que 1.5 a 2 milhões de pessoas morrem anualmente de tuberculose e há aproximadamente dois bilhões de pessoas infectadas em todo o mundo (LOBUE; ENARSON; THOEN, 2010).

O consumo de leite ou produtos lácteos não pasteurizados continua a ser um risco para a infecção em países onde a tuberculose bovina não foi erradicada e as populações étnicas apresentam significativamente diferente perfil epidemiológico ou onde o HIV é prevalente (CICERO et al., 2009). Assim o caráter zoonótico da tuberculose é de

particular preocupação para os países em desenvolvimento (DE LA RUA, 2006; INGRAM et al., 2010).

A Índia e a China representam 40% dos casos humanos notificados e o Brasil está entre os 22 países que concentram 82,0% dos casos de tuberculose no mundo, sendo responsável por 100 mil casos novos anualmente e seis mil óbitos pela enfermidade (OMS, 2010). Em 2015, o Brasil registrou 68.467 novos casos de tuberculose (BRASIL, 2015).

A tuberculose possui distribuição mundial sendo responsável por determinar morbidade e mortalidade em bovinos em várias partes do mundo. Concentrando-se principalmente em países em desenvolvimento e em criações intensivas, como em bovinos leiteiros. Assume grande importância para a pecuária e comércio internacional de animais e seus subprodutos (JORGE, 2001).

Dados de notificações oficiais indicam prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados, no período de 1989 a 1998. Levantamento realizado em 1999, no Triângulo Mineiro e nas regiões do centro e sul de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais estimou a prevalência aparente de animais infectados em 0,8%. No mesmo estudo foram detectadas 5% de propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que este valor subiu a 15% no universo de propriedades produtoras de leite, com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção (BRASIL, 2006).

Outro estudo sobre a tuberculose bovina foi realizado em 2004, no Distrito Federal, com o objetivo de determinar a prevalência da doença e das características produtivas do rebanho bovino na região. O Distrito Federal possui um rebanho bovino de cerca de 120.000 cabeças das quais foram amostradas 2.019 em 278 propriedades, observando-se uma prevalência de 0,419% de propriedades positivas e 0,0305% de bovinos positivos. Nos dias atuais, a prevalência da doença é maior nos países em desenvolvimento, e menor nos países desenvolvidos, onde o controle e a erradicação encontram-se em fase avançada (BRASIL, 2006).

Os bovinos infectados constituem fonte de infecção através de exsudatos traqueais em aerossol, fezes, ingestão ou deglutição de descargas respiratórias e outras secreções. O bovino, uma vez infectado, já é capaz de transmitir o agente a outros, mesmo antes do desenvolvimento de lesões teciduais (NEILL et al., 1994; REBHUN, 2000).

A principal porta de entrada do *M. bovis* é a mucosa respiratória; a transmissão em aproximadamente 90% dos casos ocorre pela inalação de aerossóis contaminados com micro-organismo. A mucosa digestória também é porta de entrada do agente, principalmente em bezerros alimentados com leite proveniente de vacas com mastite tuberculosa e em animais que ingerem a água ou forragens contaminadas. Nesse caso, o complexo primário localizar-se-á nos órgãos digestivos e linfonodos regionais (BRASIL, 2006), sendo considerada a segunda via de infecção (NEILL et al., 1994).

A transmissão de *M. bovis* entre bovinos é dependente de uma série de fatores, incluindo a frequência de excreção, via de infecção, o período de transmissibilidade, e susceptibilidade do hospedeiro (GRIFFIN e DOLLAN, 1995).

A transmissão da tuberculose bovina para seres humanos ocorre principalmente em pessoas que lidam diariamente e diretamente com animais vivos, assim como os trabalhadores de abatedouros e magarefes, trabalhadores de laticínios e laboratórios, o que reforça o caráter ocupacional da enfermidade (LINS et al., 2010).

Observações e estudos sugerem que as condições requeridas de transmissão ocorrem com mais frequência quando o animal tuberculoso está nas fases iniciais da infecção (GRIFFIN e DOLLAN, 1995). Esta visão também é apoiada por estudos realizados em bovinos, que indicaram que a liberação de bactérias é, na melhor das hipóteses, transitória e envolve número baixo de bacilos (McCORMY et al., 2005). No homem e texugos o risco de transmissão aumenta com a progressão da doença, e essas espécies normalmente só se tornam altamente infecciosas quando a doença está avançada e um grande número de organismos está sendo excretado (SCHOENBAUM et al., 1992; MENZIES, 1997).

O risco de se contrair o agente pela ingestão de produtos cárneos contaminados é menor devido à baixa persistência do agente em tecidos musculares. A inspeção sanitária em matadouros com prudência faz a condenação de carcaças de animais portadoras de lesões presuntivas de tuberculose (ABRAHÃO, 1999). Salientando que, trabalhos realizados na Nigéria apontam a ingestão de carne contaminada como responsável por 45% dos casos de tuberculose em humanos causada pelo *M. bovis* (SOUZA et al., 2009).

Skuce, Allen, McDowell, (2012) citam como, fatores de risco de transmissão da tuberculose bovina entre os rebanhos: histórico de incidência da doença; movimentação animal; ocorrência da doença em terrenos contíguos à propriedade; tamanho e tipo do rebanho; tipo de instalação; aquisição de animais a partir de rebanhos

com histórico de tuberculose; fornecimento de alimento no interior de instalações; e, em algumas localidades, densidade ou atividade de espécies silvestres.

A tuberculose bovina afeta rebanhos leiteiros, principalmente com sistema de criação intensivo, tendo menor ocorrência em rebanhos com aptidão para corte em virtude do sistema de criação utilizado geralmente ser o extensivo (JÚNIOR e SOUZA, 2008). O confinamento é um importante fator na dispersão do agente no rebanho, o que explica a maior prevalência em rebanhos leiteiros à medida que a idade do rebanho aumenta, e a menor no gado de corte, onde os animais são abatidos precocemente e tendo menor tempo de exposição (ABRAHÃO, 1999).

3.5. Patogenia

Quando a infecção ocorre mucosa respiratória (aerosóis), o pulmão é o órgão primeiramente atingido, assim como os linfonodos regionais. Já quando a infecção é pela mucosa digestiva, a lesão se dá no sítio de entrada, principalmente nos linfonodos retrofaríngeos e mesentéricos (CASSIDY et al., 1999).

Quando a resistência orgânica é baixa acontece a disseminação do agente no parênquima pulmonar pela via aérea ou pela via hematógena, atingindo o linfonodo regional. Dessa forma, ocorre uma infiltração celular, necrose de caseificação e circunscrição da lesão, que pode evoluir para resolução e calcificação. A presença de um nódulo calcificado, predominantemente no terço distal do lobo caudal e/ou aumento de volume do linfonodo regional denomina-se “Complexo Primário” (PRITCHARD, 1988; O'REILLY E DABORN, 1995).

Em bovinos naturalmente infectados, presumivelmente, fatores tais como o tamanho das gotículas infecciosas inaladas e a orientação topográfica do pulmão no interior do corpo, ditam a dinâmica do fluxo de ar e a distribuição da lesão (CASSIDY, 2006).

Os macrófagos e as células dendríticas são importantes na indução da resposta imune à infecção por micobactérias. Estas células desempenham diferentes funções no desenvolvimento, como por exemplo, a destruição dos micro-organismos ou estimulação antigênica das células T (HOPE et al., 2000).

A natureza crônica da resposta inflamatória rica em macrófagos e micobactérias e a formação do granuloma dependem de alguns fatores tais como: localização intracelular favorecida destes organismos dentro de macrófagos e pela sua, parede celular mal

digerível. Granulomas representam expressão focal de inflamação granulomatosa que pode restringir ou impedir o crescimento de micobactérias justapondo macrófagos infectados e células T. Neste contexto, as células T podem regular positivamente tanto a atividade microbicida dos macrófagos ou lisar macrófagos altamente infectados, conforme a necessidade (SAUNDERS e COOPER, 2000).

Se os bacilos não são destruídos, os fagócitos tendem a protegê-los dos anticorpos e outras defesas imunes, e muitos sobrevivem e se multiplicam dentro dos fagócitos. Os macrófagos e outras células de defesa se acumulam no sítio de infecção, formando uma camada circundante. Isto leva a uma lesão fechada, denominada tubérculo (significando protrusão ou massa). Após várias semanas, o interior do tubérculo torna-se caseoso (TORTORA et al., 1998).

As interações complexas, dinâmicas dentro dos tubérculos refletem um composto de macrófagos e de células T auxiliares, produção de citocinas e atividade micobacteriana, que por sua vez influenciam a aparência morfológica do granuloma. Necrose da lesão, liquefação, mineralização e regressão representam alguns dos resultados dessas interações, determinando o tamanho da lesão, aparência e, finalmente, a apresentação da doença no hospedeiro (CASSIDY, 2006).

Necrose caseosa central é uma característica de granulomas tuberculosos na maioria das espécies e tem uma influência significativa sobre a expansão da lesão e por muitos anos o desenvolvimento de necrose dentro das lesões tuberculosas, é considerado, principalmente um evento "ativo" com células imunomediadas, gerando células T capazes de ativar e destruir macrófagos carregados de micobactérias (DANNENBERG, 1994).

Evidências mais recentes, no entanto, sugerem que a imunidade inata, falha de ativação de macrófagos e particulares combinações de citocinas em lesões em desenvolvimento também contribuem para o desenvolvimento de necrose em lesões (ORME, 1998).

3.6. Sinais clínicos

Sendo uma doença de evolução muito lenta, os sinais clínicos são pouco frequentes em bovinos e bubalinos. Muitos animais com uma infecção recente por *M. bovis* podem não apresentar sinais clínicos característicos da infecção, sendo observadas lesões apenas na sala de abate (CORNER, 1994).

Dessa forma, emagrecimento progressivo sem associação a outros sinais deve levantar a suspeita para a tuberculose bovina. Quando há comprometimento dos pulmões, os animais podem apresentar uma tosse crônica, em virtude de broncopneumonia, entrecortada e produtiva. Com a evolução da doença, quando a maior parte dos pulmões já foi destruída, observa-se uma dispnéia e respiração profunda. Quando há infecção pela via digestiva, os sinais mais comuns são causados pela compressão de linfonodos, e depois, persistente e, raramente diarreia (JÚNIOR e SOUZA, 2008), assim como a falta de apetite, debilidade e oscilação de temperatura (CORNER, 1994).

A mastite tuberculosa é de grande importância com vistas ao perigo para a saúde pública, em virtude da disseminação da doença para os bezerros e pela dificuldade de diferenciá-la de outras formas de mastite. O achado característico da sua presença é um endurecimento e hipertrofia acentuados envolvendo inicialmente a parte superior do úbere nos quartos posteriores (JÚNIOR e SOUZA, 2008).

Alterações neurológicas podem ser observadas, quando atinge o encéfalo e meninges podem ocorrer sintomas nervosos centrais, generalizados ou focais, dependendo de sua localização. Alguns sinais neurológicos observados são: andar inseguro e cambaleante, excitabilidade, movimento de pedalar, paralisia total ou parcial de alguns nervos cranianos. (ROSENBERGER et al., 1993).

3.7. Lesões macroscópicas e microscópicas

As lesões macroscópicas são constituídas pela formação de nódulos com distribuição focal ou difusa e de consistência firme (MEIKLE et al., 2007).

A presença de lesões em outros órgãos, além do complexo primário, indica disseminação vascular. Essa disseminação da infecção pode assumir a forma miliar, quando ocorre de maneira abrupta e maciça, com entrada de grande número de bacilos na circulação (BRASIL, 2006).

Macroscopicamente as lesões possuem coloração amarelada em bovinos, e ligeiramente esbranquiçada em búfalos; apresentam-se na forma de nódulos de 1,0 a 3,0 cm de diâmetro. As lesões podem estar presentes em qualquer tecido do animal, sendo encontradas com mais frequências em linfonodos (mediastínicos, retrofaríngeos, bronquiais, parotídeos, cervicais, inguinais superficiais e mesentéricos), em pulmões e fígado (BRASIL, 2006).

O tubérculo esteja ele situado profundamente no tecido mole como fígado e os pulmões, estejam salientando-se de uma superfície serosa ou mucosa, é de um nódulo firme ou duro, branco, cinzento ou amarelo. Nas seções de corte, possui centro necrosado e caseoso, de cor amarelada, estão seco e sólido, contrastando com o pus que ocorre num abscesso com áreas de calcificação (JONES, 2000).

A calcificação é comum em muitos animais, e ao seccionar um tubérculo, uma sensação arenosa e rangente indica a presença de material calcário. Em bovinos a calcificação é frequente, principalmente nos linfonodos, bem como, nos casos de disseminação generalizadas dos tubérculos sobre a superfície pleural e peritoneal (CASSIDY et al., 1999; JONES, 2000).

Em relação à infecção por *M. tuberculosis*, geralmente é uma enfermidade autolimitante em bovinos, nos quais as lesões normalmente estão presentes nos linfonodos e não excedem 20 mm de diâmetro (ACHA e SZYFRES, 2001). Lesões ocasionais e pequenas podem ser encontradas nos pulmões e nos intestinos de bezerros. Além disso, infecções por *M. tuberculosis* e também por *M. avium*, causam lesões localizadas que não se generalizam (RIET-CORREA et al., 2007).

Microscopicamente as lesões histológicas caracterizam-se por grupos irregulares de macrófagos epitelioides não encapsulados, revestidos parcial ou totalmente por cápsula fibrosa, circundando área de necrose, e associado a infiltrado linfocitário e pequeno número de neutrófilos. Podem ser visualizadas áreas de hemorragia e células gigantes multinucleadas (tipo Langhans) (CASSIDY et al., 1999; SOUZA et al., 2013).

Em casos de infecção experimental em bovino, o tubérculo pode ser visualizado entre o 10º e 14º dia pós-infecção, apresentando-se como uma coleção densa de células com núcleos vesiculosos e citoplasma palidamente corado (DUNGWORTH et al., 1995).

3.8. Diagnóstico

3.8.1. Clínico

O diagnóstico clínico torna-se importante para os animais com tuberculose avançada, onde o teste tuberculínico perde seu valor pela possibilidade do fenômeno da anergia (desaparecimento da capacidade do organismo reagir a uma substância ou a um agente patogênico relativamente aos quais estava anteriormente sensibilizado) à tuberculina (USDA-APHIS, 2005).

Apesar da inespecificidade dos sinais, o exame clínico é importante na erradicação da tuberculose de um rebanho, pois os animais que têm doença evoluída, generalizada, apresentam geralmente um decréscimo da sensibilização alérgica (HEINEMANN et al., 2008).

O exame clínico inclui a auscultação, a percussão, a termometria e a palpação de glândulas mamárias e linfonodos superficiais. Nesse último caso, são avaliados principalmente a exacerbação da sensibilidade dolorosa e a presença de linfadenomegalia (ROXO, 1996).

3.8.2. Alérgico-cutâneo

O teste de tuberculina é usado para diagnóstico *ante-mortem* de tuberculose latente e ativa no homem e nos animais há mais de 100 anos. A tuberculina bovina é considerada aceitável para o diagnóstico nos programas de erradicação se tem uma potência mínima de 2.000 UI por dose (GOOD e DUIGNAN, 2011). É baseado na detecção da resposta mediada por células no início da infecção. Todavia, nos estágios mais avançados da doença, a resposta imune mediada por células pode diminuir em oposição a uma resposta imune humoral geralmente aumentada e o teste de tuberculina pode, portanto, dar resultados falsos negativos (NEILL et al., 1994; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006).

Como antígenos, para desencadear a reação de hipersensibilidade, são empregadas tuberculinas sintéticas de dois tipos: a proteína purificada (PPD) bovina, procedente do *M. bovis* e a PPD aviária proveniente do *M. avium* (MONAGHAN et al., 1994).

3.8.3. Histopatológico

O diagnóstico histopatológico é complementar ao exame *post-mortem* de carcaças com lesões suspeitas de tuberculose. Sob a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) permite a observação da morfologia e organização do granuloma característico da tuberculose (CORNER, 1994; CASSIDY et al., 1999). Fragmentos de tecidos com lesões sugestivas de tuberculose (nódulos caseosos em linfonodos, pulmões, fígado) podem ser enviados para exame histopatológico em frasco de boca larga (plástico ou vidro), hermeticamente fechado, imersos em solução de formaldeído a 10%, observando-se a proporção de uma parte de amostra para 10 de formaldeído (BRASIL, 2006).

3.8.4. Baciloscopia

A baciloscopia com utilização da coloração de Ziehl-Neelsen, tem sido empregada, como método diagnóstico, onde as micobactérias são coradas pela fucsina a quente e resistem ao descoramento pelo álcool-ácido, denominando-as de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), os quais permanecem corados de vermelho. Ácido resistência deve-se à existência de lipídeos singulares na superfície da célula, denominado de ácido micólico. Essa substância é um grupo de hidróxi-lipídeos complexos de cadeia ramificada (MADIGAN et al., 2010), sendo um importante fator determinante da virulência bacteriana, uma vez que inibe a quimiotaxia, além de ser leucotóxico e permitir sua sobrevivência no interior de macrófagos (RIET-CORREA; GARCIA, 2001).

A técnica de coloração de Ziehl-Neelsen é utilizada para corar bactérias do gênero *Mycobacterium* e outros micro-organismos ácidos resistentes como o gênero *Nocardia* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). Além da identificação de BAAR através do esfregaço, pode-se utilizar a coloração a partir do exame histopatológico onde os cortes histológicos são corados utilizando o método Ziehl-Neelsen. Os bacilos são observados com um microscópio de luz comum e aparecem como células vermelhas, coloidais ou bacilares, localizando-se isoladamente ou em aglomerados (SCANLAR, 1988).

3.8.5. Bacteriológico

O diagnóstico definitivo da tuberculose é realizado mediante o isolamento e a identificação do agente por métodos bacteriológicos. Embora o diagnóstico bacteriológico seja um processo laborioso e de baixa sensibilidade, ele oferece aspectos positivos (VARELLO et al., 2008).

As análises bacteriológicas completas são necessárias nas seguintes situações: confirmação da doença em bovinos em regiões onde não foi comprovada anteriormente; estudo de animais positivos ao teste de tuberculina, nos quais não se observaram lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose; confirmação da presença da infecção em animais positivos ao teste tuberculínico, com ou sem lesões macroscópicas, de uma propriedade considerada livre de tuberculose; pesquisa de micobactérias em lesões sugestivas de tuberculose, encontradas durante a inspeção sanitária *post-mortem* de animais provenientes de unidade de criação monitoradas para tuberculose; pesquisa de micobactérias em amostras de leite e de outros produtos de origem animal;

necropsias de animais com reações inespecíficas, nos quais são encontradas lesões sugestivas de tuberculose (LOPES FILHO, 2010).

O diagnóstico bacteriológico por isolamento requer um longo tempo de crescimento (30 a 90 dias), pois o *M. bovis* cresce lentamente em meios de cultura artificiais. Para permitir o isolamento de qualquer bactéria do gênero *Mycobacterium* sp., recomenda-se a semeadura concomitante nos meios de cultura Löwenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie (RIBEIRO, 2006). Com base nas características morfológicas da cultura e pelo perfil bioquímico é possível diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*. *M. bovis* tem seu crescimento dificultado em meios que contenham glicerol. Ele cresce exclusivamente em meios de cultura que possuem suprimento de piruvato ao invés de glicerol (GRANGE, 2001).

3.8.6. Molecular

Métodos moleculares para diagnóstico de tuberculose bovina têm sido usados em aplicações de investigação em alguns países, mas sem impacto significativo sobre os procedimentos de diagnóstico em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (FURLANETTO et al., 2012).

O interesse pelos métodos moleculares tem se intensificado devido às dificuldades encontradas no diagnóstico da tuberculose em animais, principalmente pelas limitações quanto à sensibilidade e especificidade do teste de reação cutânea e o longo período para a confirmação da presença do agente etiológico pelos métodos bacteriológicos de rotina (COSTA et al., 2013).

A técnica da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) baseia-se na amplificação exponencial de uma sequência genômica alvo, pela utilização, em geral, de um par de iniciadores, conhecido como primers, que flanqueiam a região genômica que se pretende amplificar pela ação de uma DNA polimerase termo-resistente, em geral a *Taq* DNA polimerase (PEREIRA, 2001).

Problemas de contaminação podem também ocorrer, como a contaminação cruzada entre espécies, através de amplificações de culturas de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, e também por transferência de algumas moléculas de sequência alvo para reações de amplificação a serem realizadas, resultam muitas vezes, em falsos positivos (KANDUMA; MCHUGH.; GILLESPIE, 2003).

Uma das grandes vantagens mencionadas para emprego da técnica de PCR é a alta sensibilidade (RORING et al., 2000). Em uma pesquisa de correlação entre métodos diagnósticos de tuberculose bovina, realizada por Bermudez et al., (2010), foram avaliadas 553 carcaças, as quais, 268 possuíam lesão sugestiva para a doença. Destes 268 isolados na cultura bacteriológica apenas 104 (39%) foram positivos, no PCR foram identificados 123 positivos (46%), sendo 70 (67,3%) ambos positivos para bacteriologia e PCR. A PCR demonstrou, dessa forma, ser um teste de maior sensibilidade com 65,5%, em relação à cultura bacteriológica. Entretanto Collins et al., (1994); Ruggiero et al., (2007), citam que a PCR realizada diretamente das amostras clínicas mostra restrições em termos de sensibilidade, principalmente na detecção de *M. bovis* em amostras paucibacilares, nestas amostras a cultura apresenta maior sensibilidade.

3.8.7. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é uma combinação de técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas que possibilita a detecção de antígenos tissulares *in situ*, por meio da utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras (GIMENO, 1995). É um conjunto de técnicas relativamente recente cuja crescente utilização tem provocado grande impacto na patologia humana e veterinária, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade (SILVA e NOGUEIRA, 2002). Esta técnica permite a avaliação da relação entre a presença de antígenos específicos nos tecidos com as lesões por eles provocadas, com rapidez e precisão nos diagnósticos, favorecendo a durabilidade do material corado e a realização de estudos retrospectivos (SILVA e NOGUEIRA, 2002). Diante da alta especificidade, esses métodos imunohistoquímicos podem ser usados para avaliar a precisão de diferentes técnicas imunológicas e sorológicas (BREES et al., 2000).

3.9. Diagnóstico diferencial

Na inspeção realizada em frigoríficos, diversas doenças: actinobacilose, mucormicose, coccidiomicose, pentastomíase, hidatidose polícística apresentam lesões macroscópicas similares à tuberculose (RIET-CORREA et al., 2007). As características de coloração do agente etiológico da tuberculose bovina também se assemelham com outros micro-organismos ácido resistentes dos gêneros *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (ROXO, 1996).

Outros diagnósticos diferenciais podem ser identificados como: doença do trato respiratório superior, abscesso, linfossarcoma, laringite necrosante, traumatismo, tumores da laringe, actinomicose e pneumonias micóticas. Além destas observa-se também: cistos nos gânglios linfáticos retrofaríngeos médios; metástase de neoplasia no gânglio linfático externo; carcinoma alveolar; metástase de neoplasia na pleura; bronquiectasias não tuberculosas (GIL, 2000).

4. Prevenção e controle

Em muitos países ou regiões a adoção ou não de um programa de erradicação da tuberculose bovina pode depender de fatores econômicos. Assim, enquanto muitos países subdesenvolvidos têm problemas com a doença em bovinos e, pelo menos alguns, também em animais selvagens, nem todos têm ou podem pagar programas obrigatórios ou abrangentes de controle de tuberculose bovina (GOOD e DUGNIAN, 2011).

Pode ser adotado como medida de controle instalações adequadas, que permitem boa ventilação e exposição direta à luz solar, contribuindo para prevenir a contaminação do ambiente. Recomenda-se higienizar e desinfetar periodicamente todas as instalações, especialmente os bebedouros e os cochos, com substâncias como hipoclorito de sódio 5%; fenol 5%; formaldeído 3% ou cresol 5%. Constituem medidas importantes o monitoramento dos rebanhos pela detecção de lesões tuberculosas realizadas pelo serviço de inspeção de carcaças quando do abate dos animais e o controle de trânsito e de participação em exposições, feiras e leilões. Também, a inspeção sanitária dos produtos de origem animal destinados ao consumo humano e a pasteurização ou esterilização do leite e derivados diminuem os riscos de transmissão do *M. bovis* ao homem (BRASIL, 2006).

Diversos estudos foram realizados sobre vacinação e tratamento da tuberculose bovina, até o presente, os resultados obtidos não justificam a adoção dessas medidas como forma de controle da enfermidade, uma vez que testes para diferenciar animais vacinados e enfermos são complexos e onerosos, além disso, em países que alcançaram grande sucesso com programas implementados para o combate à tuberculose bovina, a vacinação não foi utilizada e, portanto, não foram contempladas na estratégia de ação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT (BRASIL, 2006).

5. REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose Humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: Considerações gerais e importância dos reservatórios animais. **Archives of Veterinary Science**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/veterinary/article/view/3771>>. Acesso em: 01 jun. 2015.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3ed. Washington: OPS, 2001. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19161&Itemid=> Acesso em: 01 jun. 2015.
- ARAÚJO, C. P. **Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cultura e sua identificação pela reação de polimerase em cadeia**. 2004. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2004.
- BERMUDEZ, H. R., et al. Correlation between histopathological, bacteriological and PCR diagnosis of bovine tuberculosis. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 15, p. 2082 - 2084, 2010.
- BERRIAN, A. M., et al. Risk of bovine tuberculosis for cattle sold out from herds during 2005 in Ireland. **Veterinary Record**, n. 24, p. 1-5, 2012.
- BIFFA, D., et al. Factors associated with severity of bovine tuberculosis in Ethiopian cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 991-998, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT**. Brasília, DF, p. 51-109, 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20brucelose/Manual%20do%20PNCEBT%20-%20Original.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2015.
- _____. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** – **RIISPOA**. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf> Acesso em: 24 de junho de 2015.
- _____. **Portal da Saúde SUS. Situação epidemiológica- Dados**. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/setembro/24/Casos-ovostuberculose-1990-2014-base-jun-2015.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2015.
- BREES, S.B., et al. Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p. 60-63, 2000. Disponível em: <vdi.sagepub.com/content/12/1/60.full.pdf>. Acesso em 01 mar.2016.

BROSCH, R., et al. 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC122584/>>. Acesso em: 08 de jun. 2015.

CASSIDY, J. P. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 151-161, 2006. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113505003895> Acesso em: 01 de jun. 2015

CASSIDY, J. P., et al. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated Calves. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 321-337, 1999. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/12/1/60.full.pdf>>. Acesso em: 08 de jun. 2015

CICERO, R.; et al. Frequency of *Mycobacterium bovis* as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV-positive and -negative Mexican patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 455–460, 2009.

COLLINS, D. M., et al. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 83-94, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113594900485>>. Acesso em: 08 de jun. 2015.

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

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2ed. Rio de Janeiro: Medse, 1992.

COSIVI, O., et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Disease**, v. 4, p. 59–70, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627667/pdf/9452399.pdf>>. Acesso em: 01 de jun. 2015.

COSTA, L. B. **Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia**. 2012, 121f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Salvador – BA, 2012. Disponível em :< <http://www.mevtropical.ufba.br/costalb/>>. Acesso em: 01 jun. 2015

COSTA, P.; et al. Enhanced Detection of Tuberculous Mycobacteria in Animal Tissues Using a Semi-Nested Probe-Based Real- Time PCR. **Plos One**, v. 11, n. 8, p. e81337, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836791/>>. Acesso em 01 jun. 2015.

DANNENBERG, A. M. Rabbit model of tuberculosis. In: BLOOM, B. R. **Tuberculosis, Pathogenesis, Protection and Control**. Washington: ASM Press, 1994.

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, n. 2, p. 77–109, 2006.

DUNGWORTH, D. L. The respiratory system. In: JUBB, K. V. F. **Pathology of domestic animals**. London: Kennedy and N.C. Palmer, Academic Press, 1995.

FURLANETTO, L. V., et al. Uso de métodos complementares na inspeção post mortem de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n. 11, p. 1138-1144, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100011>>. Acesso em: 01 jun. 2015.

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

GIL, J. I. **Manual de Inspeção Sanitária de Carnes**. 2ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulberkian, 2000.

GOOD, M.; DUIGNAN, A. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p.1-11, 2011. Disponível em: < <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/410470/>>. Acesso em: 01 jun. 2015.

GRANGE, J. M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. **Tuberculosis**, v. 81, p. 71-77, 2001.

GRIFFIN, J. M.; DOLAN, L. A. The role of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* in the epidemiology of tuberculosis in cattle in Republic of Ireland: a review. **Irish Veterinary Journal**, v. 48, n. 6, p. 228- 234, 1995.

HEINEMANN, M. B., et al. Tuberculose bovina: introdução à etiologia, cadeia epidemiológica, patogenia e sinais clínicos. **Cadernos Técnicos da Veterinária e Zootécnia**, n. 59, p. 1-12, 2008.

HOPE, J. C., et al. Dendritic cells induce CD4 (+) and CD8 (+) T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and *M. avium* antigens in Bacille Calmette Guerin vaccinated and non-vaccinated cattle. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 52, p. 285–291, 2000.

INGRAM, P. R., et al. Zoonotic tuberculosis: on the decline. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 34, n. 3, p. 339– 341, 2010.

JONES, T. C. **Patologia Veterinária**. 6ed.: São Paulo: Editora Manole LTDA, 2000.

JORGE, K.S.G. **Aplicação de testes específicos e presuntivos para o diagnóstico da tuberculose bovina no estado de Mato Grosso do Sul**. 2001. 73f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS, 2001.

JÚNIOR, M. E. K.; SOUSA, C. L. M. Considerações sobre a tuberculose bovina no norte Fluminense e no município de Campos dos Goytacazes após o advento do PNCEBT - Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. **Perspectivas online**, v. 2, n. 8, 2008.

KANDUMA, E.; MCHUGH, T. D.; GILLESPIE, S. H. A review molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user's guide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 781-791, 2003.

LAGE, A. P., et al. **Atualização em tuberculose bovina**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998.

LIMA, M. F. C., et al. Análise das alterações anatomopatológicas durante a inspeção *post mortem* em bovinos no abatedouro frigorífico industrial de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v. 17, n. 2, p. 113-116, 2007. Disponível em: < <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Comunicacao2.2007.2.pdf>>. Acesso em : 01 jun.2015.

LOBUE, P. A. ENARSON, D. A.; THOEN, C. O. Tuberculosis in humans and animals: an overview. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 9, p. 1075–1078, 2010.

LOPES FILHO, P. R. **Perfil Epidemiológico da Tuberculose Bovina No Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, 2004 a 2008**. 2010. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Minas Gerais – MG, 2010.

MADIGAN, M. T, et al. **Microbiologia de Brock**. 12ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARINO, P. C., et al. Causas de condenações de pulmões de bovinos em matadouros-frigoríficos no estado do Paraná. **Anais...** Curitiba –PR, PIBIC/CNPq, 16, 2007.

MCCORRY, T., et al. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle experimentally infected with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. **Veterinary Record**, v. 157, p. 613–618, 2005.

MEIKLE, V., et al. Individual animals of a cattle herd infected with the same *Mycobacterium bovis* genotype shows important variations in bacteriological, histopathological and immune response parameters. **Zoonoses Public Health**, v. 54, p. 86–93, 2007.

MENZIES, D. Effect of Treatment on Contagiousness of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 8, p. 582– 586, 1997.

MONAGHAN, M, et al. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n.1-2, p. 111– 124, 1994.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

NEILL, S. D., et al. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 41-52, 1994. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113594900450>>. Acesso em: 01 jun. 2015.

O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v. 76, p. 1- 46, 1995. Disponível em: < www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579326 >. Acesso em: 05 jun. 2015.

OIE. **World Organisation for Animal Health**. Terrestrial Animal Health Code. 2012. Disponível em: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>>. Acesso em 05 ago. 2015.

Organização Mundial da Saúde - OMS. **Administração da OMS**. Disponível em: <http://www.who.int/governance/en/> >. Acesso em: 17 ago. 2015.

ORME, I. M. The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis. **Trends Microbiology**, v. 6 p. 94-97, 1998. Disponível em: < [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966-842X\(98\)01209-8](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966-842X(98)01209-8)>. Acesso em 08 ago. 2015>.

PAOLI, T. M. P. **Avaliação de risco relativo para Tuberculose Bovina em municípios do Estado do Espírito Santo a partir de dados de matadouros**. Alegre, 2013, 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo- ES, 2013. Disponível em: < http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_6708_TALITA%20PAOLI20140326-101818.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2016.

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. Editora FEPMVZ, Belo Horizonte, 2001.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888–1988: conquest and controversy. **Journal Comparative Pathology**, v. 99, p. 357–399, 1988. Disponível em : < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021997588900588>>. Acesso em: 01 jun 2015.

RAJI, M. A.; SALAMI, S. O.; AMEH, J. A. Pathological conditions and lesions observed in slaughtered cattle in Zaria abattoir. **Journal of Clinical Pathology and Forensic Medicine**, v. 1, n. 2, p. 9-12, 2010. Disponível em:

<<http://www.academicjournals.org/journal/JCPFM/article-full-text-pdf/C1A66801561>>. Acesso em: 01 mar.2016.

REBHUN, W. C. **Doenças do gado leiteiro**. 1^aed. São Paulo: Roca, 2000.

RIBEIRO, D. C. **Comparação de protocolos de extração de DNA para detecção de *Mycobacterium bovis* através da PCR em órgãos bovinos**. São Paulo, 2006. 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-07032007-115429/pt-br.php>>. Acesso em: 01 jun.2015.

RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2ed. Varela Editor e Livraria LTDA, 2001.

RIET-CORREA, F., et al. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007.

RORING, S., et al. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2126–2133, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037076>>. Acesso em: 01 jun.2015

ROSEMBERG, J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v.7, n. 2, p. 5-29. 1999.

ROSENBERGER, G. Enfermidades de los Bovinos. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sul S.A, 1993.

ROXO, E. Tuberculose bovina: Revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 63, n. 2, p. 91-97, 1996.

RUGGIERO, A. P., et al. Tuberculose Bovina: Alternativas para o Diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007. Disponível em? http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_1/ruggiero.pdf> Acesso em: 01 jun.2015.

SAUNDERS, B. M.; COOPER, A. M. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. **Immunology Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 334-41, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10947857>>. Acesso em 01 jun.2015.

SCANLAR, C. M. **Introduction to veterinary bacteriology**. Ame: Iowa State University Press, 1988.

SCHOENBAUM, M. A.; ESPE, B. H.; BEHRING, B. Epidemic of bovine tuberculosis cases originating from an infected beef herd in Oklahoma, USA. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 13, n. 2, p. 113–120, 1992. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016758779290095W>>. Acesso em: 01 jun. 2015.

SHITAYE, J. E; et al. A prevalence study of bovine tuberculosis by using abattoir meat inspection and tuberculin skin testing data, histopathological and IS6110 PCR examination of tissues with tuberculous lesions in cattle in Ethiopia. **Veterinary Medicine**, v. 51, n. 11, p. 512-522, 2006. Disponível em:< vri.cz/docs/vetmed/51-11-512.pdf>. Acesso em? 01 jun. 2015.

SILVA, M. C.; MOURA, M. S.; REIS, D. O. A importância da histopatologia para a inspeção federal na confirmação de lesões pulmonares suspeitas de tuberculose em bovinos abatidos. **PUBVET**, v. 5, n. 8, p. 1047, 2011.

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

SKUCE, R. A.; ALLEN, A. R.; MCDOWELL, S. W. Herd-Level Risk factors for bovine Tuberculosis: A Literature Review. **Veterinary Medicine International**, v. 2012, n. 10, 2012. Disponível em:<www.hindawi.com/journals/vmi/2012/621210/>. Acesso em 01 jun.2015.

SOUZA, A. V., et al. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene Alimentar**, v. 13, n.59, p. 22-27, 1999.

SOUZA, R. F. P., et al. Caracterização histomorfológica de lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose ganglionar e pulmonar em bovinos abatidos na Região Noroeste do Estado de São Paulo. **Ciências Agrárias e da Saúde**, v. 9, p. 23-25, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª edição: São Paulo. Artmed Editora S.A., 1998.

TWEDDLE, N. E.; LIVINGSTONE, P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. **Veterinary Microbiology**, n. 40, v. 1-2, p. 23-39, 1994. Disponível em< www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8073626>. Acesso em 01 jun. 2015.

USDA - APHIS. Bovine tuberculosis eradication: Uniform methods and rules, effective, United States Department of Agriculture. **Animal and Plant Health Inspection Service**, 2005. Disponível em:< https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/tuberculosis/downloads/tb-umr.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2015.

VARELLO, K., et al. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnsotic Investigation**, v. 1. p. 26-30, 2008.

6. ARTIGO CIENTÍFICO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EM BOVINOS DO AGRESTE PERNAMBUCANO, NORDESTE DO BRASIL

(Artigo a ser submetido na Revista Semina: Ciências Agrárias)

Isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis* em bovinos do Agreste pernambucano, Nordeste do Brasil

Isolation and identification of *Mycobacterium bovis* in cattle Agreste of Pernambuco, Northeastern Brazil

Resumo

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), incluindo *M. bovis*. A inspeção sanitária em matadouros frigoríficos possui grande importância para a saúde pública ao retirar do consumo carnes contaminadas e portadoras de lesões anatomopatológicas. Foi realizada a avaliação macroscópica, histológica, bacteriológica e molecular em bovinos abatidos no matadouro público de Garanhuns – PE. Através da inspeção de pulmão foram avaliadas lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. A caracterização de granulomas tuberculoides foi realizada através da histopatologia e coloração de HE. A identificação de BAAR foi realizada em esfregaços com material fresco e em cortes histológicos sob a coloração de Ziehl-Neelsen. O diagnóstico bacteriológico foi realizado em meio de cultivo Stonebrink e Lowenstein-Jensen e a PCR foi realizada a partir de DNA extraído de colônias, utilizando m-PCR e PCR para identificação do *Mycobacterium* sp.; Complexo *M. tuberculosis* e *M. bovis*, respectivamente. Na macroscopia 1% (32/3.180) dos pulmões coletados apresentaram lesões sugestivas de tuberculose. Na análise histopatológica 65,62% (21/32) amostras tinham granulomas tuberculoides. Houve presença de BAAR em 46,88% (15/32) esfregaços e 4,76% (1/21) em corte histológico pelo ZN. Na bacteriologia em 68,75% (22/32) amostras houve crescimento bacteriano. Na identificação molecular 90% (18/20) amostras amplificaram para *M. bovis* e 10% (2/20) amostras amplificaram para *Mycobacterium* sp. A cultura microbiológica e a PCR proporcionam um diagnóstico de um alto índice de tuberculose bovina na região, sendo necessária a divulgação desses resultados devido à importância da doença para saúde pública. A partir dos resultados, enfatizamos a necessidade de uma avaliação macroscópica acurada no descarte de lesões sugestivas de tuberculose.

Palavras-chave: Granuloma tuberculoide, pneumonia, saúde pública

Abstract

Tuberculosis is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex members (CMT), including *M. bovis*. The sanitary inspection in slaughterhouses has great importance for public health while removing contaminated meat consumption and carriers of pathological lesions. PE - evaluation macroscopic, histological, bacteriological and molecular in cattle slaughtered in the abattoir of Garanhuns was held. Through lung inspection gross lesions suggestive of tuberculosis were evaluated. The characterization of tuberculous granulomas was performed by histopathology and HE staining. The identification of AFB was performed on smears with fresh material and histological staining under Ziehl-Neelsen. Bacteriological diagnosis was made amid Stonebrink cultivation and Lowenstein-Jensen and the

PCR was performed from DNA extracted from colonies using m-PCR and PCR for identification of *Mycobacterium* sp.; Complex *M. tuberculosis* and *M. bovis* respectively. Macroscopically 1% (32 / 3,180) of the collected lungs showed suggestive of tuberculosis lesions. Histopathology of 65.62% (21/32) samples had tuberculous granulomas. There was presence of AFB in 46.88% (15/32) smears and 4.76% (1/21) in histological sections by ZN. In bacteriology in 68.75% (22/32) samples were bacterial growth. In the molecular identification 90% (18/20) amplified samples for *M. bovis* and 10% (2/20) amplified samples for *Mycobacterium* sp. The microbiological culture and PCR provide a diagnosis of a high bovine tuberculosis rate in the region, requiring the disclosure of results due to the importance of the disease to public health. From the results, we emphasize the need for an accurate macroscopic evaluation on disposal suggestive of tuberculosis lesions.

Keywords: Tuberculous granuloma, pneumonia, public health

Introdução

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), incluindo *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* e *M. canettii*. (BROSCH et al., 2002) Embora *M. bovis* seja o agente mais comum da tuberculose em bovinos, outras espécies do CMT também têm sido detectadas, incluindo *M. tuberculosis*, *M. caprae* e *M. africanum* (SAHRAOUI et al., 2011).

A enfermidade nos bovinos apresenta evolução crônica e é caracterizada por lesões granulomatosas localizadas predominantemente no trato respiratório e linfonodos traqueobrônquicos associados, com infiltrados de células mononucleares, como macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas (NEILL et al., 1994).

A inspeção sanitária em matadouros frigoríficos possui grande importância para a saúde pública ao retirar do consumo, carnes contaminadas por patógenos, bem como aquelas portadoras de lesões anatomopatológicas sugestivas da doença (REIS, 2000).

Atualmente, a detecção de micobactérias em tecidos animais baseia-se principalmente em métodos convencionais e complexos, envolvendo o exame de Ziehl-Neelsen por esfregaço, histopatologia e cultura em meios seletivos, seguido de identificação bioquímica ou molecular de colônias de micobactérias típicas.

A cultura continua é o método padrão-ouro para confirmar a infecção. A maioria das abordagens moleculares é baseada em PCR e polimorfismos alvo específicas, sequências de inserção, e as chamadas regiões de diferença no genoma de membros de *Mycobacterium* sp. (REDDINGTON et al., 2012).

Para os países em desenvolvimento com um grande número de casos e restrições financeiras, métodos diagnósticos baratos e rápidos, como a identificação de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) pelo método de Ziehl-Neelsen tem grande importância. Entretanto, testes laboratoriais mais sensíveis para a detecção direta em amostras biológicas sugestivas estão em alta demanda, tanto para a saúde humana e animal, propiciando maior eficácia no controle da tuberculose (LAIFANGBAM et al., 2009).

Neste contexto, tornam-se necessários estudos que identifiquem lesões tuberculosas nos matadouros frigoríficos, dando ênfase aos órgãos mais acometidos e à procedência dos animais, para que haja maior controle da enfermidade no país, adequando-se às exigências sanitárias do mercado internacional de produtos de origem animal, além da importância do controle desta enfermidade no âmbito da saúde pública (SILVA et al., 2014). Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar *Mycobacterium* sp. em amostras de lesões pulmonares sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no Agreste de Pernambuco, Nordeste do Brasil, bem como conduzir uma avaliação macroscópica e microscópica das lesões.

Material e Métodos

A pesquisa foi realizada no matadouro público de Garanhuns, Agreste de Pernambuco, durante o período de janeiro de 2014 a julho de 2015. Foram coletados os fragmentos de pulmões que apresentavam lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose na inspeção sanitária de acordo com os métodos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura e segundo o Manual de Padronização de Técnicas, Instalações e Equipamentos para Inspeção de Carnes de Bovinos (BRASIL, 2013). Além de Garanhuns, foram abatidos animais de municípios circunvizinhos, como Brejão, Correntes, Lajedo e Lagoa do Ouro.

As amostras foram divididas em três partes. Uma parte foi refrigerada para avaliação através da coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) por esfregaço direto e, para identificação do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), realizado segundo Alzamora-Filho et al. (2012). A segunda parte da amostra foi acondicionada em formol a 10% tamponado para análise histopatológica pela técnica de coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e coloração de Ziehl-Neelsen Fite (ZNF) utilizando o Histokit Fite Ziehl-Neelsen para cortes histológicos, a partir das lesões sugestivas pelo HE, juntamente com controle positivo de paratuberculose bovina, para constatar a presença de BAAR. Os fragmentos de pulmões foram fixados em parafina e cortados a uma espessura de quatro micrômetros para confecção da lâmina. A terceira parte da amostra foi congelada para realização de cultura bacteriológica e a partir desta foi realizado a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na cultura bacteriológica as amostras foram descontaminadas pelo método de 1-*Hexadecylpyridinium chloride* (HPC) (AMBRÓSIO et al., 2008) e inoculadas em duplicata nos meios de Stonebrink e Lowenstein-Jensen, com posterior incubação a 37° C durante 90 dias. Colônias sugestivas de micobactérias foram extraídas para preparação de lâmina para coloração de Ziehl-Neelsen e extração de DNA. O DNA foi extraído por meio de termólise (MAZARS et al., 2001). Foram submetidas à identificação molecular apenas amostras com presença de BAAR na coloração de Ziehl-Neelsen.

A identificação de *Mycobacterium* sp. e Complexo *M. tuberculosis* foi realizada por meio de TB Multiplex PCR tendo como alvos primers para o gênero *Mycobacterium*, *Mycobacterium intracellulare* (MYCINT29 F), complexo *Mycobacterium avium* (MYCAV-R), e complexo *Mycobacterium tuberculosis* (TB-1A e TB-1B). Foram utilizadas como controles positivos estirpe AN5 para *M. bovis* e estirpe H37Rv para *M. tuberculosis*. Amostras com amplificação de 1030bp identificadas como gênero *Mycobacterium* e amostras com fragmentos menores de 850, 372 e 180bp foram identificadas como *M. intracellulare*, complexo *M. tuberculosis* e *M. avium*, respectivamente (WILTON; COUSINS, 1992). A PCR que

possibilitou tais amplificações foi composta por 20µl de água ultra pura, 2,5µl do Buffer, 1,25Mm de DNTPs, 50 mM de Mgcl₂, 10 pmol µL⁻¹ de cada primer, 1,25U de Taq DNA-polimerase e 2,5µl de DNA genômico.

Com relação à identificação do *M. bovis*, todas as amostras de DNA com amplificação consistente para complexo *M. tuberculosis* pelo TB Multiplex PCR foram amplificadas com os primers RD-4 para identificação de *M. bovis*. Foram utilizados como controles positivos estirpe AN5 para *M. bovis* e estirpe H37Rv para *M. tuberculosis*. Produtos amplificados com 268 bp foram identificados como *M. bovis* e produtos amplificados com 172 bp como outras micobactérias do complexo *M. tuberculosis* (WARREN et al., 2006). A PCR que possibilitou tais amplificações foi composta por 11,375µl de água ultra pura, 2,5µl do Buffer, 1,25Mm de DNTPs, 50 mM de Mgcl₂, 10 pmol µL⁻¹ de cada primer, 1,25U de Taq DNA-polimerase e 2 µl de DNA genômico.

126

127 Resultados

128

Durante o período de estudo, foram inspecionados 3.180 pulmões de bovinos e destes 32 animais 1% (32/3.180) apresentavam lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. No exame macroscópico das lesões pulmonares foram constatadas áreas mais elevadas, sendo mais perceptíveis em regiões próximas às bordas dos lobos caudais. Esses nódulos eram firmes, focais a multifocais, variando de 0,5 a 2 cm de diâmetro. As nodulações em sua grande maioria eram constituídas por uma massa amorfa repleta de material caseoso branco-amarelado, que por vezes, rangia ao corte devido à instalação do processo de calcificação.

Em dois animais (6,25%) estes nódulos estavam disseminados por toda a cavidade torácica e abdominal, e o fígado apresentava diversos nódulos na superfície capsular e que se aprofundavam ao corte pelo parênquima.

Após avaliação do exame histopatológico das 32 amostras foram verificadas as alterações microscópicas, que permitiram sua classificação como granulomas tuberculóides, abscessos pulmonares, broncopneumonia supurativa, enfisema pulmonar e pneumonia intersticial. O número e percentual das lesões pulmonares observadas no exame histopatológico estão descritos na Tabela 1.

Os granulomas tuberculoides foram caracterizados microscopicamente por granulomas multifocais, com áreas de necrose caseosa e calcificação distrófica na região central dos nódulos circundadas por reação inflamatória composta, principalmente, por macrófagos epitelioides, células gigantes multinucleadas do tipo Langhans, linfócitos, alguns plasmócitos e raros neutrófilos associados a pouca proliferação de tecido conjuntivo.

Com relação à baciloscopia, os dados referentes ao exame de coloração por Ziehl-Neelsen pelo esfregaço direto do tecido e método Ziehl-Neelsen Fite de corte histológico, confirmou-se a presença de BAAR isolados ou em aglomerados no esfregaço em 46,88% (15/32) das amostras. Em 53,12% (17/32) das amostras nenhum bacilo foi visualizado. Em 4,16% (1/24) amostra foi encontrada BAAR em sua maioria livres em macrófagos e em área de necrose no corte histológico. Em relação à bacteriologia, houve isolamento bacteriano em 22 (68,75%) amostras.

No diagnóstico molecular, a partir da cultura microbiológica foram amplificados em total de 91% (20/22), sendo que destes positivos 90% (18/20) das amostras foram identificadas como sendo *M. bovis*, e 10% (2/20) amostras como pertencentes ao gênero *Mycobacterium* sp. Entretanto 9,1% (2/22) amostras positivas na cultura foram negativas na PCR.

Discussão

De acordo com Jorge (2010), a maioria das lesões foi encontrada na região torácica, assim como no presente estudo. Nos bovinos, em investigações a campo, a maioria das lesões é encontrada no trato respiratório inferior, superior e gânglios linfáticos regionais, considerando nesta espécie, a inalação de gotículas contaminadas através da tosse ou secreção nasal de um animal com tuberculose pulmonar ativa é a via mais provável de infecção (NEILL et al., 1994). Com relação à distribuição os achados são compatíveis com Costa et al. (2013), que obteve lesões nodulares de distribuição focal, multifocal ou difusa.

Para que um granuloma seja macroscopicamente visível, pode levar semanas ou meses, e esses pequenos focos são os tubérculos e constituem as alterações macroscópicas iniciais (MCGAVIN; ZACHARY, 2009). Com a progressão da doença, estes tubérculos formam grandes áreas de necrose caseosa, sendo típica a calcificação posterior do granuloma (FRANÇA et al., 2013). Silva et al. (2014) observaram que em 100 carcaças com lesões morfológicas sugestivas de tuberculose 85% foram classificadas como caseosas e 15% calcificadas, corroborando os resultados do presente trabalho, que demonstrou macroscopia das lesões de aspecto caseoso, por vezes rangendo ao corte (calcificação).

O granuloma tuberculoide é caracterizado por acúmulo de células inflamatórias com predomínio de macrófagos, macrófagos epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos além de necrose central com mineralização (CASSIDY, 2006). No presente estudo, essas características foram observadas e também foram similares às descritas em bovinos inoculados experimentalmente por *M. bovis* (POLLOCK et al., 2006) e em bovinos naturalmente infectados (MEDEIROS et al., 2012).

Alguns neutrófilos também foram visualizados em uma amostra, concordando com os achados de Charro e Osório (2009). Neutrófilos podem estar presentes na fase inicial dos granulomas, normalmente sendo substituídos por macrófagos; essas células podem também ser encontradas degeneradas na forma isolada ou em grupos próximos à região necrótica (CASSIDY et al., 1999).

Dentre os diagnósticos diferenciais citados na literatura foram observados abscessos (CAVAZANNI, 2009) que tem etiologia principalmente bacteriana como, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp, *Pasteurella* spp, *Acinetobacter* spp, e *Pseudomonas* sp (FERNANDES et al., 2000) e broncopneumonias causadas por agentes como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp., *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Alcaligenes* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. (GONÇALVES, 2001). O enfisema e a pneumonia intersticial não são lesões consideradas diagnósticos diferenciais comuns da tuberculose na inspeção em pulmão. O enfisema pulmonar pode ser atribuído principalmente ao manejo inadequado dos animais no ato da insensibilização, comprometendo a eficiência da prática e da sangria, ou até mesmo secundário a uma pneumonia intersticial, sendo indicado pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o seu descarte (BAPTISTA, 2008).

Os dados encontrados neste estudo para identificação de BAAR no esfregaço demonstram um dado elevado quando comparado à variação na frequência de ZN em diferentes estudos: 17,9% (VARELLO et al., 2008) e 36,8% (LAISSE et al., 2011). Achados semelhantes da localização de BAAR em corte histológico, foram descritos em bovinos (FRANÇA et al., 2013) e em caprinos (SEVA et al., 2002) presentes em células gigantes ou em áreas de necrose. O escasso número de bactérias na lesão em cortes histológicos ou esfregaços diretos pode determinar a não observação destes bacilos (ANDRADE et al., 1991), característica observada neste artigo onde foi identificada apenas uma lesão com bacilos no corte histológico. E a baixa quantidade ou ausência de bactérias na lesão ocorre pelo estágio de progressão da reação de hipersensibilidade tardia, quando há desenvolvimento de necrose de caseificação central, fibrose periférica, evoluindo para resolução e calcificação. Com a membrana bacteriana íntegra as características tintoriais se mantêm, com a ruptura da mesma, desaparece a característica álcool-ácido-resistente. (PALMER et al., 2012).

A taxa de isolamento de BAAR, nesta pesquisa possuiu dados mais elevados, quando comparados a estudos anteriores realizados, 23,6% (17/72) (ARAÚJO et al., 2005) e 48,1% (89/185) (PARRERAS et al., 2012) a cultura nestes estudos citados foi o teste mais sensível. Números semelhantes, entretanto ao estudo realizado em rebanho leiteiro de Tatuí, SP, que mostrou 60% (18/30) das amostras positivas na cultura (NASSAR et al., 2007).

Dentre as ampliações a partir dos isolados, 10% (2/20) identificaram *Mycobacterium* sp. Cazola et al. (2015), após isolarem um total de 13 amostras, três amostras foram identificados no PCR apenas como gênero *Mycobacterium* sp. O possível isolamento concomitante de micobactérias atípicas, cujo crescimento costuma ser rápido e abundante, pode ter inibido o crescimento de colônias de *M. bovis*, que é lento e escasso (CORNER, 1994). Diante destes resultados com o aumento do número de pessoas imunossuprimidas, principalmente pela infecção do HIV, existe uma maior preocupação em relação à infecção humana não só pelo *M. tuberculosis* (SALES, 2012).

Duas amostras foram negativas no PCR mesmo com colônias sugestivas no cultivo. Fatores como concentração de DNA na reação, variabilidade genética, além de possíveis inibidores da PCR ou possíveis falhas na execução da reação (MICHEL et al., 2010), podem justificar estes achados.

O Ministério da Agricultura pretende erradicar a tuberculose bovina e o índice oficial de prevalência da tuberculose nessa espécie está muito defasado, havendo a necessidade de novos dados oficiais. Além disso, como o diagnóstico padrão-ouro é demorado chegando há 40 dias, e a doença é difundida mais facilmente entre portadores de HIV, estes muitas vezes, não tem a possibilidade de esperar um tempo tão longo para a obtenção de um resultado (CORRÊA, 2011). Salientando que a combinação de análises laboratoriais e inspeção é útil para aumentar a detecção da presença de *Mycobacterium* sendo uma importante ferramenta de vigilância e controle desta zoonose (SOUZA, 2013).

Conclusões

A cultura microbiológica e a PCR proporcionaram um diagnóstico confirmatório de um alto índice de tuberculose bovina na região, sendo necessária a divulgação dos resultados para conscientização da população, sobre o impacto da doença dentro da sociedade devido ao seu caráter zoonótico.

229 Devido à variabilidade das lesões sugestivas de tuberculose em diferentes estágios e diagnósticos
 230 diferenciais, salientamos a importância de uma avaliação macroscópica minuciosa, já que há uma restrição
 231 do Médico Veterinário apenas ao exame macroscópico do órgão para o descarte na sala de abate, evitando as
 232 perdas econômicas causadas pela condenação equivocada da carcaça.

233

234 **Agradecimentos**

235 Nós agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq pelo
 236 financiamento da bolsa durante a execução do projeto e ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFCG-
 237 Campus Patos-PB.

238

239 **Referências Bibliográficas**

240

241 ALZAMORA FILHO, F; REI, V. M.; FEHLBERG, I.; DE ALCÂNTARA, A. C.; CAVALCANTE, M. P.;
 242 ROCHA, V.C.F.; COSTA, J. N. Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no
 243 estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária
 244 e Zootecnia, Minas Gerais, v.5, n. 66, p. 1585-1591, 2014.

245 AMBRÓSIO, S. R; OLIVEIRA, E. M. D; RODRIGUEZ, C. A. R; FERREIRA NETO, J. R; AMAKU, M.
 246 Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Brazilian Journal of*
 247 *Microbiology*, São Paulo, v.2, n.39, p.241–244, 2008.

248 ANDRADE, G. B.; RIET-CORREA, F.; MIELKE, P. V.; MÉNDEZ, M. D. C.; SCHILD, A. L. Estudo
 249 histológico e isolamento de micobactérias de lesões similares à tuberculose em bovinos no Rio Grande do
 250 Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.11, n.3/4, p.81-86, 1991.

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

254 BAPTISTA, A.T. Quantificações das condenações em vísceras de bovinos em 2007 nos matadouros-
 255 frigoríficos do estado do Espírito Santo registrados no serviço de inspeção estadual. 2008. (Monografia de
 256 Graduação). Universidade Castelo Branco, Vitória- ES. 22f.

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

260 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e
 261 Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. 2013. Disponível em:
 262 http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf
 263 Acesso em: 24 jun. 2015.

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

269 CASSIDY, J. P. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of
 270 tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary Microbiology*, Geneva, 112, p.151-161,
 271 2006.

- 272 CASSIDY, J. P.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M.; EVANS, R. T.; FORSTER, F.; NEILL, S. D. Lesions
273 in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated Calves. *Journal of Comparative Pathology*, v.121,
274 p.321-337, 1999.
- 275 CAZOLA, D.O.; JORGE, K. S. G.; ZUMÁRRAGA, M. J.; SOUZA-FILHO, A. F.; ARAÚJO, F. R.;
276 OSÓRIO, ALAR. Identificação e genotipagem de *Mycobacterium bovis* em bovinos positivos no teste
277 intradérmico para tuberculose em Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.2,
278 n.35, p.141-147, 2015.
- 279 CHARRO, F. D. ; OSÓRIO, A. L. A. R. Diagnóstico da tuberculose bovina por meio de histopatologia
280 Campo Grande, 2009. Disponível em: <
281 <http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=429>>. Acesso em 05 dez. 2015.
- 282 CORNER, L. A. *Post-mortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. Veterinary*
283 *Microbiology*, v. 40, p. 53–63, 1994.
- 284 COSTA, P.; FERREIRA, A. S.; AMARO, A.; ALBUQUERQUE, T.; BOTELHO, A.; COUTO, I. ;
285 CUNHA, M.V.; VIVEIROS, M. Enhanced Detection of Tuberculous Mycobacteria in Animal Tissues Using
286 a Semi-Nested Probe-Based Real- Time PCR *Plos One*, Lisboa, v.11, n. 8, p. e81337, 2013.
287
- 288 CORRÊA, F. A. F. Formas de Diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*. 2011.
289 (Disciplina de Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 40f
- 290 ENRÍQUEZ-CRUZ, C.; CRUZ-HERNÁNDEZ, N. I.; ZERTUCHE-RODRÍGUEZ, J. L.; URIEGAS-
291 GARCÍA, J. L.; TOSCANO-RUIZ, J. E.; FLORES-GUTIÉRREZ, G. H. Epidemiology of bovine
292 tuberculosis in Mexico, bordering the United States, at establishment of controlling strategies. *Arquivo*
293 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.5, n. 62, p.1029-1035, 2010.
- 294 FERNANDES, C. G; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F; BAIALARDI, C. E. G; STIGGER, A. L. Pituitary
295 abscess in young calves associated with the use of a controlled suckling device. *Journal of Veterinary*
296 *Diagnostic Investigation*, Visalia, v.12, p.70-71, 2000
- 297 FRANÇA, L. R.; CRUZ, J. F.; NEVES, V. B.; CERQUEIRA, R. B. Prevalência e histopatologia de lesões
298 sugestivas de tuberculose em carcaça de bovinos abatidos no Sudoeste da Bahia. *Revista Brasileira de Saúde*
299 *Produção Animal*, Salvador, v.4, n. 14, p.721-733, 2013.
- 300 GONÇALVES R. C., KUCHEMBUCK, M. R. G., CURI , P. R., CHIACCHIO , S. B., ALMEIDA , C. T.,
301 BORGES , A. S. Diferenciação clínica da broncopneumonia moderada e grave em bezerros. *Ciência Rural*,
302 Santa Maria, v.31, n.2, p.263-269, 2001.
- 303 JORGE, K. S. G. *Identificação de Mycobacterium Bovis em Bovinos e sua Importância na Ocorrência de*
304 *Tuberculose Zoonótica*. 2010. (Tese de Doutorado): Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo
305 Grande, 97p.
- 306 LAIFANGBAM, S.; SINGH, H. L.; SINGH, N. B.; DEVI, K. M.; SINGH, N. T. A comparative study of
307 fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis.
308 *Kathmandu University Medical Journal*, Kathmandu, v.3, n.7, p. 226-230, 2009.
- 309 LAISSE, C.J.M.; GAVIER-WIDÉN, D.; RAMIS, G.; BILA, C.G.; MACHADO, A.; QUEREDA, J.J.;
310 AGREN, E.O.; HELDEN, P.D. Characterization of tuberculous lesions in naturally infected African buffalo
311 (*Syncerus caffer*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Visalia, v.23, n.5, p.1022-1027, 2011
- 312 MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. Elsevier : St Louis,
313 2009, p.1476.

- 314 MEDEIROS, L. S., MARASSI, C. D., FIGUEIREDO, E.E.S, LEITE, J., FERREIRA, A. M. R.,
 315 LILENBAUM, W. Assessing the histopathology to depict the different stages of bovine tuberculosis
 316 infection in a naturally infected herd. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.2, n.32, p.135 – 139,
 317 2012.
- 318 MICHEL, A. L.; MULLER, B.; VAN HELDEN, P. D. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface:
 319 a problem, or not? *Veterinary Microbiology*, Geneva, v.140, n.3/4, p.371-378, 2010.
- 320 NASSAR, A. F.; MIYASHIRO, S; OLIVEIRA, C. G.; PACHECO, W. A.; OGATA, R. A . Isolation and
 321 identification of bovine tuberculosis in a Brazilian herd (Sao Paulo). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*,
 322 Rio de Janeiro, v.5, n.102, p. 639-42, 2007.
- 323 NEILL , S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON , D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*
 324 infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, Geneva, v.40, n.1/2, p.41-52, 1994.
- 325 PALMER, M. V; THACKER, T. C; RAYWATERS, R; GORTAZAR, C.; CORNER, L. A. L.
 326 *Mycobacterium bovis*: A Model Pathogen at the Interface of livestock, Wildlife, and Humans. *Veterinary*
 327 *Medicine International*, Cairo, v.2012, 2012.
- 328 PARREIRAS, P. M.; ANDRADE, G. I.; NASCIMENTO, T. F.; OELEMANN, M. C.; GOMES, H. M.;
 329 ALENCAR, A. P.; ASSIS, R. A.; MOTA, P. M. P. C.; PEREIRA, M. A. S.; LOBATO, F. C. F.; LAGE, A.
 330 P.; SUFFYS, P. N. Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis*
 331 isolates from cattle in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.1, n.107, p.64-73,
 332 2012.
- 333 POLLOCK, J. D; RODGERS, J. D.; WELSH, M. D.; MCNAIR, J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The
 334 role of experimental models of infection. *Veterinary Microbiology*, Geneva, v.112, p.141-150, 2006.
- 335 RADOSTITS, O.M., BLOOD, D.C. e GAY, *Veterinary Medicine*. 8th edition. Baillière Tindall. London.
 336 p.181-182. 1994.
- 337 REDDINGTON, K.; ZUMLA, A; BATES' M.; SOOLINGEN' D.; NIEMANN, D. ; BARRY' T.; O'GRADY,
 338 J. Seek TB, a Two-Stage Multiplex Real-Time-PCR-Based Method for Differentiation of the *Mycobacterium*
 339 tuberculosis Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, Washigton DC, v.2, n.50, p.203– 2206, 2012.
- 340 REIS, D.O. Importância do exame histopatológico para o diagnóstico pós-mortem de bovinos abatidos em
 341 frigorífico de Uberlândia-MG. *Higiene Alimentar*, Mirandópolis, v.78-79, n.11, p.23-27, 2000.
- 342 SAHRAOUI, N.; MÜLLER, B.; GUETARNI, D.; BOULAHBAL, F.; YALA, D.; OUZROUT, R.; BERG,
 343 S.; SMITH, N.H.; ZINSSTAG, J. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from
 344 cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *Veterinary Research*, Alemanha, v. 4, n. 5, p. 1-7, 2009.
- 345 SAKAMOTO, S.M., ASSIS, R.A., ALENCAR, A.P.; MOTA, P. M. P. C.; LAGE, A. P. Métodos auxiliares
 346 de diagnóstico da tuberculose bovina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 59,
 347 p.43-68, 2008.
- 348 SALES, M. L. Identificação de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* por PCR. 2012.
 349 (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 62f.
- 350
- 351 SEVA, J. ; MENCHÉN, V.; NAVARRO, J. A.; PALLARES, F. J. ; VILLAR, D.; VASQUEZ, F.;
 352 BARNABE, A. Caprine tuberculosis eradication program: na immunohistochemical study. *Small Ruminant*
 353 *Research*, Arkansas, v.46, p.107-114, 2002.

- SILVA, D. A. V.; BÜRGER, K. P.; MARTINS, A. M. C. V.; PROVIDELLO, A. Identificação de lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose bovina. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, Fortaleza, v.2, n.8, p.149-160, 2014.
- SOUZA, R. F. P; LUVIZOTTO, M. C. R.; FERNANDES, J. O. M.; FERRARI, H. M. Caracterização Histomorfológica de Lesões Granulomatosas Sugestivas de Tuberculose Ganglionar e Pulmonar em Bovinos Abatidos na Região Noroeste do Estado de São Paulo. *Ciências Agrárias e Saúde*, Andradina, v.9, p.27 – 35, 2013.
- VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Visalia, v.20, p.164-169, 2008.
- WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; BARNARD, M.; HESSELIN, A.; ENGELKE, E.; DE KOCK, M.; GUTIERREZ, M. C.; CHEG, G. K.; VICTOR, T. C.; HOAL E. G.; VAN HELDEN, P. D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Washington, DC, v.7, n.10, p.818-822, 2006.
- WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and Identification of Multiple Mycobacterial Pathogens by DNA Amplification in a Single Tube. *Genome Research*, Washington DC, v.1, p.269-273, 1992.

372

373

Tabela 1. Diagnóstico histopatológico, número de amostras e percentual de lesões pulmonares sugestivas de tuberculose em bovinos abatidos no matadouro público de Garanhuns/PE, durante o período de janeiro de 2014 a julho de 2015.

376

Lesão	Nº de amostras	% de amostras
Granuloma tuberculóide	24	75,0
Abscessos	4	9,37
Broncopneumonia	2	6,25
Enfisema	1	3,13
Pneumonia intersticial	1	3,13
Total	32	100

377

378

379

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que a tuberculose bovina é uma doença presente na região de Garanhuns-PE e municípios circunvizinhos, sendo necessário um projeto de conscientização para a população sobre o impacto da doença dentro sociedade devido a seu caráter zoonótico.

Considera-se de acordo com os resultados obtidos, o Zihel-Neelsen em esfregaço como uma ferramenta adicional na triagem de lesões sugestivas de tuberculose que poderia ser implementado em matadouros frigoríficos. Uma vez que o método é rápido, simples, não oneroso e requer pouca infra-estrutura laboratorial, complementando o exame macroscópico realizado atualmente pelo Médico Veterinário.

8. ANEXO - NORMAS DA REVISTA

DIRETRIZES PARA AUTORES

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.

Os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão Publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente **traduzidos para o inglês**.

Os artigos enviados para a revista até dezembro/2013 que estão em tramitação poderão ser publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na publicação.

Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores:

American Journal Experts

Editage

Elsevier

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

O autor principal deverá anexar no sistema o **documento comprobatório** dessa correção na página de submissão em “**Docs. Sup.**”

OBSERVAÇÕES:

1) Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista; qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados observados; apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número de trabalhos com manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e

de publicação da Semina: Ciências Agrárias, é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o avanço do conhecimento científico. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(es). Os autores cujos artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão. 2) Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome da Comissão, Instituição e nº do Processo).

NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) O arquivo do artigo anexado do trabalho contenha os nomes dos autores e respectiva afiliação; b) Não tenha sido realizado o **cadastro completo** de todos os autores nos metadados de submissão; **Exemplo:** Nome completo; Instituição/Afiliação; País; Resumo da Biografia/Titulação/função c) Não tenha sido incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas;
- d) Não estejam acompanhados de documento comprobatório da taxa de submissão, em documento suplementar “**Docs. Sup.**” no ato da submissão;
- e) Não estejam acompanhados dos seguintes documentos suplementares: gráficos, figuras, fotos e outros, EM VERSÃO ORIGINAL. (Formato JPEG; TIFF; EXCEL)
- f) Não constem no artigo original: título, resumo e palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

RESTRIÇÃO POR ÁREA:

PARA A ÁREA DE AGRONOMIA NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) Os experimentos com cultura in vitro sejam limitados ao melhoramento dos protocolos já padronizados ou que não forneçam novas informações na área;
- b) Os experimentos de campo não incluam dados de pelo menos dois anos ou de várias localidades dentro do mesmo ano;
- c) Os experimentos se refiram apenas a testes sobre a eficiência de produtos comerciais contra agentes bióticos, abióticos ou estresses fisiológicos;
- d) Envolvam apenas bioensaios (screening) de eficácia de métodos de controle de insetos, ácaros ou doenças de plantas, exceto se contiverem contribuição importante sobre mecanismos de ação numa perspectiva de fronteira do conhecimento;
- e) O objetivo seja limitado a registrar a ocorrência de espécies de pragas ou patógenos ou associações entre hospedeiros em novas localidades dentro de regiões geográficas onde eles já sejam conhecidos. Registros de espécies ou associações conhecidas só serão considerados em novas zonas ecológicas. Os registros de distribuição devem se basear em ecossistemas, e não em fronteiras políticas.

PARA A ÁREA DE VETERINÁRIA

- a) A publicação de relatos de casos é restrita e somente serão selecionados para tramitação àqueles de grande relevância ou ineditismo, com real contribuição ao avanço do conhecimento para a área relacionada.

Categorias dos Trabalhos

- a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho.

Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas, com suas respectivas chamadas no texto. Além disso, as figuras devem apresentar boa qualidade e deverão ser anexadas nos seus formatos originais (JPEG, TIF, etc) em “Docs Supl.” na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas fora das seguintes especificações: Figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões.

Observação: Para as tabelas e figuras em qualquer que seja a ilustração, o título deve figurar na parte superior da mesma, seguida de seu número de ordem de ocorrência em algarismo arábico, ponto e o respectivo título.

Indicar a fonte consultada abaixo da tabela ou figura (elemento obrigatório). Utilizar fonte menor (Times New Roman 10).

Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras não forem do autor.

Ex: **Fonte:** IBGE (2014), ou **Source:** IBGE (2014).

Preparação dos manuscritos

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos

devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. **Material e Métodos...** *Áreas de estudo...1. Área rural...2. Área urbana*).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1. Título do trabalho, acompanhado de sua tradução para o inglês.

2. Resumo e Palavras-chave: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

3. Introdução: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

4. Material e Métodos: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

5. Resultados e Discussão: Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.

6. Conclusões: Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

7. Agradecimentos: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos:

- a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.
- c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha⁻¹. Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha.
- d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L⁻¹, e não g.L⁻¹ ou gL⁻¹.
- e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. Citações dos autores no texto

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

- a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que
- b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
- c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
- d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
- e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citações com dois autores

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses. 63

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

Citações com mais de dois autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem espaçamento.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

9. Referências: As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. **Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes.** A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

Observação: Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as referências do artigo. As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

Comunicação científica

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologias completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a sequência - introdução, metodologia, resultados e discussão (podem ser incluídas tabelas e figuras), conclusão e referências bibliográficas.

Relato de caso

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, resultados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agrônomo, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

Artigo de revisão bibliográfica

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os autores somente poderão apresentar artigos de interesse da revista mediante convite de membro(s) do comitê editorial da Revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados relevantes próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

Outras informações importantes

1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "Ad hoc" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.
2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).
4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.
5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.
6. *Numero de autores*: Não há limitação para número de autores, mas deverão fazer parte como co-autores aquelas pessoas que efetivamente participaram do trabalho. Pessoas que tiveram uma pequena participação no artigo deverão ser citadas no tópico de Agradecimentos, bem como instituições que concederam bolsas e recursos financeiros.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas e aos autores informados da decisão.

1. Os autores devem informar que a contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Devem informar ainda que o material está corretamente formatado e que os Documentos Suplementares estão anexados, ESTANDO CIENTE que a **formatação incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO**.
3. **Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no campo Metadados durante o processo de submissão.** Utilize o botão "incluir autor" No passo seguinte preencher os metadados em inglês.

Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "**editar metadados**" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: título em inglês, abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

1. A **identificação de autoria** do trabalho deve ser removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.

2. Os arquivos para submissão devem estar em formato Microsoft Word, Open Office ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

O texto deve estar em folha A4, com linhas numeradas, espaço 1,5; fonte Time New roman de tamanho 11;

1. Atestar que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação pela comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais caso sejam solicitados.

2. **Efetuar o pagamento da Taxa de Submissão de artigos e anexar o comprovante como documento suplementar "Docs. Sup."**

Declaração de Direito Autoral

Os **Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário.

As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros