

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE  
DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

***POST MORTEM*, CITOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E BACTERIOLOGIA  
NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE  
BOVINA – MATADOURO-FRIGORÍFICO DA REGIÃO NORTE DO  
PARANÁ**

WERNER OKANO

Botucatu – SP  
Julho 2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE  
DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

***POST MORTEM*, CITOLOGIA, HISTOPATOLOGIA E BACTERIOLOGIA  
NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE  
BOVINA – MATADOURO-FRIGORÍFICO DA REGIÃO NORTE DO  
PARANÁ**

WERNER OKANO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu – SP  
Julho de 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Okano, Werner.

*Post mortem*, citologia, histopatologia e bacteriologia no diagnóstico da tuberculose bovina – matadouro-frigorífico da Região Norte do Paraná / Werner Okano. – Botucatu [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientadora: Noeme Sousa Rocha

Assunto CAPES: 50505009

1. Bovino - Produção 2. Carne bovina - Inspeção 3. Saúde animal  
4. Tuberculose em animais –Diagnóstico - Estudos experimentais 5. Bovino de corte

CDD 636.20824

Palavras-chave: Citologia; Histopatologia; Microbiologia; *Mycobacterium bovis*; Tuberculose bovina

## COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Nome do autor: OKANO, Werner

TÍTULO: *Pos mortem*, citologia, histopatologia e bacteriologia no diagnóstico da tuberculose bovina - matadouro-frigorífico da região norte do Paraná

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha  
FMVZ – UNESP - Botucatu

---

Prof. Dr. Julio Lopes Sequeira  
FMVZ – UNESP - Botucatu

---

Prof. Dr. Germano Francisco Biondi  
FMVZ – UNESP – Botucatu

---

Profa. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso  
Departamento de Análises Clínicas – UEM

---

Prof. Dr. Antonio Carlos Faria dos Reis  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva -UEL

Botucatu, 31 de julho de 2007.

Dedico este trabalho aos meus familiares  
pelo apoio e estímulos durante esta jornada!

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS pelo sim da vida!

À Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha, minha orientadora e amiga de todas as horas, que acompanhou a evolução deste trabalho sempre com dedicação, paciência e confiança. Minha eterna gratidão!

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu que me receberam tão bem sem me conhecer, repassando seus sábios conhecimentos. Muito obrigado!

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu e à Seção de Pós-Graduação pela oportunidade para a realização do Curso de Doutorado.

Aos funcionários técnicos administrativos da Seção de Pós-Graduação, meu muito obrigado!

À UNOPAR, Universidade Norte do Paraná por estes anos de convívio e por ter propiciado a oportunidade do doutorado, em especial aos coordenadores João Roberto Basile (*in memoriam*) e Agostinho Ludovico. Muito obrigado!

Aos acadêmicos de Medicina Veterinária da UNOPAR que souberam entender as ausências e me incentivaram a continuar. Muito obrigado!

Aqueles que me levaram até Botucatu guiando meus passos na UNESP-Botucatu, Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho e Silvia Manduca Trapp. Obrigado!

Aos amigos e colegas de trabalho da UNOPAR pelas palavras de carinho e estímulo.

Aos acadêmicos que ajudaram nas primeiras colheitas Tiago Torrecillas Sturion, Luis Fabiano de Jesus, João Carlos Duarte de Andrade, Rodrigo Slembariski Braghin, Ailton Maziero Soethe. Muito obrigado!

Ao amigo Gercio Luiz Bonesi, companheiro de viagem, pelo apoio e incentivo.

Ao amigo Flavio Antônio Barca Junior pelo apoio e cálculo estatístico.

À amiga Márcia Cristina Bernini Bispo Barca pela realização das preparações histológicas.

À amiga e eterna mestre da patologia veterinária Neusa Maria Alves Viotti.

Aos amigos Antônio Carlos Faria dos Reis, Claudia Yurika Tamehiro e Margarete Kimio Falbo pelo incentivo e amizade.

À Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Análises Clínicas, em especial ao MSc Marco Antônio Cardoso pela cultura bacteriana e pelo PCR.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO – Pedro Leopoldo / MG – Setor de Tuberculose, em especial à Dra. Andréa Padilha Alencar.

Ao Centro de Diagnóstico Médico Veterinário da UNOPAR pela confecção das amostras.

E a todos que direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho.

É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.

Teodore Roosevelt

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Geral.....	18
3.2. Específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	48
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	49
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	59

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Linfonodo retrofaríngeo com lesões caseosas.....	28
Figura 2 - Linfonodo traqueobrônquico bovino com necrose caseosa.....	29
Figura 3 - Linfonodo mediastínico bovino com material caseoso.....	30
Figura 4 - Linfonodo pré-escapular bovino com linfadenite.....	31
Figura 5 - Linfonodo pré-escapular bovino com linfadenite serosa.....	32
Figura 6 - Fragmento de linfonodo retrofaríngeo. Granuloma tuberculoso caracterizado por área central necrótica (N) circundada por reação inflamatória mononuclear, onde se destacam células gigantes de Langhans (seta), envolta por camada fibrosa (F) (HE. Obj. 10x).....	33
Figura 7 - Fragmento de linfonodo retrofaríngeo. Granuloma tuberculoso caracterizado reação inflamatória mononuclear, onde se destacam células gigantes de Langhans (seta), envolta por camada fibrosa (F) (HE. Obj. 40x).....	34
Figura 8 – Aspirado de linfonodo pré-escapular. Citopatologia caracterizada por área de reação inflamatória mononuclear, onde se destacam formação de célula gigante (círculo). (Giensa. Obj. 40x).....	35
Figura 9 - Bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) (Ziehl-Nielsen, Obj 100x).....	36
Figura 10 - PCR: M – Padrão molecular; 1 – amostra testada; 2,3 e 4 controles positivos e 5 controle negativo.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Total de animais abatidos em matadouro-frigorífico da região de Maringá e respectivas condenações por lesões sugestivas de tuberculose entre os anos de 2004 a 2006.....	23
<b>Tabela 2</b>	Distribuição das lesões de tuberculose e os resultados diagnósticos de 18 bovinos suspeitos de infecção por <i>Mycobacterium bovis</i> .....	26
<b>Tabela 3</b>	Distribuição das lesões de tuberculose e os resultados diagnósticos de 23 bovinos com infecção por <i>Mycobacterium bovis</i> , pela tuberculinização comparada.....	27
<b>Tabela 4</b>	Análise estatística de Kappa com as concordâncias entre os métodos de diagnósticos utilizados macroscopia, histologia, citologia e microbiologia.....	27
<b>Tabela 5</b>	Análise estatística de Kappa com as concordâncias entre os métodos de diagnósticos utilizados microbiologia e cultura.....	28

OKANO, W. **Post mortem, citologia, histopatologia e bacteriologia no diagnóstico da tuberculose bovina - matadouro-frigorífico da região norte do Paraná**: 2007. p. 61. Tese de doutorado em Medicina Veterinária, Área de Clínica Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

## RESUMO

Quanto menor o intervalo de tempo entre o achado *post mortem* e o diagnóstico da tuberculose, mais rapidamente se estabelecerão prioridades de ação frente a decisão sanitária a ser tomada pela Inspeção de Produtos de Origem Animal quanto a carcaça em questão. A citologia por ser um método rápido, de fácil realização e de baixo custo sendo importante instrumento na clínica bovina, especialmente quando usada em conjunto com achados físicos. Foram avaliadas amostras de 41 fragmentos de linfonodos de bovinos de matadouro-frigorífico com avaliação macroscópica e coletado material para exame histológico, citológico e cultura bacteriológica e parte delas analisadas pelo PCR. De 17 linfonodos sem lesões típicas de tuberculose em 9 visualizaram-se células gigantes de Langhans; 4 isolaram-se o *M. bovis*; sendo duas destas PCR positivo e 4 citologias sugestivas de tuberculose. Resultados deste estudo indicam que nem todos os animais infectados têm lesões macroscópicas observadas na linha de abate. Permitem também concluir que há a necessidade do uso de métodos laboratoriais no auxílio do diagnóstico da tuberculose em matadouros-frigoríficos.

**Palavras-chave:** citologia, tuberculose bovina, *Mycobacterium bovis*, histopatologia e microbiologia.

OKANO, W. ***Post mortem*, cytology, histopathology and the bacteriology on the diagnosis of bovine tuberculosis of slaughterhouse of northern Paraná.** 2007. p. 61. Doctorate's thesis on Veterinary Medicine, veterinary clinican sector. Veterinary Medicine and Zootechology Scholl, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

## **ABSTRACT**

The short the time gap between the *post mortem* found and the tuberculosis diagnosis, the faster wil the action priorities be established towards the sanitary decision to be made by slaughter surveillance concerning the carcass in the issue. Cytology being a fast, rather feasible and low-cost method and important tool in bovine practice, especially when used in conjunction with the physical findings. 41 samples of fragments from bovine lymph nodes coming from slaughterhouse have been analyzed macroscopically and material for histological, cytological and bacteriologic culture has been collected, part of wich has been analyzed by the PCR. Of the 17 lymph nodes with no TB lesions, 9 present giant Langhans cells; in 4 was the *M. bovis* isolated, 2 of those being PCR positive, and 4, TB suggestive cytology. Results from this study indicate that not all infected animals have macroscopic lesions observed at slaughter line; allowing as well to be concluded, that there is a need for use of laboratorial methods in assisting the diagnosis of tuberculosis in slaughterhouse.

**Key-words:** cytology, bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, histopathology, microbiology.

## 1 INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium bovis* tem sido reconhecido como o agente da tuberculose bovina em todo o mundo, considerado uma doença zoonótica (DABORN, 1995). *Mycobacterium bovis* pertence ao complexo da *Mycobacterium tuberculosis* (de LESLIE et al., 1999). Tem especificidade por muitos hospedeiros, raramente acometem eqüídeos ou ovinos, porém ocorrem em cervídeos, lhamas e suínos, nos quais desenvolvem severas lesões com descarga de materiais infectantes (KREBS et al., 1997).

A prevalência da doença bovina é maior nos países em desenvolvimento, e menor nos países desenvolvidos, onde programas de controle e erradicação já estão avançados. Na América Latina e Caribe existem áreas com prevalência que ultrapassa 1%. No Brasil dados indicam a prevalência de 1,3% de animais reagentes a tuberculinização entre os anos de 1989 a 1998. Em Minas Gerais a prevalência de 5% de propriedades com animais reagentes (BRASIL, 2003). Com perdas econômicas estimadas de 20 a 25% na eficiência reprodutiva (BRASIL, 2003).

A evidência maior do meio de transmissão da *Mycobacterium bovis* pode ser vista nos frigoríficos, onde as amostras de tecido coletadas de animais reagentes a tuberculinização e submetidas a cultura são na sua grande maioria os brônquio-mediastínicos, o retrofaríngeo e submandibular, sugerindo que a rota de infecção é a respiratória. Porém a transferência do bacilo do rúmen para o trato respiratório também é possível via eructação (PHILLIPS et al., 2003). Ocorre então o processo patológico com a formação do complexo primário associado ao linfonodo regional, onde há acúmulo de macrófagos com formação de células gigantes de Langhans, circundadas por linfócitos, plasmócitos, fibrose periférica e necrose caseosa central o chamado granuloma tuberculoso (NEILL et al., 1994a).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Etiologia

O *Mycobacterium bovis* é o agente causador da tuberculose em bovinos (RADOSTITS et al., 2002). É também responsável pela doença humana, fazendo da bactéria uma importante espécie zoonótica (MORRIS et al., 1994). As bactérias do gênero *Mycobacterium* são gram positivas, álcool-ácido resistentes incluindo patógenos humanos e animais (RAVIGLIONE et al., 1995).

O *M bovis* é membro do complexo *M tuberculosis* tendo sido classificado como da lista B da OIE (Organização Mundial da Saúde Animal) tendo importância sócio-econômica e de saúde pública (BIET et al., 2005). Outros membros são *M tuberculosis*, *M africanum* e *M microti* (GRANGE e YATES, 1994).

### 2.2 Epidemiologia

#### 2.2.1 Ocorrência

A tuberculose bovina é uma enfermidade infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium bovis*. Afeta bovinos provocando uma infecção crônica que leva a perdas econômicas por emagrecimento progressivo, menor produtividade de leite e morte dos animais, além de prejuízos devido à condenações de carcaças (COLLINS, 1996).

Todas as espécies, incluindo a humana, e grupos etários são susceptíveis ao *M bovis*, sendo os bovinos, caprinos e suínos os mais afetados, ao passo que os ovinos e eqüinos mostram uma alta resistência natural. Animais silvestres tais como o texugo na Inglaterra e Irlanda, o gambá na Nova Zelândia, o veado, o cervo, o alce e o bisão na América do Norte e os búfalos na África do Sul e na

Austrália podem atuar como hospedeiros silvestres do *M bovis* (RADOSTITS et al., 2002).

A tuberculose em humanos é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, no entanto *M. bovis*, causador da tuberculose bovina, pode também ser responsável pela doença em humanos (GRANGE e YATES, 1994; ESSEY e KOLLER, 1994), onde a tuberculose intestinal é relacionada à ingestão de leite cru, constituindo a principal causa da tuberculose extra-pulmonar em regiões rurais (GRANGE e YATES, 1994).

### 2.2.2 Fontes de Infecção

Os bovinos infectados constituem a principal fonte de infecção através do esputo, exsudatos traqueais em aerossol, fezes, ingestão ou deglutição de descargas respiratórias e outras secreções (REBHUN, 2000).

Nos programas de controle da tuberculose bovina ou da paratuberculose nos animais domésticos, deve-se ter em mente o provável envolvimento de animais silvestres como reservatório das micobactérias. Deve-se entender a fisiologia ecológica da micobactéria nas diferentes espécies de animais silvestres (RADOSTITS et al., 2002). Morris et al. (1994) descrevem que onde o *M bovis* persiste é necessário verificar a presença de animais silvestres.

### 2.3 Transmissão

Morris et al. (1994) citam que a excreção respiratória e a inalação de *M. bovis* é a principal rota de transmissão entre bovinos, e que em alguns países o leite, a urina e as fezes têm significativa importância. Neill et al., (1994a) citam também que a secreção respiratória tem potencial de disseminação da infecção e

que a via congênita, através do cordão umbilical, assim como a genital podem ocorrer, mas de forma mais rara, e a ingestão é considerada a segunda via de infecção.

Em bovinos e em outros animais a rota de transmissão do *M bovis* pode ser deduzida pelas lesões encontradas nos animais durante a inspeção *post mortem* nos matadouros-frigoríficos. Animais com lesões restritas na cavidade torácica são infectados pela inalação de aerossóis, enquanto que, aqueles com lesões em linfonodos mesentéricos têm infecção adquirida de alimentos ou água contaminados com o bacilo (POLLOCK e NEILL, 2002).

O sistema respiratório é claramente a rota pelo qual a infecção ocorre e se espalha entre os bovinos. O serviço de inspeção pode ser inadequado para identificar muita das pequenas lesões e isto responde por que muitos animais reatores não têm lesões detectadas nos abatedouros. No estágio inicial da infecção, aproximadamente 87 dias, pode haver excreção regular do bacilo da tuberculose no muco nasal, antes de excreção tornar-se intermitente. No mínimo, 20% dos animais com lesões de tuberculose podem ter *M bovis* nas secreções nasais em algum lapso de tempo. Estes animais podem ser os disseminadores da tuberculose bovina (MENZIES e NEILL, 2000).

No exame da necropsia entre 70 a 90% das lesões tuberculosas são encontradas em linfonodos da cabeça e cavidade torácica, com Linfonodo retrofaríngeo medial (direito e esquerdo) com 29,4% das lesões; Linfonodo mediastínico (anterior e posterior) 28,2%; Linfonodo bronquial (direito e esquerdo) 18%; Pulmão com 9,8% e Linfonodo mesentérico 2,9%, o que comprova que a maior rota de transmissão é a inalatória (CORNER, 1994).

A infecção pela ingestão é possível no pasto, quando o alimento, a água de beber e o cocho estiverem contaminados com fezes, porém grandes doses infectantes são necessárias. A água estagnada pode transmitir a doença até 18

dias de o último animal tuberculoso ter feito uso da mesma (RADOSTITS et al., 2002). Os animais jovens podem se infectar pela ingestão de leite contaminado (REBHUN, 2000; RADOSTITS et al., 2002).

#### 2.4 Fatores de risco

As micobacterias são relativamente resistentes ao calor, morrendo pela pasteurização ou pela fervura. 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 6 meses a 4 anos em pastagens, aviários, matéria orgânica, fezes, cama de galinha e em locais onde se enterram cadáveres contaminados pelo bacilo (CORREA e CORREA, 1992).

Wray (1975) descreve que a *M. bovis* pode sobreviver de 18 a 332 dias, em temperatura entre 12 a 24°C, dependendo da intensidade da luz solar. Cultura de *M. bovis* misturada às fezes, sangue e urina podem sobreviver por 700 dias no solo, sob condições favoráveis, demonstrando a perpetuação do microorganismo numa propriedade.

Fatores de risco tais como idade, tipo do animal, meio ambiente e manejo da fazenda têm influência significativa na infecção (MENZIES e NEILL, 2000). Também a deficiência nutricional acarreta a redução da resistência à tuberculose bovina (GRIFFIN et al., 1993). Assim como disfunções imunológicas podem propiciar o desenvolvimento da tuberculose bovina (MENZIES e NEILL, 2000 e BIET et al., 2005). A desnutrição ou doença viral imuno-supressora persistente pode aumentar a suscetibilidade dos bovinos a desenvolver a doença por *M bovis* (MENZIES e NEILL, 2000 e MORRIS et al., 1994).

Segundo Radostits et al. (2002) a criação em confinamento aumenta a possibilidade de transmissão do bacilo devido ao maior contato existente entre os

animais. O gado tipo zebu (*Bos indicus*) é considerado mais resistente que o gado europeu.

O grau de transmissão pelo *M bovis* depende de vários fatores, como o número de microorganismos excretados e inalados, o tempo de exposição, o grau de confinamento dos animais infectados e o tamanho da partícula que contenha as micobactérias viáveis (COSTELLO et al., 1998).

## 2.5 Importância Econômica

No que se refere às perdas econômicas determinadas por esta enfermidade, estas se manifestam em redução de 10 a 20% da produção de leite e do ganho de peso, infertilidade e condenação de carcaças. Na Argentina calcula-se um decréscimo de 18% na produção de vacas tuberculosas quando comparadas com animais sadios (KANTOR e RITACCO, 1994). Onde encontraram perda de até 35% no total da produção de leite segundo Hernandez e Baca (1998).

Segundo Hernandez e Baca (1998) o diagnóstico da tuberculose em rebanhos leiteiros leva as sérias perdas econômicas. Restrições de quarentena são impostas para reduzir os riscos da transmissão da doença para outros animais e seres humanos. O controle e medidas sanitárias incluem repetidos testes intradérmicos de tuberculinização, isolamento ou abate dos animais reatores com base nos resultados da tuberculinização, restrição na movimentação e venda de animais, e em muitas instâncias, descontaminação da propriedade. No México e em outros países da América Latina, como não existe um fundo indenizatório disponível por razões econômicas, granjeiros leiteiros, podem ser relutantes em abater os animais com tuberculinização positiva.

O risco da transmissão para seres humanos, à diminuição da produtividade dos animais e a proibição da comercialização dos produtos e subprodutos dos animais contaminados, são motivações importantes para a instalação de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina em âmbito mundial (COVISI et al., 1998)

## 2.6 Importância Zoonótica

Infecção em seres humanos pode ocorrer pela inalação de aerossóis ou através do consumo de leite contaminado. Os aerossóis podem também advir da manipulação de lesões de carcaças (NEILL et al., 1989).

Dois fatores têm contribuído para a infecção por *M. bovis* em seres humanos, pessoas imunossuprimidas e o convívio do homem com animais exóticos (RADOSTITS et al., 2002). Segundo Daborn e Grange (1993) o *M. bovis* tem despertado interesse diagnóstico, pois nos países desenvolvidos a doença aparece como caráter zoonótico particularmente em conjunto com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

No Brasil devido à interação com a epidemia da AIDS, a possibilidade do aparecimento de cepas resistentes às drogas usuais, aos tratamentos inadequados ou incompletos, impõe um aprimoramento das práticas que vêm sendo adotadas. A tuberculose humana persiste como importante problema de saúde pública, representando cerca de 90.000 novos casos e mais de 5.000 mortes anuais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 90 milhões de novos casos de tuberculose ocorrerão nesta década, estimando-se que 30 milhões de pessoas morrerão em todo mundo devido a esta doença (GOMES, 1998). Parreiras et al. (2004) citam que de acordo com o OPS/OMS (1993), a infecção com *M. bovis* é estimada em 5% da tuberculose humana no Brasil.

Com o uso da pasteurização do leite aumentou a prevenção da doença nos indivíduos mais jovens. Porém *M bovis* tornou-se um problema de saúde pública emergente na Irlanda com a co-infecção pelo HIV e *M bovis* em pessoas mais idosas que ingeriram leite não pasteurizado quando crianças (COTTER et al., 1996).

Em países em que a pasteurização do leite não ocorre e que existem casos de tuberculose bovina; 10 a 15% dos casos de tuberculose humana são causadas pelo *M. bovis* (ASHFORD et al., 2001). Em Xambrê no Paraná Merlini et al. (2003) descrevem que 88,11% dos moradores consomem leite “in natura” e que 36,45% destes consumidores não fervem o produto.

## 2.7 Distribuição Mundial

Apesar de estar controlada em 1992, 70% da tuberculose detectada nos Estados Unidos tiveram origem na fronteira com o México (BROWN e ANDA, 1998). Na Argentina a estimativa da prevalência da tuberculose em bovinos é de 4,5% e a da tuberculose humana causada pelo *M bovis* é de 0,47%. No Uruguai a estimativa da tuberculose bovina é de 0,03% (KANTOR e RITACCO, 1994).

Infelizmente no Brasil faltam estatísticas confiáveis acerca da ocorrência e distribuição das enfermidades, em especial da tuberculose bovina (LILEMBAUM, 2000). Segundo o Ministério da Agricultura entre os anos de 1986 a 1996, a prevalência da tuberculose bovina, em 14 estados brasileiros variou de 0,9% a 1,7% (ABRAHÃO, 1999).

Baptista et al. (2004) trabalhando em matadouro-frigorífico do Triângulo Mineiro obtiveram a prevalência da tuberculose em Minas Gerais de 0,8% e em Goiás de 0,4%. Chamam a atenção para a baixa prevalência devido a não

detecção da doença em casos de tuberculose sem lesões macroscópicas detectáveis no exame post mortem. Só o levantamento da doença nas fazendas, em amostras representativas ou abrangendo a totalidade dos animais, pode proporcionar boas estimativas da frequência da doença, reservando-se aos matadouros o papel de sentinela epidemiológica e de rastreabilidade, no âmbito dos programas de combate às doenças.

## 2.8 Patogenia

Quando o *M. bovis* penetra o organismo ocorre uma inflamação exsudativa focal, que tende a caseificação e calcificação (POTEL, 1974). Na porta de entrada há multiplicação do microorganismo para onde migram neutrófilos que fagocitam ativamente a bactéria, aparecendo também macrófagos e linfócitos (CORREA e CORREA, 1992). Os macrófagos controlam a micobactéria na ausência de células imunomediadas (DANNENBERG, 1999). Os neutrófilos são particularmente abundantes na formação da lesão inicial em bezerras, camundongos, ratos, coelhos da Índia e hamsters infectados experimentalmente (CASSIDY et al., 1998).

Macroscopicamente em oito dias observa-se o foco primário da tuberculose (POTEL, 1974) ao contrário de Cassidy et al. (1998) que descrevem a observação macroscópica com 14 dias. A calcificação em um prazo de três semanas (POTEL, 1974) enquanto Cassidy (1998) cita que em 35 dias ocorreria esta mineralização. Neill et al. (2001) descrevem que microscopicamente, as lesões podem ser observadas precocemente após sete a onze dias pós-infecção, com macrófagos e células gigantes, contendo o bacilo álcool-ácido resistente e detritos de neutrófilos em evidência. Os linfonodos regionais tornam-se reativos. Isto é denominado de complexo primário da tuberculose. O local da infecção primária oferece dados importantes da porta de entrada da tuberculose. O foco primário pode sofrer cura, formando um tecido cicatricial, depois de reabsorção de massas necrosadas e reorganização conjuntiva (POTEL, 1974).

Tendo a micobactéria invadido o organismo irá ocorrer a fagocitose pelos macrófagos e apresentação de antígenos micobacterianos no Complexo de Histocompatibilidade (MHC). Este MHC será reconhecido pelos linfócitos T inflamatório e pelos linfócitos T de memória. Inicia-se a produção de citocinas, principalmente o IFN gama, ativando os macrófagos e os linfócitos T inflamatórios (WEDLOCK et al., 2002). Os macrófagos ativados reduzem o pH intrafagossomal e expõem a agente ao oxigênio reativo, produtos nitrogenados e enzimas lisossomais, levando a morte da micobactérias (WEDLOCK et al., 2002). Outros participantes são o óxido nítrico (NO) e o fator de necrose tumoral alfa (FNT $\alpha$ ) (WATERS et al., 2003). A síntese de NO, devido a estimulação de macrófagos e subsequente geração de nitrogênio reativo, provocam a morte das micobactérias (CHAN et al., 1995).

Caso escapem dos processos acima haverá a formação de uma reação inflamatória crônica. A resposta inflamatória à micobactéria é a formação do granuloma típico ou do tubérculo; devido a fatores como localização intracelular destes microorganismos, sua pobre digestão e pela composição cerosa de sua parede. O granuloma focal representa a expressão da inflamação granulomatosa, podendo estar restrita ou mesmo prevenir o desenvolvimento bacteriano através da justaposição de macrófagos infectados e de células T. Neste contexto, as células T podem regular a atividade microbiana dos macrófagos ou lisar os que estiverem infectados. A arquitetura do granuloma tuberculoso impede que as micobactérias espalhem-se ao redor formando camadas concêntricas de macrófagos não infectados e de tecido fibroso (SAUNDERS e COOPERS, 2000).

A complexa interação dinâmica dentro da lesão reflete a composição funcional dos macrófagos e das células T “helper”, produção de citocinas e atividades micobacterianas que irão influenciar a aparência morfológica do granuloma. Necrose, liquefação, mineralização e regressão representam muito o

resultado dessas interações que ditam o tamanho da lesão, sua aparência e a apresentação da doença no hospedeiro (CASSIDY, 2006).

A necrose caseosa central é observada no granuloma em muitas espécies e tem significativa influência na expansão da lesão (FENHALLS et al., 2000). Por muitos anos o desenvolvimento da necrose dentro do tubérculo tem sido considerado atividade primária da Imunidade Mediada por Células (CMI) gerando células T capazes de ativar e destruir os macrófagos com a micobactéria em seu citoplasma (DANNENBERG, 1999). Evidências recentes, no entanto sugerem que a imunidade inata (TURNER et al., 2003) e a falha da na ativação de macrófagos (ORME, 1998) e a combinação de citocinas dentro de lesão contribuem para a formação da necrose. Janeway-Jr et al. (2002) descrevem a morte de bacilos devido a combinação da falta de oxigênio e dos fatores citotóxicos dos macrófagos ativados.

A atividade dos linfócitos T, gama e delta, e das células NK desencadeariam a necrose através do efeito dos macrófagos ou através da produção das citocinas, como a INF gama (SMITH et al., 1997; DANNENBERG, 1999; ORME e COOPER, 1999). Neste contexto as células T gama e delta acumulam-se precocemente nas lesões micobacterianas em bovinos (CASSIDY et al., 2001), e camundongos (GRIFFIN et al., 1993) e têm sido mostradas na morte de macrófagos infectados por micobactérias *in vitro* (DIELI et al., 2000).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) também contém a infecção por meio da organização local do granuloma (WATERS et al., 2003) e através da influência da função endotelial local (SCOTT-ALGOOD et al., 2003).

Quando grande parte do agente é transportada pelos fagócitos para o linfonodo que drena a região, forma-se então o foco secundário da tuberculose, em sete a dez dias. Entre sete a quinze dias já houve a sensibilização de linfócitos T e em duas semanas forma-se uma massa caseosa centralmente e,

periféricamente uma cápsula de tecido fibroso (CORREA e CORREA, 1992). Neill et al. (1994a); Cassidy et al. (1999) e Ameni et al. (2000) descrevem que na progressão da lesão, o tubérculo forma uma cápsula fibrosa com necrose caseosa central com ou sem calcificação.

A necrose de caseificação também chamada caseosa é um tipo especial de necrose com perda total da estrutura e arquitetura do tecido envolvido. Apresenta tecido com consistência firme e seco, quando desidratado, semelhante a requeijão e mole, pastoso, quando um pouco hidratado, semelhante à massa de queijo (COELHO, 2002). Fayyazi et al. (2000) sugerem que a apoptose de macrófagos e de células T contribuem para a caseificação da lesão.

Se o bacilo escapa dos focos primários ocorre difusão linfo-hematógena, já que a linfa é lançada na corrente venosa, generalização precoce. Essa generalização leva a formação de pequenos tubérculos, firme, rodeados por halo eritematoso de inflamação ativa com tendência a rápida caseificação central. Tem aspecto semelhante ao grão de milho, tuberculose miliar, e quando revestidos pela serosa, ganha aspecto brilhante ao qual se denomina de tuberculose perlácea. Os sinais clínicos são sugestivos, mas os linfonodos estarão aumentados de volume, principalmente cervicais, pré-escapulares e pré-crurais (CORREA e CORREA, 1992).

No caso de re-infecção exógena ou endógena, pelo recrudescimento da lesão, torna-se necrosada formando nódulos caseosos de diversos tamanhos, e nos casos de baixa resistência orgânica, a infecção alcançará o parênquima pulmonar e os tecidos adjacentes formando lesões confluentes que formam cavitações com a expectoração de material tuberculoso (PRITCHARD, 1988; ROXO, 1996).

Histopatologicamente a lesão característica da tuberculose é o tubérculo com visualização de necrose caseosa central, circundada por células gigantes de

Langhans, que apresenta formato de meia lua. Células linfocitárias e plasmocitária também estão presentes. À medida que envelhece, há aumento do tecido conjuntivo (JONES et al., 2000).

## 2.9 Diagnóstico

A partir de testes alérgicos como a tuberculinização intra-dérmica, cervical ou escapular, ou então ano-caudal, pode se medir a resposta celular do animal ao contato com a *M. bovis*. Pela legislação brasileira o destino dos animais reagentes considerados positivos é o abate em um frigorífico-matadouro com inspeção sanitária (MOTA, 1998).

Testes intra-dérmicos utilizando a tuberculina são as formas mais usuais de diagnóstico, porém com a desvantagem de não demonstrar infecções recentes (NEILL, 1994b). Nestes casos já foi utilizado o teste sangüíneo com o interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). O BVDV (Vírus da diarreia viral bovina) pode interferir no teste intradérmico resultando na perpetuação de animais tuberculosos na propriedade (CHARLESTON et al. 2001). O IFN $\gamma$  é baseado na liberação dos mesmos por linfócitos sensibilizados durante incubação de material antigênico de que contém antígenos espécie específicos (WALRAVENS et al., 2002).

A Austrália utiliza o IFN $\gamma$  como forma de diagnóstico da tuberculose bovina, apresentando 96,3% de especificidade e 95,2% de sensibilidade, quando comparado a cultura microbiológica. As desvantagens são o custo unitário, mais caro que o da tuberculinização, e a amostra que deve ser processada em até 8 horas após a coleta (LILENBAUM et al., 1999). Retamal e Abalos (2004) descrevem a prova do IFN $\gamma$  como técnica simples e que pode ser aplicada em uma grande quantidade de amostras com rápida obtenção de resultados.

O uso da PCR (Polymerase Chain Reaction) é baseado na amplificação de determinados segmentos do DNA bacteriano que, por serem bastante específicos,

evitam falsos resultados. É um método rápido, simples e extremamente sensível, capaz de detectar até 10 fg DNA de micobactéria, o equivalente a 5 organismos (COLLINS et al., 1994). Zanini et al. (2001) e Araújo et al. (2005), em pesquisas realizadas no Brasil, descrevem o uso do PCR como método de diagnóstico rápido da tuberculose bovina podendo auxiliar a inspeção sanitária dos matadouros-frigoríficos.

A tentativa de diagnóstico da tuberculose bovina pode ser feita por detecção de lesões típicas no exame *post mortem*. A análise histopatológica pode aumentar a confiança no diagnóstico. O exame cuidadoso de seis pares de linfonodos do pulmão, da cabeça e do mesentério pode estabelecer o diagnóstico em 95% dos bovinos com lesões macroscópicas. No caso de infecções recentes não haverá lesões macroscópicas típicas visíveis (CORNER, 1994). Os linfonodos preconizados são os mandibulares, os parotídeos, os retrofaríngeos, o mediastinais, os traqueobrônquicos e os mesentéricos (BROWN e de ANDA, 1998). Whipple et al. (1996) em um estudo realizado com 30 animais positivos para tuberculose encontraram maiores alterações nos linfonodos traqueobrônquicos, mediastínicos e retrofaríngeos. Corner (1994) lembra que o isolamento de *M. bovis* é o caminho para o diagnóstico definitivo. Milian-Suazo et al. (2000), concordam porém lembram que este é um método lento de diagnóstico, pois o resultado conclusivo pode demorar até oito semanas.

A lesão primária ou foco de infecção é estabelecido mostrando interação entre o hospedeiro e o patógeno. Essa lesão primária no linfonodo regional é o complexo primário, onde ocorre a formação de células gigantes tipo Langhans, epitelióides, com presença de linfócitos, plasmócitos e monócitos que com a progressão desenvolve uma fibrose periférica e necrose caseosa central, com aparência macroscópica de nódulo branco ou amarelo-acinzentado, com calcificação (DUNGWORTH, 1995).

Milian-Suazo et al. (2000) descrevem que o achado sugestivo de tuberculose na histopatologia muitas vezes pode ser negativo na cultura microbiológica para *M.bovis*, tendo em vista que os meios de cultivo são seletivos para *M. bovis*, enquanto a análise histopatológica pode detectar outros tipos de micobactérias.

Dependendo da experiência do inspetor, a análise das lesões macroscópicas durante a inspeção pode provir um rápido e real diagnóstico da tuberculose, do que própria cultura microbiológica, onde em um estudo, Corner et al. (1990) detectaram após exame minucioso de seis pares de linfonodos da cabeça, cavidade torácica e abdominal, 95% de bovinos com tuberculose.

Milian-Suazo et al. (2000) descrevem que a alta proporção de resultados positivos na cultura bacteriológica e no exame histopatológico indica que a inspeção da carcaça com lesões macroscópicas pode ser confiável na estimativa da prevalência da doença.

Geralmente em 90% dos casos de tuberculose as lesões primárias se desenvolvem nos linfonodos do sistema respiratório (Collins, 1996). Neill et al. (1994a) ao pesquisarem 2886 bovinos com tuberculose mapearam os sítios de lesões encontradas, assim distribuídos: 57% na cavidade torácica, 23% na cabeça, 5% na cavidade torácica e cabeça e 3% com lesões em linfonodos mesentéricos. Enquanto Mc Ilroy et al. (1986) descrevem 72% de lesões torácicas e 26% em cabeça, Whipple et al. (1996) descrevem 60% de lesões torácicas e 27% em cabeça, o que concorda Corner (1994) que descreve que 70 a 90% das lesões estão nos linfonodos da cabeça ou do tórax. Hardie e Watson (1992) descrevem que de 2 a 4% dos animais com lesões de tuberculose apresentam a forma visceral, a chamada tuberculose aberta.

Milian-Suazo et al. (2000) ao acompanharem a inspeção *post mortem* de 2500 bovinos, detectaram 16%(400) com tuberculose, sendo que 90% destes

bovinos tinham lesões localizadas, afetando somente um órgão ou tecido. Destes 400 animais tuberculosos 84%(336/400) tinham lesões em linfonodos, sendo assim distribuída: retrofaríngeos – 49,2% (183/336), mediastinais - 24,4%(91/336), mandibulares – 6,4% (24/336), traqueobrônquicos – 3% (12/336), mesentéricos – 2,4% (9/336) ou uma combinação destes linfonodos. As lesões também foram encontradas no pulmão – 1,5% (6/400), úbere – 1,5% (6/400), fígado – 0,7% (3/400) e cartilagem esternal – 0,2% (1/400).

McIlroy et al. (1986) ao analisarem 55 bovinos reagentes a prova de tuberculinização demonstrou lesões macroscópicas em apenas 37 (67%) dos animais, dos quais 73% tinham pequenas lesões pulmonares. Sendo a maior parte destas lesões com diâmetro menor que 1 cm e a metade delas localizadas nos lobos diafragmáticos. Já Milian-Suazo et al. (2000) descrevem que 84% do gado infectado apresentam envolvimento de linfonodos. Whipple et al. (1996) alertam para o fato de que a detecção da tuberculose em matadouro-frigoríficos depende da identificação de lesões macroscópicas, que muitas vezes não são observadas nas carcaças inspecionadas, isolando o *M. bovis* de quatro animais que não apresentaram lesões macroscópicas na linha de inspeção. Assim como De Kantor et al. (1987) em um estudo realizado na Argentina, isolaram *M. bovis* de cinco animais sem nenhuma lesão macroscópica.

Whipple et al. (1996) ao correlacionarem os achados macroscópicos e histopatológicos com o exame microbiológico encontraram uma correlação de 93,3% nos linfonodos traqueobrônquico, mediastínico e retrofaríngeo médios.

As lesões macroscópicas descritas por Whipple et al. (1996) são circunscritas, amarelas esbranquiçadas, de vários tamanhos e números com envoltório cinzento. Na histopatologia descreve a presença de granuloma com necrose caseosa central e mineralização. Rhyan e Saari (1995) descrevem necrose caseosa, com mineralização central e margeada por manta de células epitelióides, linfócitos, plasmócitos e células gigantes de Langhans.

Segundo a recomendação do Serviço de Inspeção Federal (SIF) na avaliação da carcaça na inspeção *post mortem* vários critérios devem ser seguidos para o consumo ou não da carcaça, desde a condenação total, parcial ou tratamento pelo calor (BRASIL, 1952).

Em um levantamento realizado por Zemuner et al. (2003) em um matadouro-frigorífico, com Serviço de Inspeção Federal, na cidade de Maringá-Paraná, ao avaliarem as carcaças de 36.449 bovinos abatidos, encontraram 208 animais com linfadenite inespecífica. Dos 208 animais, 44,7% apresentaram lesões sugestivas de tuberculose, ou seja, formações de células gigante tipo Langhans, em lâminas de histopatologia coradas pela técnica de H&E.

O uso da citologia poderia dinamizar este estudo. Segundo Rocha (1998) a citologia pode identificar os processos inflamatórios agudos ou crônicos e as neoplasias benignas e malignas. É um método de diagnóstico rápido, de fácil realização, e executado até em 30 minutos, com custo 30% menor do que o exame histopatológico. Desta forma pode auxiliar o diagnóstico dos casos de tuberculose em matadouro-frigorífico. Um dos métodos que poderá ser utilizado no matadouro-frigorífico é o decalque segundo Cowell et al. (1999).

### 3. OBJETIVOS:

O objetivo geral foi fazer um estudo epidemiológico da tuberculose a partir de alterações encontradas em linfonodos de bovinos abatidos em matadouro-frigorífico na região Norte do Paraná a partir dos dados tabulados.

O objetivo específico deste trabalho foi:

- Avaliar a utilização da citologia como método de diagnóstico no caso de linfadenites específicas e inespecíficas de bovinos de abate, e
- comparar os achados citológicos com as lesões macroscópicas, histopatológicas e bacteriológica para *Mycobacterium bovis*.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal sendo aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP Campus de Botucatu.

Local da pesquisa: O trabalho foi desenvolvido em matadouro-frigorífico de bovinos, em Maringá, região norte do Paraná, com Serviço de Inspeção Federal (SIF) nº 1778. Tal estabelecimento destina-se à exportação e ao mercado interno.

Formaram-se dois grupos distintos de coleta, Grupo 1 proveniente de animais com lesões sugestivas de tuberculose e ou linfadenites inespecíficas na linha de inspeção sanitária, totalizando 18 animais, independente de sexo, raça, procedência e idade.

E Grupo 2 com fragmentos oriundos de 23 bovinos positivos na prova de tuberculinização comparada encaminhados ao abate. Este grupo foi composto de bovinos leiteiros, fêmea em lactação, Holandesa variedade Preto e Branco, oriundos de Cambira – PR. A tuberculinização comparada foi realizada pelo curso de Medicina Veterinária da Universidade Norte do Paraná.

Metodologia de colheita: na Inspeção *post mortem* foram colhidos os linfonodos que apresentaram linfadenite específica ou inespecífica, encontrados na rotina de inspeção sanitária em matadouro-frigorífico, com o estabelecimento dos seguintes procedimentos:

##### a) CITOLOGIA:

A partir dos linfonodos apresentando alterações, os mesmos foram seccionados longitudinalmente e confeccionadas cinco lâminas na forma de decalque (“imprint”), e secas ao ar. Três lâminas foram fixadas em álcool absoluto

durante 1 minuto e, as outras duas fixadas pelo calor. Uma das lâminas fixadas em etanol foi corada pelo método de Giemsa e examinado em microscópio de luz, procurando-se verificar a ocorrência de processo inflamatório agudo ou crônico ou neoplásico.

Uma das lâminas fixadas pelo calor foi corada pelo método de Ziehl-Nielsen para observação de BAAR (bacilo álcool ácido resistente).

As outras três lâminas foram guardadas para eventuais reavaliações.

Para a avaliação citológica seguiram-se as recomendações de WHITNEY et al. (1999) onde consideram processo granulomatoso, processos com encontro de células epitelióides ou multinucleadas misturadas com várias proporções de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Em alguns casos pode ser granulomatosa, especialmente quando há predomínio de macrófagos, ou presença de células epitelióides ou gigantes no esfregaço (TYLER et al., 1998).

#### b) HISTOPATOLOGIA:

Fixou-se um fragmento do linfonodo em formol tamponado a 10% e processado pelo método de microtomia de parafina, sendo feitos três cortes do material com espessura de 6µm em micrótomo Leica RM2025 e corados respectivamente pelas técnicas de rotina de H&E, para pesquisa de células gigantes de Langhans. E o outro pelo método de Ziehl-Nielsen para pesquisa de BAAR.

As avaliações histopatológicas levaram em consideração as descrições de Coelho (2002) com o tuberculo completo se apresentar todos os elementos tais como necrose caseosa, infiltrado linfocitário, plasmocitário e macrofágico, células epitelióides e células gigantes de Langhans. E incompleto

quando faltar um dos três elementos, necrose caseosa, células gigantes de Langhans ou macrófagos. Será típico quando existir célula gigante e, atípico quando essa faltar.

#### c) CULTURA PARA *Mycobacterium bovis*:

Uma parte do linfonodo foi embalada em saco plástico estéril e sob refrigeração, foi enviada ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Parte do material encaminhou-se ao LANAGRO de Pedro Leopoldo – MG.

#### Cultura das amostras

As amostras foram trituradas em gral com areia e salina estéreis e processados para descontaminação utilizando a técnica de Petroff (KENT e KUBICA, 1985). Para tal, o triturado foi transferido para um tubo cônico estéril de centrífuga e adicionado solução de NaOH 4%, estéril na mesma proporção. Agitou-se o material em vortex e incubado durante 30 minutos a 35°C com agitação a cada 10 minutos. Após este período, o material em descontaminação foi centrifugado durante 20 minutos a 3000 rpm e o precipitado neutralizado com solução de HCL 1 N contendo vermelho de fenol 0,004%. Foi semeado 0,1 mL de cada material descontaminado em meio Löwenstein-Jensen (L-J) e em Stonebrink (piruvato de sódio 500 µg/mL) (S). As culturas foram incubadas na presença de 5-10% de CO<sub>2</sub> a 37°C e 30°C durante 90 dias e inspecionadas semanalmente (KENT e KUBICA, 1985; LEITE *et al.*, 2003).

#### Baciloscopia (Ziehl-Nielsen)

Para a pesquisa direta de BAAR do material triturado foram confeccionados três esfregaços de cada amostra em lâminas novas e desengorduradas. Após secagem ao ar, fixou-se os esfregaços cortando a chama do bico de Bünsen por

três vezes e corados utilizando o método da coloração de Ziehl-Nielsen (SMITHWICK, 1976).

A leitura sistemática das lâminas para a pesquisa de BAAR realizou-se em microscópio de luz com objetiva de imersão, em 100 campos microscópicos.

#### Identificação bioquímica

As colônias bacterianas crescidas nos meios L-J e Stonebrink foram identificadas bioquimicamente, após confirmação da presença de BAAR. Realizou-se os testes da velocidade de crescimento e produção de pigmentos, produção de niacina, redução do nitrato a nitrito, urease, hidrólise do Tween 80, pirazinamidase, crescimento na presença de ácido Tiofeno-2 carboxílico (TCH) (2µg/mL), e ácido p-nitrobenzóico (PNB) (500 µg/mL), crescimento em ágar MacConkey, em ágar nutriente e em presença de 5% de NaCl e teste da arilsulfatase (3 dias) (KENT e KUBICA, 1985; LEITE *et al.*, 2003).

#### d) ANÁLISE ESTÁTÍSTICA:

A análise estatística dos resultados obtidos com relação à eficácia do exame citológico na linha de inspeção como método rápido de diagnóstico da tuberculose comparativamente com os achados histopatológico e cultivo microbiológico bem como as técnicas de detecção, foram realizadas através do teste estatística de Kappa (MINITAB, 2006).

#### e) REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Uma parte das amostras encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da

Universidade Estadual de Maringá foi separada e realizada a análise da PCR segundo as modificações realizadas por Cardoso (2006).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Animais de abate acometidos de tuberculose.

Entre os anos de 2004 a 2006, de um total de 404.859 cabeças de bovinos abatidas em matadouro-frigorífico de Maringá – Paraná, 60 (0,00148%) cabeças, apresentaram lesões macroscópicas sugestivas com tuberculose bovina. No ano de 2004 de 171.488 animais abatidos, 25 (0,00146%) foram condenados, em 2005 de 128.965 cabeças, 16 (0,00124%) e no ano de 2006 de 104.406 bovinos abatidos, 19 (0,00182%) apresentaram lesões de tuberculose observadas nas linhas de abate., conforme Tabela 1.

TABELA 1 – Total de animais abatidos em matadouro-frigorífico da região de Maringá e respectivas condenações por lesões sugestivas de tuberculose entre os anos de 2004 a 2006.

Ano	Animais abatidos	Animais com lesões	%
2004	171.488	25	0,00146
2005	128.965	16	0,00124
2006	104.406	19	0,00182
Total	404.859	60	0,00148

### 5.2 Distribuição da colheita de material de bovinos de abate em matadouro-frigorífico de Maringá – Paraná.

Foram colhidos 41 fragmentos de diferentes linfonodos para a realização de diagnóstico laboratorial, associando a lesão macroscópica com a citologia, histopatologia e microbiologia. Desses 41 fragmentos, 18 fragmentos (Grupo 1) foram coletados na linha de abate, sem conhecimento prévio da doença, sendo que com dois animais apresentaram lesões caseosas em linfonodos – figuras 1 e 2 e, 16 linfonodos com sinais de linfadenites, mas sem apresentarem

lesões caseosas Os resultados destas coletas estão na Tabela 2.

O restante, 23 amostras (Grupo 2) foram colhidas de animais encaminhados para abate sanitário por apresentarem reação positiva à tuberculose bovina através do tuberculinização intradérmica comparada. Esses animais apresentavam marcação a ferro candente com o “P” na face direita e a Guia de Trânsito Animal (GTA) indicando o abate sanitário por serem portadores de tuberculose (Tabela 3).

Segundo a Tabela 2, dos animais do Grupo 1 (18 fragmentos), observa-se que apenas dois fragmentos apresentaram lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, lesões estas caseosas. Os demais 16 fragmentos apresentavam linfadenite, onde se notava que os linfonodos estavam aumentados de tamanho, de coloração amarronzada e tumefeitos. Na análise histológica de 9 fragmentos foram observados granuloma completo típico, ou seja, com área de necrose central, com células gigantes de Langhans, envoltas por células epitelióides com macrófagos e linfócitos na periferia. Sete fragmentos mostraram-se incompletos já que havia a falta de necrose ou células gigantes de Langhans ou macrófagos/linfócitos.

Analisando a Tabela 2, no estudo citológico quatro fragmentos apresentaram células em formação de Células Gigantes (Figura 8), e 10 fragmentos apresentaram leitura compatível com granuloma. Considerou-se granuloma quando mais de 50% das células observadas eram compostas de macrófagos. Foram isolados *M bovis* em quatro amostras analisadas como positivas pela citologia.

Dos 23 bovinos (Tabela 3) com tuberculinização comparada positiva 9 apresentaram lesões macroscópicas típicas da tuberculose, sendo dois deles tomando todo o parênquima tecidual, Figura 3, ambos linfonodos mediastínicos e, 14 amostras com linfadenite inespecífica (Figuras 4 e 5). Ao

analisarmos a histologia em 12 amostras observam-se o tubérculo completo típico, ou seja, com todos os elementos que formam o granuloma tuberculoso. Considerados tubérculos atípicos seis fragmentos deixaram de apresentar as células gigantes de Langhans. E cinco fragmentos foram considerados incompletos. Citologicamente observou-se que sete fragmentos apresentaram formação de células gigantes. Microbiologicamente isolou-se de oito fragmentos o *Mycobacterium bovis* enquanto a análise do PCR identificou 9 amostras positivas para tuberculose bovina.

Na análise estatística utilizamos o pacote estatístico Minitab® (2006 Minitab Inc.) com a ferramenta de qualidade “Attribute Agreement Analysis”, quando comparados os achados macroscópicos, histopatológicos, citológicos e bacteriológicos das 41 amostras, tem-se 16 concordâncias de resultados, com valor de Kappa de 0,289022 ( $p=0,0000$ ). Os valores estatísticos podem ser observados nas Tabelas 4 e 5.

TABELA 2 - Distribuição das lesões de linfonodos e os resultados diagnósticos de 18 bovinos (Grupo 1) suspeitos de tuberculose causada por *Mycobacterium bovis*.

Linfonodo	Macroscopia	Histologia	Citologia	Microbiologia
Sm	Linfadenite	Incompleto	Inflamação crônica	Negativo
R	Linfadenite	Completo típico	Inflamação crônica	Negativo
Pe	Linfadenite	Completo típico	Inflamação crônica	Negativo
Tb	Linfadenite	Completo típico	Inflamação crônica	Negativo
Pe	Linfadenite	Incompleto	Inflamação crônica	Negativo
Pe	Linfadenite	Incompleto	Inflamação mista	Negativo
R	Caseoso	Completo típico	Células Gigantes	Positivo
Rm	Linfadenite	Incompleto	Inflamação crônica	Negativo
Pe	Linfadenite	Incompleto	Inflamação crônica	Negativo
R	Linfadenite	Incompleto	Inflamação mista	Negativo
Pe	Linfadenite	Negativo	Inflamação mista	Negativo
Tb	Caseoso	Completo típico	Inflamação crônica	Positivo
M	Linfadenite	Completo típico	Células gigantes	Positivo
Rm	Linfadenite	Incompleto	Inflamação crônica	Negativo
Rm	Linfadenite	Completo típico	Células Gigantes	Positivo
Mn	Linfadenite	Completo típico	Células Gigantes	Negativo
R	Linfadenite	Completo típico	Inflamação crônica	Negativo
R	Linfadenite	Negativo	Inflamação mista	Negativo

Sm – Submandibular; R – Retrofaríngeo; Pe – Pré-escapular; Tb – Traqueobrônquico; Rm – Retromamário; M – Medistínico; Mn – Mesentérico (MAPA, 1971).

TABELA 3 - Distribuição das lesões em linfonodos de tuberculose e os resultados diagnósticos de 23 bovinos infectados por *Mycobacterium bovis*, e positivos pela prova de tuberculinização comparada.

Linfonodo	Macroscopia	Histologia	Citologia	Microbiologia	PCR
M	linfadenite	Incompleto	Inflamação crônica	Positivo	Negativo
Pc	linfadenite	Completo típico	Inflamação crônica	Negativo	NR
Rm	linfadenite	Incompleto	Inflamação mista	Negativo	NR
Pe	caseoso	Completo atípico	Inflamação crônica	Negativo	Negativo
Pe	linfadenite	Completo atípico	Células Gigantes	Positivo	Positivo
Tb	linfadenite	Completo atípico	Células Gigantes	Negativo	Negativo
M	caseoso	Completo típico	Células Gigantes	Positivo	Positivo
M	caseoso	Completo típico	Células Gigantes	Positivo	Positivo
Pe	linfadenite	Completo típico	Inflamação crônica	Negativo	Positivo
M	caseoso	Completo típico	Inflamação crônica	Negativo	Negativo
Mn	caseoso	Completo típico	Células Gigantes	Negativo	NR
M	caseoso	Completo atípico	Inflamação mista	Negativo	NR
Pe	linfadenite	Completo típico	Inflamação mista	Negativo	NR
Pe	linfadenite	Completo típico	Inflamação crônica	Positivo	Positivo
M	caseoso	Completo atípico	Inflamação crônica	Positivo	Negativo
Tb	caseoso	Completo típico	Inflamação crônica	Negativo	Negativo
Pe	linfadenite	Completo típico	Células Gigantes	Positivo	Positivo
M	linfadenite	Completo típico	Inflamação crônica	Negativo	Negativo
M	linfadenite	Completo atípico	Inflamação crônica	Negativo	Positivo
M	linfadenite	Incompleto	Inflamação crônica	Negativo	Negativo
M	linfadenite	Incompleto	Inflamação mista	Negativo	Negativo
Tb	linfadenite	Incompleto	Inflamação mista	Negativo	Negativo
Tb	caseoso	Completo típico	Células Gigantes	Positivo	Positivo

Pc – Pré-crural; R – Retrofaríngeo; Pe – Pré-escapular; Tb – Traqueobrônquico; Rm – Retromamário; M – Medistínico; Mn – Mesentérico (MAPA, 1971).

TABELA 4 - Análise estatística de Kappa com as concordâncias entre os métodos de diagnósticos utilizados macroscopia, histologia, citologia e microbiologia.

Diagnóstico	Referência	Macroscopia	Histologia	Citologia
Histologia	Concordância	60,98%		
	Kappa	0,315		
	P	0,0026		
Citologia	Concordância	70,73%	60,98%	
	Kappa	0,2545	0,3195	
	P	0,0516	0,0026	
Cultura	Concordância	73,17%	58,54%	82,93%
	Kappa	0,3357	0,2670	0,5773
	P	0,0156	0,0125	0,0001

TABELA 5 - Análise estatística de Kappa com as concordâncias entre os métodos de diagnósticos utilizados microbiologia e cultura.

Diagnóstico	Referência	PCR
Microbiológico	Concordância	72,22%
	Kappa	0,4444
	P	0,0289

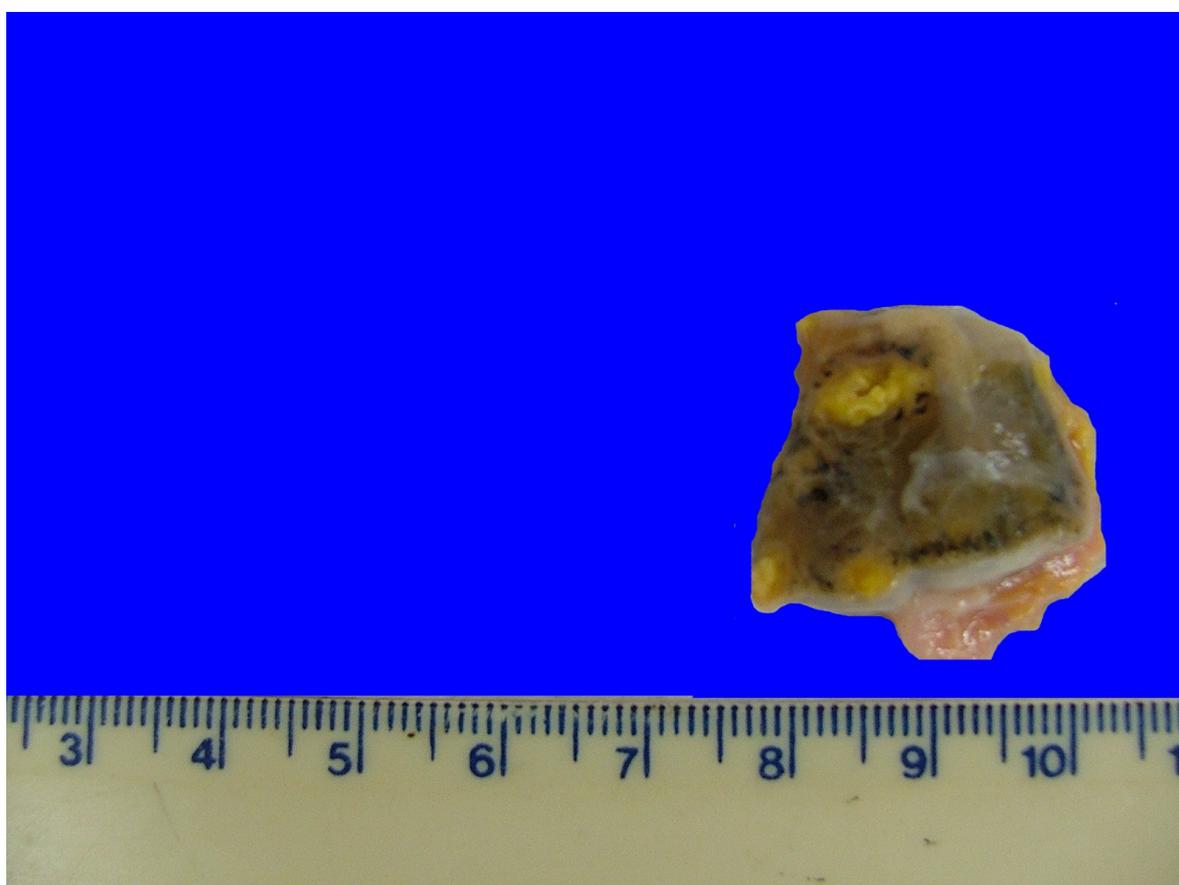


Figura 1 – Linfonodo retrofaríngeo com lesões caseosas.

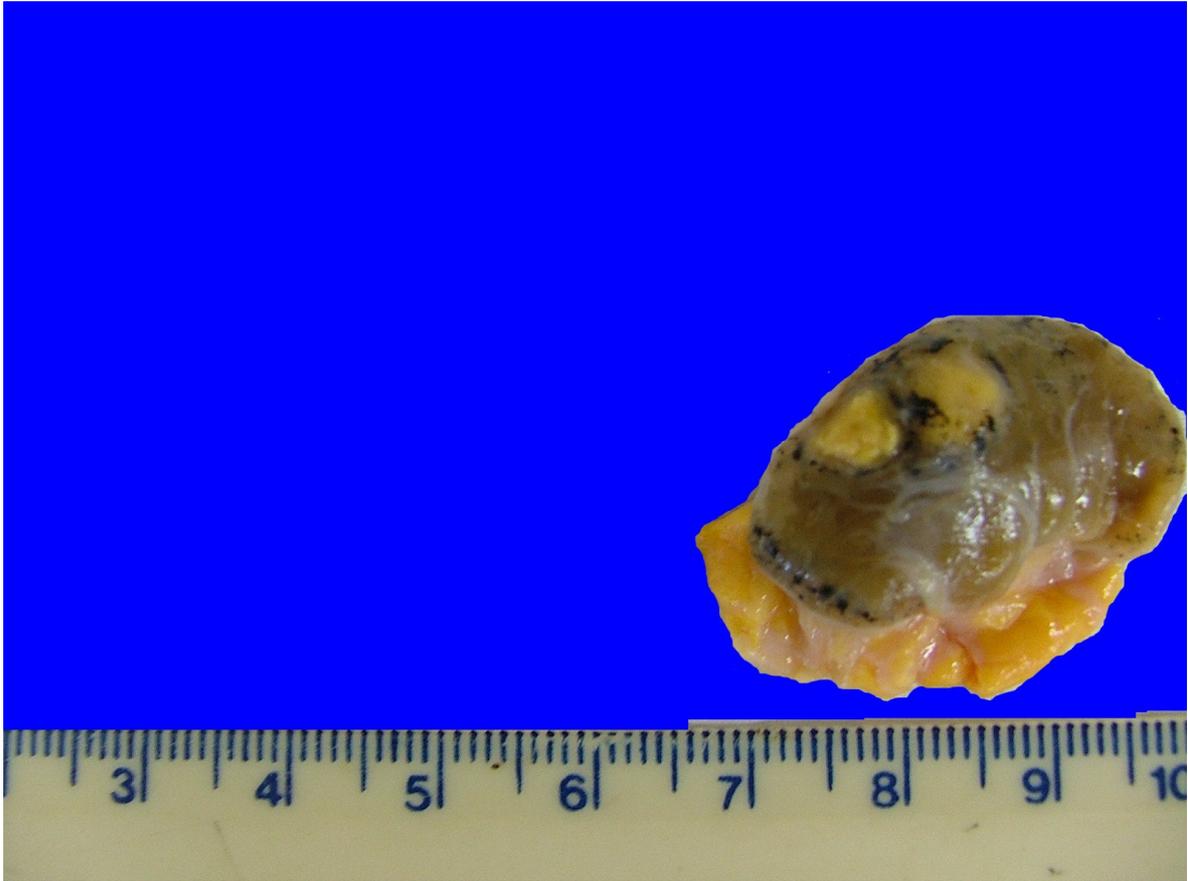


Figura 2 – Linfonodo traqueobrônquico bovino com necrose caseosa.



Figura 3 – Linfonodo mediastínico bovino com material caseoso.



Figura 4 – Linfonodo pré-escapular bovino com linfadenite.



Figura 5 – Linfonodo pré-escapular bovino com linfadenite serosa.

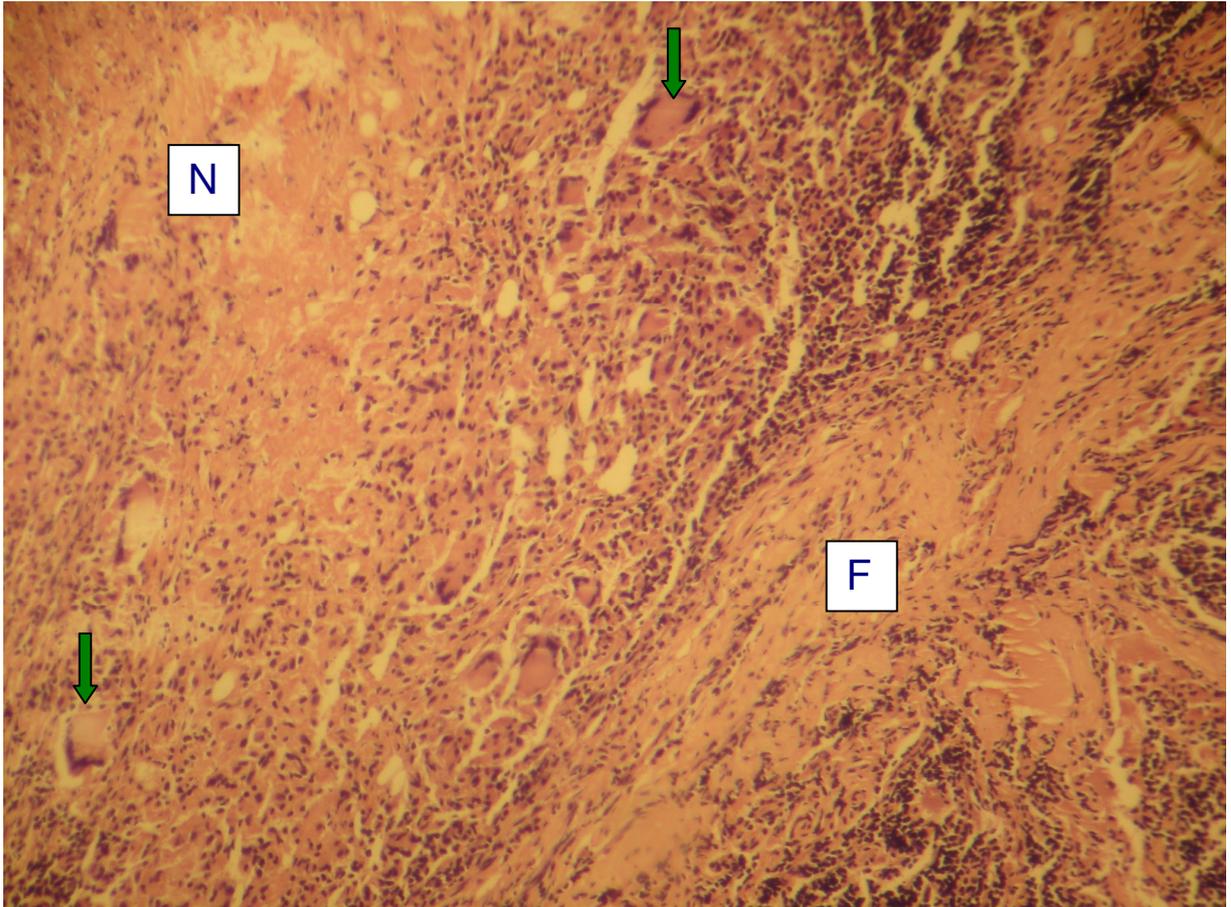
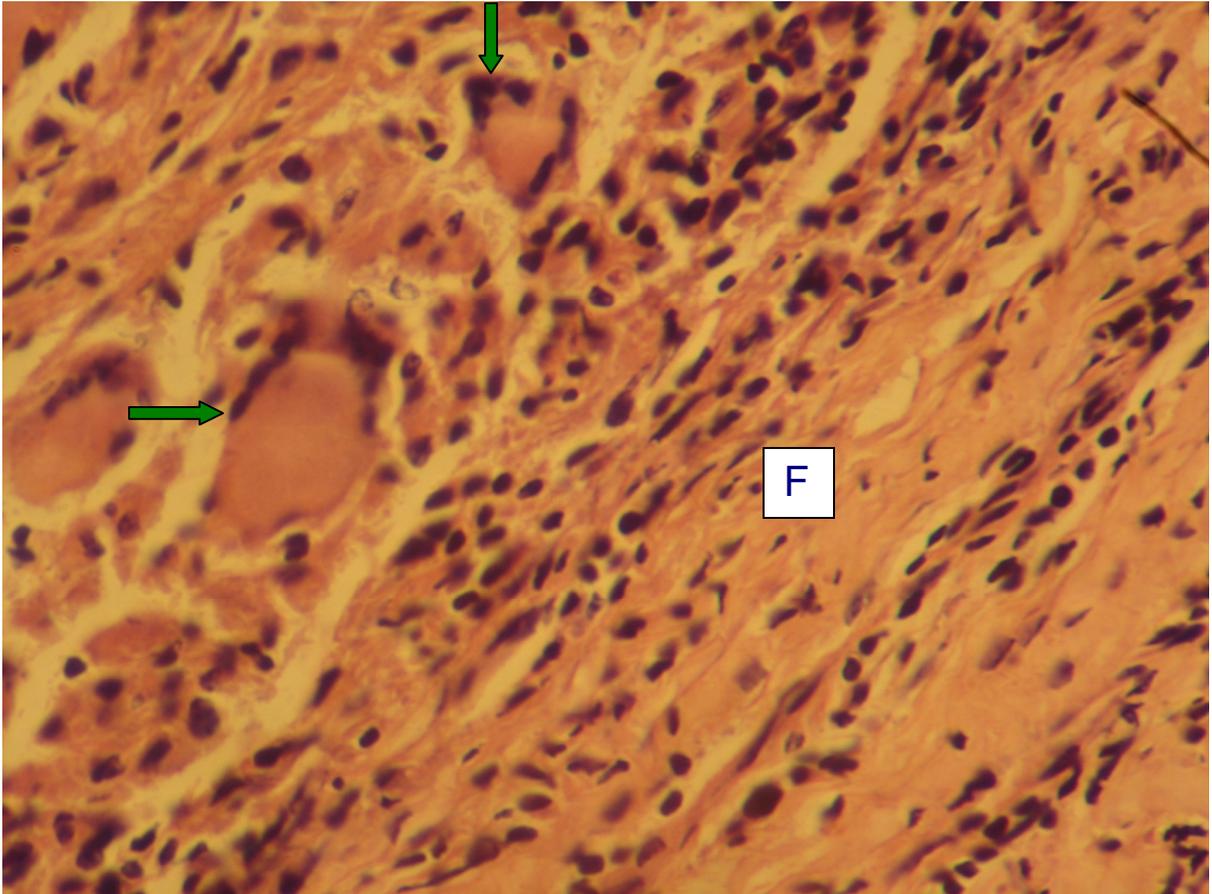
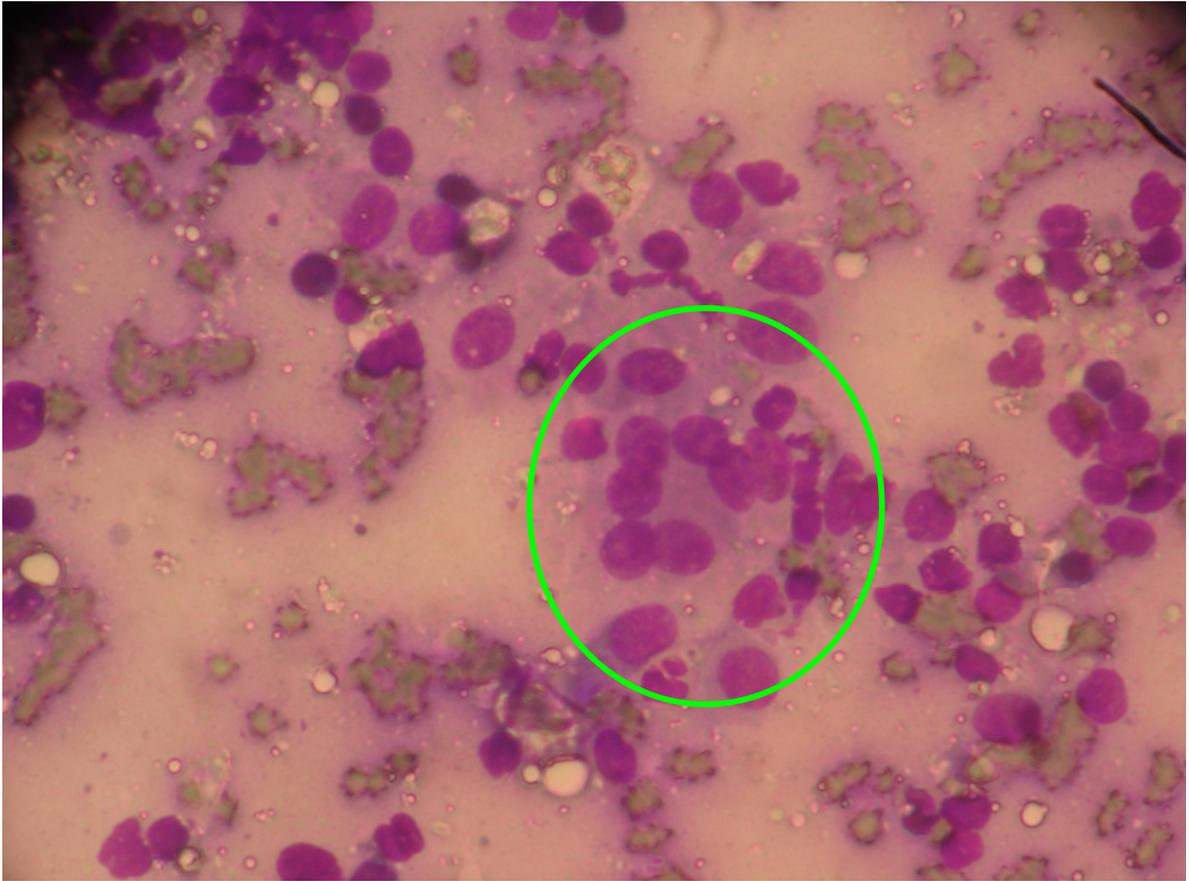


Figura 6 – Fragmento de linfonodo retrofaríngeo. Granuloma tuberculoso caracterizado por área central necrótica (N) circundada por reação inflamatória mononuclear, onde se destacam células gigantes de Langhans (seta), envolta por camada fibrosa (F) (HE. Obj. 10x).



**Figura 7** - Fragmento de linfonodo retrofaríngeo. Granuloma tuberculoso caracterizado reação inflamatória mononuclear, onde se destacam células gigantes de Langhans (seta), envolta por camada fibrosa (F) (HE. Obj. 40x).



**Figura 8** - Aspirado de linfonodo pré-escapular. Citopatologia caracterizada por área de reação inflamatória mononuclear, onde se destacam formação de célula gigante (círculo) (Giemsa. Obj. 40x).

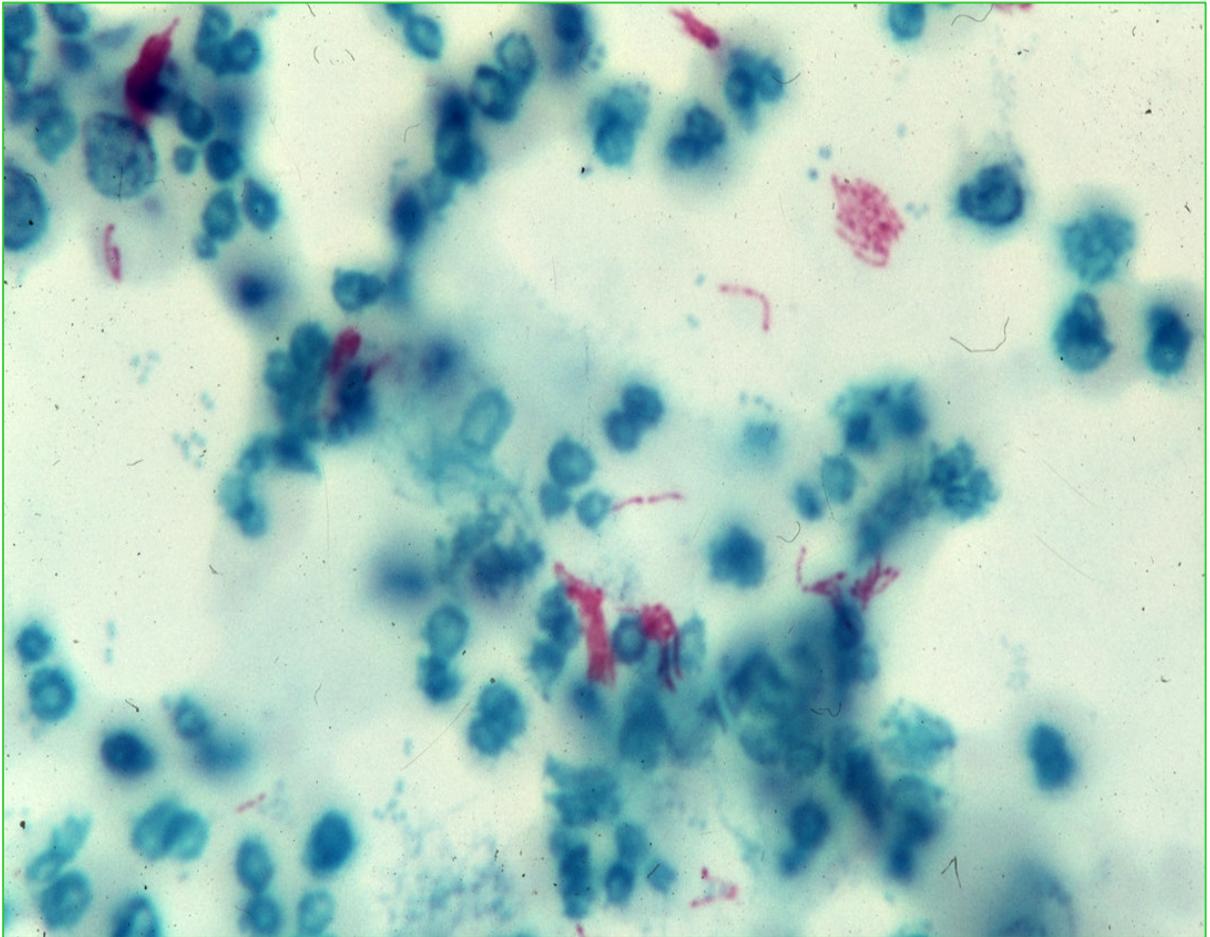


Figura 9 – Bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR) (Ziehl-Nielsen, Obj 100x) Fonte UEM, 2006.

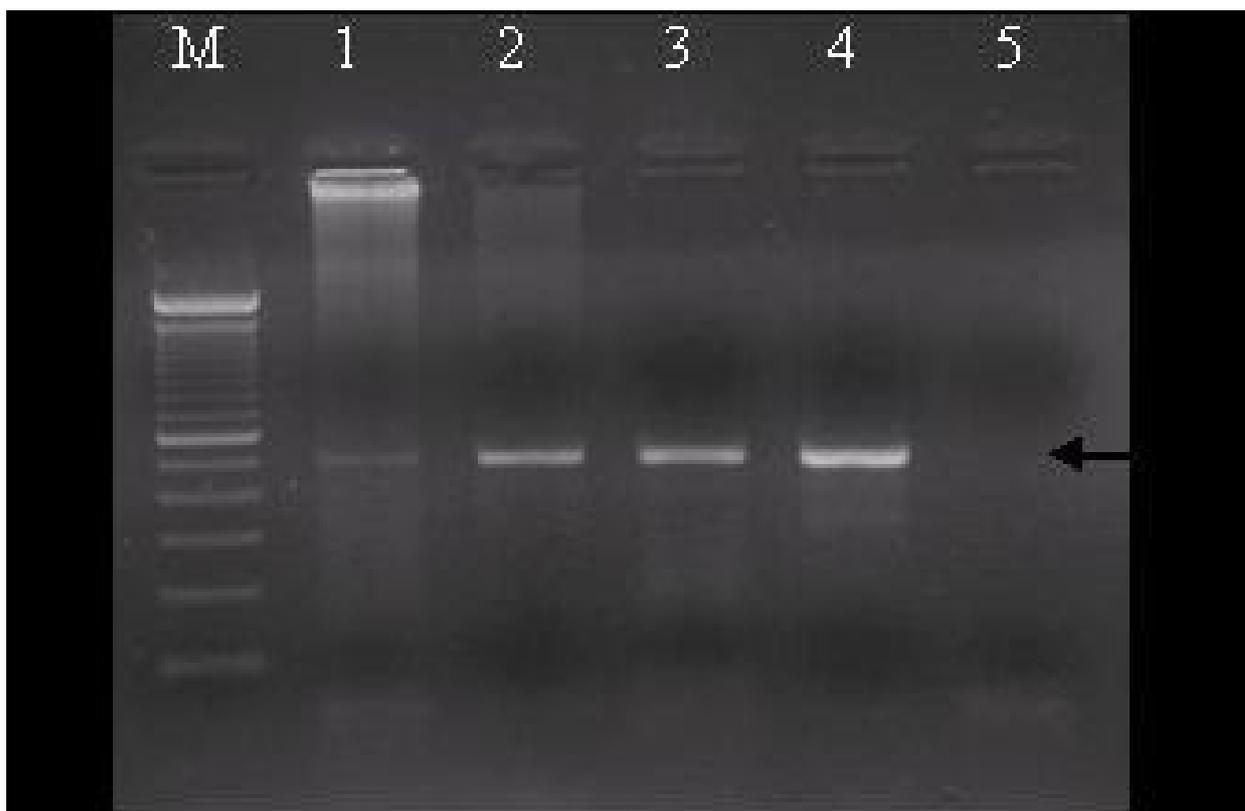


Figura 10 – PCR: M – Padrão molecular; 1 – amostra testada; 2,3 e 4 controles positivos e 5 controle negativo. (Fonte:UEM, 2006)

## 6. Discussão

A taxa de tuberculose de 0,00148% em animais de matadouro-frigorífico na região norte do Paraná, de 2004 a 2006, está abaixo do esperado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que durante o período de 1986 a 1996 cita a prevalência de 0,9 a 1,4% (BRASIL, 2003). Resultados acima encontraram Alvim e Pinheiro Junior (2004) estudando bovinos de abate no Pará, com índice de 1,4% entre os anos de 2003 a 2004. Entre os anos de 1993 a 1997 a prevalência de tuberculose de bovinos de abate em Minas Gerais foi descrita por Baptista et al. (2004) em 0,8% e 0,4% em Goiás.

Macroscopicamente o linfonodo é descrito como hipertrofiado, contendo numerosos focos caseosos, mineralizados ou liquefeitos com diâmetro de 1 a 40mm. Em geral a liquefação ocorre em lesões com mais de 10mm de diâmetro (CASSIDY et al., 1999). Neste trabalho 26,82% (11/41) linfonodos (Figuras 1 a 3) apresentaram esse material caseoso, sendo dois com confluência do material tomando todo o tecido do linfonodo. Os demais linfonodos, 73,17% (30/41) apresentaram linfadenite inespecífica (Figuras 4 e 5). Segundo Reis et al. (1996) os diagnósticos macroscópicos de linfadenites dados na linha de inspeção quando confrontados com os microscópicos representam 37,93% de erros de diagnósticos.

O exame do sistema linfático é importante por diversas razões já que apresentam lesões características de determinadas doenças tais como a tuberculose. O sistema linfático participa de processos patológicos dentro de uma área de drenagem com reações alterativas tais: edema simples (hipertrofiado e tumefeito), linfadenite aguda (hipertrofiado, mole, tumefeito, hiperplasia linfóide), congestão hemorrágica (congestão hemorrágica), linfadenite hemorrágica (exsudato gelatinoso hemorrágico), linfadenite purulenta ou supurada (fluidificação do parênquima) ou linfadenite parasitária (GIL, 2002). Prata e Fukuda (2001) descrevem como normal o linfonodo de cor cinza clara ou cinza amarelada devido à presença de gordura, tendo consistência firme e úmida. Gil (2002) descreve que

todos os linfonodos devem ser examinados pormenorizadamente, com incisões múltiplas. Reis et al. (2000) descrevem que qualquer processo reacional do sistema linfático de bovinos deve ser alvo de redobrada atenção na rotina de Inspeção Sanitária *post mortem* e que os possíveis erros de diagnósticos macroscópicos sugerem a utilização rotineira da histopatologia como método auxiliar na inspeção.

Estímulos de diversas naturezas ocasionam a formação de centros de reação de estrutura específica (folículo secundário) e a produção abundante de linfócitos, que penetram até o seio entre as células limítrofes das substâncias cortical e medular. Quando houver uma lesão e como conseqüência uma inflamação em qualquer região do corpo, imediatamente os linfonodos regionais interferem neste processo, hipertrofiando-se. Desencadeia-se o processo de linfadenite, que pode ter a presença de pus, sais de cálcio, massa caseosa, segundo o tipo e a progressão da doença. O número de linfonodos alterados, sua localização e a natureza da lesão orientam o inspetor na direção da infecção e, principalmente no julgamento da carcaça (PRATA E FUKUDA, 2001). Na presente pesquisa 26,82% (11/41) dos linfonodos apresentaram-se com massa caseosa.

A inflamação do linfonodo é denominada de linfadenite. A linfadenite hiperplásica revela um aumento do volume do órgão, com maior tensão da cápsula e consistência do órgão que apresenta-se hiperêmica e com petéquias. A superfície de corte é úmida e faz proeminência sob a cápsula; sendo de cor vermelho parda, uniforme ou manchada de pontos lardáceos ou branco acinzentados, os quais correspondem aos folículos linfóides. Foram observados 73,17% (30/41) linfonodos com as características citadas por Santos (1979) e Gil (2000).

Os linfonodos que obtiveram maiores índices de positividade sugestivos de tuberculose frente à análise macroscópica ou histológica ou microbiológica foram mediastínico 19,51% (8/41); pré-escapular/cervical superficial 14,63% (6/41);

traqueobrônquico 12,19% (5/41); retrofaríngeo 7,31% (3/41); mesentérico, 4,87% (2/41) e retro-mamário e pré-crural com 2,43% (1/41) cada. Diferentemente dos encontrados por Millan-Suaso (2000) 49,2% retrofaríngeo, 24,4% mediastínico, 6,4% mandibular, 3% traqueobrônquico 2,4% e mesentérico. Nota-se que os valores se aproximam dos linfonodos mediastínicos e mesentéricos.

De Sousa et al. (2003), descrevem a maior incidência em linfonodos mediastínicos 42,9%, valores próximos ao de Millian-Suaso (2000), seguido por 14,5% do pré-escapular, 7,4% do retrofaringeos, valores estes próximos ao do presente estudo. Linfonodos retromamário e pré-crural com 1,55% e 1,25% respectivamente, valores estes próximos ao desta pesquisa. Teklu et al. (2004) descrevem 42,6% nos traqueobrônquicos, 34,4% mediastínico, 9,8% retrofaríngeo, 3,3% mesentéricos, 1,6% pré-escapular. Os linfonodos retrofaringeos e mesentéricos aparecem com valores próximos ao presente estudo.

Neste trabalho foram observadas células gigantes de Langhans em 56,09% (23/41) fragmentos analisados, sendo 50% (9/18) fragmentos do Grupo 1 e 52,17% (12/23) do Grupo 2. A primeira reação do tecido a agressão pelo *M. bovis* é a infiltração de células polimorfonucleares, substituída em poucas horas ou dias pelas células epitelióides, semelhantes morfológicamente às células epiteliais. Estas células epitelióides englobam o bacilo tuberculoso e migram ao foco inflamatório devido ao pH ácido ocasionado pelos ácidos graxos da cápsula bacteriana (SANTOS, 1979). Porém, segundo Potel (1974) é devido à decomposição do bacilo com a liberação de substâncias que desencadeariam a proliferação de células epitelióides em células gigantes de Langhans. Correa e Correa (1992) descrevem a modulação de macrófagos em células epitelióides e em pequena quantidade em células gigantes de Langhans. Tizard (2002) descreve que os macrófagos se acumulam em grande número ao redor do material persistente, lembrando histologicamente às células epitelióides. Estas se fundem para formar células gigantes multinucleadas quando tentam englobar partículas

demasiadamente grandes, caracterizando o tubérculo. Neste caso resultam de *Mycobacterium tuberculosis* persistente no tecido.

Na necrose caseosa não se reconhece à estrutura do tecido, com massa de aspecto acidófilo, homogêneo e amorfo. Periféricamente há detritos celulares granulados, amorfos e eosinófilos (PIRES et al., 2004). Em 4,87% (2/41) dos fragmentos pode-se observar a presença de eosinófilos, um com discreta intensidade e outro com acentuada intensidade junto ao aglomerado de macrófagos.

O aspecto homogêneo e amorfo é devido à morte celular, decomposição protéica e ação química dos compostos membranosos dos bacilos podendo-se observar hemorragia e calcificação distrófica (PIRES et al., 2004). A hemorragia foi observada considerando a presença de hemossiderina em 12,19% (5/41) fragmentos da presente pesquisa. A calcificação também é descrita por Neill et al. (1994a); Cassidy et al. (1999); Ameni et al (2000) e Cassidy (2006). No presente trabalho em 58,53% (24/41) fragmentos notaram-se a presença de calcificação.

Milikowski e Berman (1997) diferentemente de Pires et al. (2004) descrevem detritos celulares amorfos e granulares no centro do granuloma, em três fragmentos notou-se esse detrito celular.

Segundo Coelho (2002) entre a 3<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> semanas, o tubérculo está completamente formado. Este será considerado completo se apresentar todos os elementos tais como necrose caseosa, infiltrado linfocitário, plasmocitário e macrofágico, células epitelióides e células gigantes de Langhans. É incompleto quando faltar um dos três elementos, necrose caseosa, células gigantes de Langhans ou macrófagos. Será típico quando existir célula gigante e, atípico quando essa faltar.

Considerando as descrições de Coelho (2002) neste trabalho dos 41 fragmentos pesquisados; 51,21% (21/41) fragmentos foram considerados tubérculos completos típicos, ou seja, com todos os elementos; necrose caseosa, linfócitos, plasmócitos, células epitelióides e células gigantes de Langhans (Figuras 6 e 7). Concordando também quando se descreve que as células gigantes de Langhans apresentam-se com múltiplos núcleos que se dispõem na periferia do citoplasma dando aspecto de ferradura (SANTOS, 1979; CORREA & CORREA, 1992; MILIKOWSKI & BERMAN, 1997; PIRES et al., 2004). Essas células aparecem entre sete e 11 dias pós-infecção (NEILL et al., 2001).

As células gigantes de Langhans estarão adjacentes ao centro necrótico (MILIKOWSKI & BERMAN, 1997; COELHO, 2002). Ao redor das células epitelióides e gigantes aparecem os linfócitos que formam uma barreira envolvendo a área da lesão (SANTOS, 1979; GIL, 2000; Coelho, 2002), abundantemente entre os dois primeiros meses (SANTOS, 1979). Coelho (2002) e Pires et al. (2004) descrevem também a presença de plasmócitos; além de fibrócitos descritos por Saunders e Coopers (2000). Neutrófilos isolados ou agregados foram observados na periferia da necrose (CASSIDY et al., 1999).

Na ausência das células gigantes de Langhans, o tubérculo é histologicamente completo atípico (COELHO, 2002); o presente trabalho observou em 14,63% (6/41) dos fragmentos analisados. Em 29,26% (12/41) dos fragmentos foram considerados um tubérculo incompleto. Em 4,87% (2/41) dos fragmentos não havia alterações histológicas.

Os tubérculos podem confluir, formando nódulos maiores. Com o progredir da lesão, desenvolvem-se simultaneamente tecido conjuntivo fibroso na periferia e necrose caseosa centralmente (COELHO, 2002 e PIRES et al., 2004). É o grau de necrose central que dá ao tubérculo a especificidade histopatológica (COELHO, 2002). No presente trabalho a necrose foi observada de forma extensiva em

39,02% (16/41) dos fragmentos, enquanto que em 34,14% (14/41) apresentava-se de forma moderada a discreta.

Santos (1979) divide os tubérculos em forma exsudativa; que se observam caseificação primária, sem tecido de granulação específico, com infiltração leucocitária. Nas formas produtivas microscopicamente observa-se tubérculos típicos, tecido de granulação e caseificação (SANTOS, 1979). Os 26,82% (11/41) dos fragmentos que pela análise de Coelho (2002) foram considerados tubérculos incompletos pela análise de Santos (1979) seriam considerados tubérculos de forma exsudativa.

Latini et al. (1997) ao analisarem histopatologicamente 229 amostras suspeitas de tuberculose obtiveram 203 amostras com granuloma típico da tuberculose, oito como linfadenite crônica, sete actinobacilose, cinco seriam tecido de granulação, quatro abscessos e uma amostra granuloma parasitário e uma como neoplasia pulmonar. O exame histológico na tuberculose tem alta sensibilidade e, devido à presença de outros agentes que desencadeiam o granuloma, a especificidade pode estar diminuída (LATINI et al., 1997), onde encontraram concordância de 88,6% de achados histopatológico em lesões sugestivas de tuberculose de matadouro-frigorífico. Dados estes semelhantes aos de Miranda et al. (1997) que descrevem 92,45% de correlação de lesões granulomatosas com achados histopatológicos. No presente trabalho obtivemos uma correlação de 72,72% (8/11), valores acima dos descritos por Claxton et al. (2002) que encontraram 59,2%.

Anda et al. (1997), ao implantarem o uso da histopatologia em matadouro-frigorífico no México, elevaram os achados de prevalência da tuberculose bovina de 48% para 76%, como melhoria dos métodos de diagnóstico. Ao realizar-se o exame histopatológico nos 41 fragmentos aumentamos os achados de lesões tuberculosas de 26,82% (11/41) para 51,21% (21/41) quando considerados os

tubérculos completos. Se levamos em conta os tubérculos completos e os incompletos este índice é de 65,85% (27/41).

Das lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose, Pinto et al. (2002) encontraram 38,7% de achados histológicos compatíveis com a doença. De 1.313 fragmentos analisados como suspeita de tuberculose analisados pelo laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Uberlândia somente 5%, na análise microscópica, tiveram resultado positivo para tuberculose (COELHO, 2002). Enrico et al. (1980) no Uruguai ao analisarem 186 amostras provenientes de matadouro-frigorífico confirmaram o diagnóstico através da histologia em 25,26%.

O baixo grau de isolamento bacteriano (28,57%) em relação ao achados histológicos (51,21%) deste trabalho pode ser explicado por Corner (1994) e Araújo et al. (2005) que explicam que o material tem que chegar ao laboratório na melhor condição possível. A perda da viabilidade de bacilos durante a coleta, conservação ou descontaminação, podendo o descontaminante destruir ao redor de 90% das micobactérias é citada por Latini et al. (1997). Segundo Balian et al. (1997), a ausência de micobactérias pode estar associada à deficiência do método de isolamento com morte na descontaminação ou dificuldade de se multiplicar o cultivo; morte da micobactéria após promover a lesão, pela defesa do próprio organismo e, lesão causada por outro tipo de microorganismo.

Segundo CPZ (1988) as micobactérias são sensíveis ao hidróxido de sódio utilizado no método Petroff, método este utilizado no presente estudo. Araújo et al. (2005) descrevem valores de isolamento bacteriano similares aos do presente trabalho, 23,6% contra 28,57% justificando que os tecidos podem conter somente poucas bactérias. Milian-Suazo et al. (2000), relatam que na bacteriologia negativa com histologia positiva deve-se atentar para a possibilidade da presença de outras micobactérias.

A partir de lesões macroscópicas de lesões sugestivas de tuberculose em bovinos de abate, Morales et al. (2005), obtiveram cultivo positivo para *M. bovis* em 22,15% (39/176), enquanto Pinto et al. (2002), de 50 amostras analisadas isolaram o *M. bovis* de 12%, justificando que o baixo número de bactérias encontradas na lesão no momento da coleta pode ter contribuir para o baixo índice de isolamento. Porém no presente trabalho em ambos os grupos obtêm-se 54,54% (6/11) de cultura positiva para *M. bovis*, valor acima dos citados pelos demais pesquisadores. Porém quando se analisam os dados dos cultivos microbiológicos de animais sem lesões macroscópicas encontra-se 20% (6/30) de animais microbiologicamente positivos. Valor este acima do mencionado por Corner (1994) que descreve que 10% dos animais sem lesões macroscópicas podem apresentar cultura positiva para *M. bovis*. Esses resultados demonstram que mesmo com um valor baixo, os isolamentos bacterianos ficaram acima dos encontrados por outros pesquisadores.

Na análise citológica observamos dos 41 fragmentos 26,82% (11/41) com células gigantes, sugestivas de tuberculose, com 81,81% (9/11) das amostras com comprovação da histopatologia, 72,72% (8/11) pela microbiologia. Das 19 amostras submetidas ao PCR, 50% (9/18) foram PCR negativas, 27,77% (5/18) foram positivas para a citologia e o PCR, enquanto 22,22% (4/18) forma positivas ao PCR e negativas a citologia. Quando mais que 15% das células inflamatórias estão presentes, além de células gigantes, Tyler et al. (1998) alertam para o risco de infecção fúngica, infecção por *Actinomyces* ou *Nocardia* spp. corpo estranho ou outras causas de inflamação granulomatosa têm que ser levada em consideração

Em 39,02% (16/41) observou-se acentuada quantidade de macrófagos que são classificados como inflamatório crônico. Os processos inflamatórios crônicos são caracterizados pela presença de um número variável de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, sendo 50% células mononucleares. Em alguns casos pode ser granulomatosa, especialmente quando há predomínio de macrófagos, ou presença de células epitelióides ou gigantes no esfregaço (TYLER et al., 1998).

O diagnóstico citológico baseia-se na análise das células, independente da arquitetura do tecido ou órgão (BANKS, 1992), servindo para diferenciar processos inflamatórios agudos e crônicos e entre neoplasias benignas e malignas (ROCHA, 1998). A citologia caso não seja de diagnóstico definitivo, indica o prognóstico e a conduta a ser tomada pelo clínico (PELETEIRO e RODRIGUES, 1991) no caso de nosso trabalho, pode auxiliar na conduta do inspetor. É um método de diagnóstico rápido, de fácil realização, podendo ser executado em até 30 minutos. Além disso, requer pequena quantidade de material para ser realizado, com custo relativamente baixo, e em média 30% menor do que na histopatologia (ROCHA, 1998). Carvalho et al. (2001) encontraram concordância em 82% entre a análise histopatológica e citológica na rotina de inspeção *post mortem* em matadouros, números concordantes com o presente trabalho 81,81%.

A detecção da tuberculose em bovinos de matadouro requer a presença de lesões macroscópicas em sítios de rotina de inspeção, porém nem todos os bovinos infectados têm lesões macroscópicas (WHIPPLE et al., 1996; CASSIDY et al., 1999). WHIPPLE et al. (1996) ao analisarem 90 fragmentos de linfonodos de animais positivos para a prova de tuberculinização encontraram os seguintes resultados: 8,88% (8/90) amostras positivas para as três provas (macroscopia, histopatologia e cultura); 10% (9/90) amostras positivas para macroscopia e histologia; 7,77% (7/90) amostras positivas para a cultura e 73,33% (66/90) amostras foram negativas para todos os testes. No Grupo 2 (tuberculinização) com 23 animais, deste trabalho encontrou-se 13,04% (3/23) de resultados concordantes para as três provas, 26,08% (6/23) para macroscopia e histologia; 8,69% (2/23) positivos para cultura somente e, 26,08% (6/23) das amostras negativas para todos os testes.

Ao compararmos os resultados encontrados, para histopatologia, microbiologia e PCR nas 23 amostras da Tabela 3, com os descritos por Morales et al. (2005) nas técnicas de histopatologia, microbiologia e PCR os seguintes

índices respectivamente, 29,0%, 22% e 56%, no presente trabalho teríamos 52,17% (12/23), 34,78% (8/23) e 47,36% (9/19). Ao contrário de Romero et al. (1999) que descrevem que o PCR é 28,5 vezes mais eficaz que a bacteriologia e a histologia no diagnóstico da tuberculose. E também por Zanini et al. (2001) que descrevem que a PCR detectou em 60% das amostras que falharam na cultura. Resultados pobres na PCR podem ser explicados por Kolk et al. (1992) que descrevem que contaminantes atrapalham o processo de amplificação e que impurezas na solução do DNA interferem com o resultado da PCR. E segundo Boom et al. (1999) o uso de *GUSCN-diatomeaceus* sem caseína reduz a eficiência do diagnóstico da PCR em 20 a 30%.

Na Austrália 22% dos casos de tuberculose somente são detectados no laboratório (CORNER et al., 1990). No presente estudo detectamos o índice de 50% (15/30) quando associados a histologia e a cultura microbiana e 53,33% (16/30) quando associado ao PCR.

A detecção da tuberculose em bovinos no matadouro frigorífico é dependente de lesões macroscópicas, porém nem todos os bovinos infectados desenvolvem lesões visíveis nos linfonodos cujos sítios são examinados. À medida que os programas de erradicação avançam é mais difícil de se notar às lesões macroscópicas afirmam Whipple et al. (1996); nem todo animal com tuberculose tem lesões visíveis macroscópicas. McIlroy et al. (1986) pequenas lesões só poderão ser detectadas com um exame sofisticado, incluindo exame microscópico.

Pode-se observar que nem sempre as lesões macroscópicas são encontradas em bovinos cujos tecidos foram observados tubérculo típico, isolamento e PCR positivos para *M bovis* e células gigantes nos achados citológicos.

## 7. Conclusões

1) No período de 2004 a 2006 a prevalência de tuberculose em matadouro-frigorífico foi baixa.

2) Nem sempre animais tuberculosos em matadouro-frigorífico apresentam lesões macroscópicas.

3) os linfonodos mais afetados foram mediastínico e pré-escapular.

4) A PCR apresenta bons resultados, porém o custo e laboratórios especializados inviabilizam o seu uso na rotina de matadouros-frigoríficos.

5) Devido a baixo custo e a rapidez dos resultados recomenda-se o uso da citologia e histopatologia como método auxiliar em matadouros-frigoríficos.

6) Em casos positivos da citologia e ou histopatologia recomenda-se a condenação da carcaça.

## REFERÊNCIA

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

ALVIM, N.A.; PINHEIRO JUNIOR, O.A. Incidência de carcaças de bovinos acometidos por brucelose e tuberculose no sul do Pará. Arq. Cien. Vet. Zool. UNIPAR, v. 7, suplemento 1, p. 64-82, 2004.

AMENI, G.; MIÖRNER, H.; ROGER, F. & TIBBO, M. Comparasion between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. Trop. Anim. Health Prod., v. 32, 267-276, 2000.

ANDA, J.H.; EVANGELISTA, T.R.; VALÊNCIA, G.L.; HODGERS, M.M. An abattoir monitoring system for diagnosis of tuberculosis in cattle in Baja California. Aust Vet J, v. 211. n. 6, p. 709-711, 1997.

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

ASHFORD, D.A.; WHITNEY, E. & RAGHUNATAN, P.; COSIVE, O. Epidemiology of selected mycobacteriu that infect humans and other animals. In: Mycobacterial infections in domestic and wild animals. O.I.E., Rev Sci et Tech, v. 20, n. 1, April, 2001.

BALIAN, S.C.; RIBEIRO, P.; VASCOCELLOS, S.A.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA NETO, J.S.; GUERRA, J.L. et al. Linfadenites tuberculóides em suínos abatidos no estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias. Rev. Saúde Pública, v. 31, n. 4, p. 391-397, 1997.

BANKS, W.J. Histologia Veterinária aplicada. 2 ed. São Paulo:Manole. Introdução à citologia esfoliativa. 1991, p.620-629.

BAPTISTA, F.; MOREIRA, E.C.; SANTOS, W.L.M, NAVEDA, L.A.B. Prevalência da tuberculose em bovinos abatidos em Minas Gerais. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 56, n. 5, p. 577-580, 2004.

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

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; van DILLEN, P.M.E.; WERTHEIN, J.; van der NOORDAA, J. Rapid e simple method or purification of nucleic acids. J Clin Microbiol., v. 28, p. 495-503, 1990.

BRASIL – RIIPOA. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de origem Animal – 1952 – Decreto 30961 de 29.03.52. Ministério da Agricultura.

BRASIL – Normas de Padronização de Técnicas, Instalações e Equipamentos do Ministério da Agricultura, 1971.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT, 2003.

BROWN, W.H. e de ANDA, J.H. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. JAVMA, v. 212, 557-559, 1998.

CARDOSO, M.A. Detecção e identificação de *Mycobacterium bovis* em linfonodos de bovinos pela reação em cadeia da polimerase. Dissertação de mestrado, UEM, 2006.

CARVALHO, A.S.; SILVA, S.M.M.S.; SILVA, A.A.; KELIN JUNIOR, M.H. Uso do exame citológico na rotina de inspeção *post mortem* em matadouros. In; X Encontro Nacional de Patologia Veterinária – X ENAPAVE, 2001, Pirassununga – SP. X Encontro de Patologia Veterinária – X ENAPAVE, 2001, v. 1, p. 143.

CASSIDY, J.P. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. Vet Microbiol, v. 112, p. 151-161, 2006.

CASSIDY, J.P.; BRYSON, D.G.; CANCELA, M.M.G.; FORSTER, F.; POLLACK, J.M.; NEILL, S.D. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. J. Comp. Pathol., v. 124, p. 46-51, 2001.

CASSIDY, J.P.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M.; EVANS, R.T.; FORSTER, F.; NEILL, S.D. Lesion formation in cattle infected by exposure to calves inoculated with *Mycobacterium bovis*. J Comp Pathol., v. 11, p. 321-327, 1999.

CASSIDY, J.P.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M.; EVANS, R.T.; FORSTER, F.; NEILL, S.D. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. J. Comp. Pathol., v. 119, p. 27-44, 1998.

CHAN, J.; TANAKA, K.; CARROL, D.; FLYNN, J. & BLOOM, B.R. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun., v. 63, n. 2, p. 736-740, 1995.

CHARLESTON, B., HOPE, J.C., CARR, B.V. & HOWARD, C.J. Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. Vet Rec, v. 149, 481-484, 2001.

CLAXTON, P.D.; EAMENS, G.J.; MYLREA, P.J. Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis. Australian Veterinary Journal, v. 55, p. 514-519, 1979.

COELHO, H.E. Patologia Veterinária. Barueri:Manole, 2002, 234p.

COLLINS, J.D. Factors relevant to *M bovis* eradication. Irish Vet J. v. 49, p. 241-243, 1996.

COLLINS, D.M.; RADFORD, A.J.; LISLE, G.W.; BILLMANN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. Vet Microbiol. v. 40, p. 83-94, 1994.

CORREA, W.M. e CORREA, C.N.M. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. 2ed. Rio de Janeiro:Medsi, 1992. p. 313-323.

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

CORNER, L.A., MELVILLE, L., McCUBBIN, K., et al. Efficiency of inspection procedure for the detection of tuberculosis lesions in cattle. Aust Vet J, v. 67, 389-392, 1990.

COSTELLO, E., DOHERTY, M.L., MONAGHAN, M.L. et al. A study of cattle-to-cattle transmission in *Mycobacterium bovis* infection. Vet J, v. 155, p. 245-250, 1998.

COTTER, T.P.; SHEEHAN, S.; CRYAN, B.; O'SHAUGHNESSY, E.; CUMMINS, H.; BREDIN, C.P. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in human in the south-west region of Ireland: is there a relationship with infection prevalence in cattle? Tubercle and Lung Disease. v. 77, p. 545-548, 1996.

COVISI, O., GRANGE, J.M., DABORN, C.J. et al. Zoonotic tuberculosis due to *M bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis., v. 4, p. 59-70, 1998.

COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H. Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. 2ed. Sant Louis: Mosby, 1998, 338p.

CPZ. Centro Panamericano de Zoonosis. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis III. Sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a las Drogas. La Identificación de Micobacterias, Buenos Aires, 1988, 29p.

DABORN, C.J. e GRANGE, J.M. HIV/AIDS and its implication for the control of animal tuberculosis. British Vet J, v. 149, p. 405-417, 1993.

DABORN, C. Tb in humans and domestic animals in the developing world. In: Tuberculosis in Wildlife and domestic animals, ed. F GRIFFIN and G. DE LISLE. Dunedin:University of Otago Press, 1995.

DANNENBERG Jr, A.M. Pathophysiology: basic aspects. In: Scholossberg, D. (Ed.), Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterium infections. 4ed. Philadelphia:W.B.Saunders, 1999, p. 17-47.

De LISLE, G.W.; WILSON, T.; COLLINS, D.M.; BUNDDLE, B.M. Vaccination of guinea pigs with nutritionally impaired avirulent mutants of *Mycobacterium bovis* protects against tuberculosis. *Infect Immun*, v. 67, 2624-2626, 1999.

DIELI, F.; TROYLE-BLOMBERG, M.; IVANYI, J.; FOURNIE, J.J.; BONNEVILLE, M.; PEYRAT, M.A.; SIRECI, G.; SALERMO, A. Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.*, v. 30, p. 1512-1519, 2000.

DUNGWORTH, D.L. In: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy & N. Palmer (Ed), Pathology of Domestic Animals. 4 rd Ed. V.2, Academic Press, Orlando, p.645-652, 1995.

ENRICO, F.; PERDOMO, E.; BERMUDEZ, J.; PAULLIER, C.; BARRIOLA, J. Tuberculosis lesions among cattle in Uruguai. *Vet Uruguai.*, v. 16. n. 72, p. 21-24, 1980.

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

FAYYAZI, A.; EICHMEYER, B.; SORURI, A.; SCHWEYER, S.; HERMS, J.; SCHWARZ, P.; RADZUN, H.J. Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *J. Pathol.*, v. 191, p. 417-425, 2000.

FENHALLS, G.; WONG, A.; BEZUIDENHOUT, J.; van HELDEN, P.; BARDIN, P.; LUKEY, P.T. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculosis granulomas. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 2827-2836, 2000.

GIL, J.F. Manual de Inspeção Sanitária de Carnes. 2ed. Lisboa:Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. v.2. 485p.

GOMES, A.A. Situação da tuberculose humana no Brasil. Encontro Mineiro sobre Tuberculose Bovina, Belo Horizonte, 1998.

GRANGE, J.M. e YATES, D.M.. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol.*, v. 40, p. 137-151, 1994.

GRIFFIN, J.M.; HAHESY, T.; LYNCH, K.; SALMAN, M.D.; McCARTHY, J. e HURLEY, T. The association of cattle husbandry practices, environmental factors

and farmer characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland. *Prev. Vet. Med.* v. 17, p. 145-160, 1993.

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

HERNANDEZ, J.; BACA, D.. Effect of tuberculosis on milk production in dairy cows. *JAVMA*, v. 213, n. 6, p. 851-854, 1998.

JANEWAY JUNIOR, C.A.; TRAVERS, P.O.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D. *Imunobiologia. O sistema imunológico na saúde e na doença.* 5ed. Porto Alegre:ARTMED, 2002, 824p.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia Veterinária.* São Paulo:Manole, 2000, 1415p.

KANTOR, I.N., NADER, A., BERNARDELLI, A. et al., Tuberculous infection in cattle not detected by slaughterhouse inspection. *J Vet Med B*, v. 34, p. 202-205, 1987.

KANTOR, I.N.e RITACCO, V. Bovine tuberculosis in latin América and the caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet Microbiol.*, v. 40, p. 5-14, 1994.

KENT, P. T. & KUBICA, G. P. *Public Health Mycobacteriology. A Guide for the Level III Laboratory.* U.S Department of Health and Human Services. CDC. Atlanta, Georgia, 1985.

KOLK, A.H.J.; SCHUITEMA, A.R.J.; KUIJPER, S.; van LEEUWEN, J.; HERMANS, P.W.M.; van EMBDEN, J.D.A.; HARTSKEERAL, A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol*, v. 30, p. 2567-2075, 1992.

KREBS, J.R.; ANDERSON, R.; Clutton-BROCK, T.; MORRISON, I.; YOUNG, D.DONNELLY, C. *Bovine tuberculosis in cattle and Badgers.* MAFF Publications, London, 1997.

LATINI, O.; CANAL, A.M.; FERRARA, M.E.; SEQUEIRA, M.D. Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium Bovis* en ganado bovino por decomisos en frigoríficos. *Archi. Med. Vet.*, v. 29, n. 2, p. 197-204, 1997.

LEITE, C.Q.F.; ANNO, I.S.; LEITE, S.R.A.; ROXO, E.; MORLOCK,G.P.; COOKSEY, R.C. Isolation and identification of Mycobacteria from Livestock Specimens and Milk Obtained in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 98, p.319-323, 2003.

LILEMBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina R. Bras. Med. Vet., v.22, n. 4, p. 145-151, 2000.

LILEMBAUM, W.; SCHETTINI, J.; SOUZA, G.N.; RIBEIRO, E.R.; MOREIRA, E.C.; FONSECA, L. Comparasion between a  $\gamma$ -IFN assay kit nd intradermal tuberculin test for diagnosis of bovine tuberculosis on field trials in Brazil. J of Vet Sci, Series B, v. 46, n. 5, p. 353-358, 1999.

MCILROY, S.G., NEILL, S.D. e MCCRACKE, R.M. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. Vet Rec, v. 118, p. 718-721, 1986.

MENZIES, F.D. e NEILL, D. Review – Cattle-to-cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. Vet J., v.169, 92-106, 2000.

MERLINI, L.S.; MARTINS, H.M., GOMES, L.T.; MARQUES, S.M. & MERLINI, F.B. Inquérito epidemiológico no município de Xambre-Pr. Arq. ciên. vet. zool.UNIPAR, v. 6, n. 2, p. 190, 2003.

MILIAN-SUAZO, F., SALMAN, M.D., RAMIREZ, C., PAYEUR, J.B., RHYAN, J.C. & SANTILLAN, M. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. Am J of Vet Res, v. 61, 86-89, 2000.

MILIKOWSKI, C.; BERMAN, I. Colors Atlas of Basic Histopathology. 5 ed. Stamford:Appleton & Lange, 1997, 615p.

MINITAB STATISTICAL SOFTWARE 15. Wiston-Salem:Minitab Inc., 2006.

MIRANDA, Z.B.; REYES, S.; CARVALHO, E.C.Q.; dos SANTOS, J.A. Afecções inflamatórias específicas bronco-pulmonares, em bovinos abatidos em estabelecimentos industriais. Hig Alim., v. 11. n. 5. p. 36-38, 1997.

MORALES, A.; MARTINEZ, I.; CARLOS, A.; ÁLVAREZ, G.; ÁLVAREZ, M.; MALDONADO, J. Comparación de histopatología, cultivo y PCR en el diagnóstico de tuberculosis bovina. Rev cient, FCV-LUZ, v. 15, n. 2, p. 103-108, 2005.

MORRIS, R.S., PFEIFFER, D.U. & JACKSON, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microbiol, v. 40, 153-157, 1994.

MOTA, P.M.P.C. Diagnóstico Alérgico da Tuberculose Bovina. Encontro Mineiro sobre tuberculose Bovina, Belo Horizonte, 1998.

NEILL, S.D.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. Tuberculosis, v. 81, n. 1/2, p. 79-86, 2001.

NEILL, S.D.; HANNA, J. A; O'BRIEN, J.J.; MCCRACKEN, R.M.. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves, Vet. Rec., v. 124, p. 269-271, 1989.

NEILL, S.D., POLLOCK, J.M., BRYSON, D.B. & HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet Microbiol, v. 40, 41-52, 1994a.

NEILL, S.D., CASSIDY, J.P., HANNA, J., ET AL. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test negative cattle using assay for bovine interferon-gamma. Vet Rec, v. 135, 134-135, 1994b.

OPS/OMS – Plan de Acción para la erradicación de la Tuberculosis bovina en las Américas. Fase I, Washington, D.C., 1993.

ORME, I.M. The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis. Trend Microbiol., v. 6, p. 94-97, 1998.

ORME, I.M.; COOPER, A.M. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. Immunol. Today, v. 20, p. 307-312, 1999.

PARREIRAS P.M.; LOBATO, F.C.; ALENCAR, A.P.; FIGUEIREDO, P.; GOMES, H.M.; BOECHAT, N.; LAGE, A.P.; ASSIS, R.A.; PEREIRA, M.A.; SOUZA, P.R.; MOTA, P.M., Suffys PN. Drug susceptibility of Brazilian strains of *Mycobacterium bovis* using traditional and molecular techniques. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 99, p. 749-752, 2004.

PELETEIRO, M.C.; RODRIGUES, A.I.P. O exame citológico em medicina veterinária. Punção aspirativa com agulha fina. Vet. Tec. n.2, p. 30-36, 1991.

PHILLIPS, C.J.C.; FOSTER, C.R.W.; MORRIS, P.A.; TEVERSON, R. The transmissão of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Res in Vet Sci, n. 74, p. 1-15, 2003.

PINTO, P.S.A.; FARIA, J.E.; VILORIA, M.I.V.; BEVILACQUIA, P.D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção *post mortem* de bovinos. Ver. Bras. Saúde Prod. An., v. 3, n. 1, p. 10-15, 2002.

PIRES, M.A.; TRAVASSOS, F.S.; GÄRTNER, F. Atlas de patologia veterinária:biopatologia. Lisboa:Lidel, 2004, 195p.

POLLOCK, J.M. e NEILL, S.D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. Vet. J., v. 163, p. 115-127, 2002.

POTEL, K. Tratado de Anatomia Patológica General Veterinária. Zaragoza:Editorial Acribia, 1974, 480p.

PRATA, L.F.; FUKUDA, R.T. Fundamentos de Higiene e Inspeção de Carnes. Jaboticabal:FUNEP, 2001, 349p.

PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988 – conquest and controversy. J. Comp. Path., v.9, p. 357-399, 1988.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. e HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária, 9ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002, 1737p.

RAVIGLIONE, M.C.; SNIDER, D.E.J.; KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic, JAVMA, v. 273, p. 220-226, 1995.

REBHUN, W. C. Doenças do gado leiteiro, 1ed. São Paulo:Roca, 2000, 642p.

REIS, D.O.; ALVES, F.; COELHO, H.E. Importância do exame histopatológico para diagnóstico pós-morte de bovinos abatidos em frigorífico de Uberlândia, MG, 1987-1997. Hig Alim., v. 14. n. 78/79. p. 23-27, 2000.

REIS, D.O.; COELHO, H.E.; LUCIO, N.F. Características morfológicas das lesões de tuberculose, em bovinos abatidos. Hig Alim., v. 10. n. 41. p. 15-16, 1996.

RETAMAL, P.I.; ABALOS, P.E. Comparación del ensayo de interferón gamma bovino con técnicas tradicionales para el diagnóstico de infección con *Mycobacterium Bovis* en la Región Metropolitana de Chile. Rev Col Cienc Pec, v. 17, n. 3, p. 223-230, 2004.

RHYAN, J.C. e SAARI, D.A. A Comparative Study of the Histopathologic Features of Bovine Tuberculosis in Cattle, Fallow Deer (*Dama dama*), Sika Deer (*Cervus nippon*), and Red Deer and Elk (*Cervus elaphus*). Vet Path, v. 32, 215-220, 1995.

ROCHA, N.S. Citologia aspirativa por agulhas finas (CAAF). Cães e gatos, v. 75, p. 14-16, 1998.

ROMERO, R.E.; GARZON, D.L.; MEJIA, G.A.; MONROY, W.; PANTARROYO, M.E.; MURILLO, L.A. Identification of *Mycobacterim bovis* in bovine clinical sample by PCR species-specific primers. Can J Vet Res, v. 63, p. 101-106, 1999.

ROSENBERGER, G. Exame clínico dos bovinos. 2 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1983, 429p.

ROXO, E. Tuberculose bovina. Arq. Inst. Biológico,. v. 63, p. 91-97, 1996.

SANTOS, J.A. Patologia Geral dos Animais Domésticos (mamíferos e aves).2ed. Rio de Janeiro:Interamericana, 1979, 407p.

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

SCOTT-ALGOOD, H.M.; CHAN, J.; FLYNN, J.L. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 14, p. 467-477, 2003.

SMITH, D.; HANSC, H.; BANCROFT, G.; EHLERS, S. T-cell-independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immun.*, v. 92, p. 413-421, 1997.

SMITHWICK, R. S. Laboratory Manual for Acid-Fast Microscopy. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Center for Disease Control and Control, Atlanta, Georgia, 1976. 40 p.

SOUSA, R.D., de; REIS, D.O.; GUIMARÃES, K.C.S. e AQUINO, C.A.M. Linfonodos com maior frequência de localização para tuberculose bovina, em animais abatidos em um frigorífico sob inspeção federal, no município de Uberlândia – MG. *Hig Alim.*, v. 17, n. 106, p. 35-38, 2003.

TEKLU, A.; ASSED, B.; YIMER, E.; GEBEYEHU, M. E WOLDESENBET, Z. Tuberculosis lesions not detected by routine abattoir inspection: the experience of the Hossana municipal abattoir, southern Ethiopia. *Ver. Sci. Tech. Off. Int. Epizi.*, v. 23, n. 3, p. 957-964, 2004.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*, 6ed. São Paulo:Roca, 2000, 532p.

TURNER, O.C.; BASARABA, R.J.; ORME, I.M. Immunopathogenesis of pulmonary granulomas in the guinea pig after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 864-871, 2003.

TYLER, R.D.; COWELL, R.L.; BALDWIN, C.J.; MORTON, R.J. Introduction. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H. *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*. 2. ed. California: Mosby, 1998, p.1-22.

TYLER, R.D.; COWELL, R.L.; MEINKOTH, J.H. Cutaneous and Subcutaneous lesions: Masses, Cysts, Ulcers, and Fistulous Tracts. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H. *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*. 2. ed. California: Mosby, 1998, p.20-51.

WALRAVENS, K.; MARCHÉ, S.; ROSSEELS, V., WELLEMANS, BOEAERT, F.; HUYGEN, K.; GODFROID, J. IFN- $\gamma$  diagnostic test in the context of bovine mycobacterial infection in Belgium. *Vet Immunol. Immunopath.*, v. 87, p. 401-406, 2002.

WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; WIPPLE, D.L.; CRLSON, M.P. & NOMNECHE, B.J. Diagnosis implications of antigens-induced gamma interferon, nitric oxide, and

tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis* – infected cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol., v. 10, p. 960-966, 2003.

WEDLOCK, D.N.; SKINNER, M.A.; LISLE, G.W. & BUDDLE, B.M. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. Microb. Infect., v. 4, p. 471-478, 2002.

WHIPPLE, D.L., BOLIN, C.A. & MILLER, J.M. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. J Vet Diagn Inv, v. 8, p. 351-354, 1996.

WHITNEY, M.S., ROUSSEL, A.J.; COLE, D.J. Cytologic in bovine practice: Solid tissue, pleural fluid, and peritoneal fluid specimens. Vet. Med., March, p. 277- 289, 1999.

WOOD, P.R.; CORNER, L.A. & PACKETT, P. Development of a samples rapid *in vivo* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of the  $\gamma$ interferon. Res. Vet. Sci., v. 49, p. 46-49, 1990.

WRAY, C. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. Vet Bull, v. 45, p. 543-550, 1975.

ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C.; LOPES, M.T.P.; OLIVEIRA, R.S.; LEÃO, S.C.; FIORAVANTI, R.L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M.I.; CATALDI, A.; SALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction Identification un Bovine Lymphonode Biopsies and Genotyping in isolates from Southeast Brazil by Spolygotyping and restriction Fragment Length Polymorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 96, p. 1- 5, 2001.

ZEMUNER, A.P., NOGARA, A.M., LEUZZI JUNIOR, L.A. e OKANO, W. Avaliação de alterações tipo linfadenite no período de agosto a setembro de 2002, em matadouro-frigorífico na região de Maringá-Paraná. XXII Encontro de Iniciação Científica – Foz do Iguaçu – Paraná, 2003.

## Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

### Comunicação

(Communication)

Coloração de Ziehl-Nielsen como método confirmatório da tuberculinização comparada em linfonodo de bovinos de abate.

[ Ziehl-Nielsen coloration method to confirm the compare tuberculinization in bovine lymph nodes of slaughterhouse]

W. Okano<sup>1</sup>; N. S. Rocha<sup>2</sup>; M.V.O. Rezende<sup>1</sup>, L.F.C. da Cunha Filho<sup>1</sup>, L.C. da Silva<sup>1</sup>, L.A.Leuzzi Júnior<sup>1</sup>

1 - Universidade Norte do Paraná – UNOPAR  
Rod PR 218 – Km 1 86702-000 – Araçongas – Paraná

2- UNESP – FMVZ - Botucatu

*Mycobacterium bovis* tem sido reconhecido como o agente da tuberculose bovina em todo o mundo, sendo uma doença zoonótica (DABORN, 1995). *Mycobacterium bovis* pertence ao complexo da *Mycobacterium tuberculosis* (de Lesle et al., 1999). Tem especificidade por muitos hospedeiros, raramente acomete eqüídeos ou ovinos, porém ocorre em cervídeos, lhamas e suínos, nos quais desenvolvem severas lesões com descarga de materiais infectantes (KREBS et al., 1997). A prevalência da doença é maior nos países em desenvolvimento, e menor nos países desenvolvidos, onde programas de controle e erradicação já estão avançados. Na América latina e caribe existem áreas com prevalência

que ultrapassa 1%. No Brasil dados indicam a prevalência de 1,3% de animais reagentes entre os anos de 1989 a 1998. E Minas Gerais a prevalência de 5% de propriedades com animais reagentes (MAPA, 2003). As perdas econômicas estimadas são de 20 a 25% na eficiência reprodutiva (MAPA, 2003). A evidência maior do meio de transmissão da *Mycobacterium bovis* pode ser vista nos frigoríficos, onde a amostra de tecido coletadas de animais reagentes a tuberculinização e submetidas a cultura são na sua grande maioria os bônquiomediastínicos e o retrofaringeo e submandibular, sugerindo que a rota de infecção é a respiratória. Porém a transferência do bacilo do rúmen para o trato respiratório também é possível

via eructação (PHILLIPS et al., 2003). Ocorre então o processo patológico com a formação do complexo primário associado ao linfonodo regional, onde há acúmulo de macrófagos com formação de células gigantes de Langhans, circundadas por linfócitos, plasmócitos, fibrose periférica e necrose caseosa central o chamado granuloma tuberculoso (NEILL et al., 1994). Os métodos de diagnósticos descritos pelo MAPA (2003) são o bacteriológico, alérgico-cutâneo (tuberculinização). Lilenbaum (2000) descreve ainda a baciloscopia, o uso do IFN- $\gamma$ , ELISA e Métodos moleculares. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da coloração de Ziehl-Nielsen em linfonodos de animais com tuberculinização comparada positiva.

Foram coletadas 61 amostras de linfonodos de bovinos com abate sanitário, devido a resposta positiva no teste de tuberculinização comparada positiva. Coletou-se os linfonodos que apresentavam linfadenopatia. Foram cortado longitudinalmente e feitos "imprints" em lâminas de microscopia. As lâminas foram fixadas em calor e coradas pelo método padrão de Ziehl-Nielsen. As lâminas foram avaliadas em microscopia óptica.

Das 61 amostras coradas pelo método de Ziehl-Nielsen observou-se o bacilo álcool ácido resistente (BAAR) em três lâminas. Essas lâminas provinham de linfonodos ilíaco, pré-crural e pubiano. Em linfonodos descritos por Corner (1994) como de maior ocorrência de isolamento da micobactéria tais como retrofaríngeo (29,9%), mediastínico (28,2%), bronquial (18%), por Latini et al., (1997) ilíaco (3%), pré-crural

(3%) e gânglios sem especificar (11%) demonstram que os nossos achados estão nos de menor ocorrência, com 3% no pré-crural e ilíaco.

O fato de não termos achado o BAAR em linfonodos retrofaríngeo, mediastínico e bronquial, descritos como de maior ocorrência mas sim nos de menor ocorrência como os ilíacos e pubiano faz-nos rever os métodos de "imprint" como um método de uso para a avaliação de Ziehl-Nielsen.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DABORN, C. Tb in humans and domestic animals in the developing world. In: Tuberculosis in Wildlife and domestic animals, ed. F GRIFFIN and G. DE LISLE. Dunedin:University of Otago Press, 1995.

De LISLE, G.W.; WILSON, T.; COLLINS, D.M.; BUNDDLE, B.M. Vaccination of guinea pigs with nutritionally impaired avirulent mutants of *Mycobacterium bovis* protects against tuberculosis. *Infect Immun*, 1999; 67:2624-2626.

KREBS, J.R.; ANDERSON, R.; Clutton-BROCK, T.; MORRISON, I.; YOUNG, D.DONNELLY, C. Bovine tuberculosis in cattle and Badgers. MAFF Publications, London, 1997.

LATINI, O.; CANAL, A.M.; FERRARA, M.E.; SEQUEIRA, M.D.; SEQUEIRA, G.; BAGNAROLI, R.; TORRES, P. Confiabilidad em la determinación de prevalência de infección por *mycobacterium bovis* en Ganado bovino por decomisos en frigoríficos. *Arch. Med. Vet.* XXIX, n.2, p. 197-204, 1997.

LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. *Revista brasileira de medicina veterinária*, n. 22, n. 4, p. 145-151, 2000.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Programa de Controle e Erradicação da brucelose e Tuberculose – PNCEBT, 2003.

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

PHILLIPS, C.J.C.; FOSTER, C.R.W.; MORRIS, P.A.; TEVERSON, R. The transmissão of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Reserch in Veterinary Science*, n. 74, p. 1-15, 2003.

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

### ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

O periódico *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* é editado pela Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia/FEPMVZ-Editora, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins relacionadas com a produção animal. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). A lista de especialistas que colaboraram em cada volume é publicada no último fascículo do ano. Os trabalhos cujos textos necessitarem de revisões ou correções que não puderem ser feitas pelos editores serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tomam-se propriedade do *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

Os trabalhos para publicação deverão ser encaminhados ao

FEP MVZ Editora  
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Caixa Postal 567  
30123-970 - Belo Horizonte, MG  
Telefone: 0055 21 31 499 2041  
Fax: 0055 21 31 499 2042  
e-mail: journal@vet.ufmg.br

#### NORMAS GERAIS

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em três cópias impressas em uma só face, espaço entre linhas 1,5, fonte Times New Roman tamanho 12 e 3cm de margens, com páginas numeradas, não excedendo a 15. A versão final dos trabalhos aceitos para publicação deverá ser apresentada em disquete identificado (3½ polegadas), em editor de texto compatível com o "Word for Windows", sem formatação do texto, juntamente com duas cópias impressas.

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT-NBR – 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto. Quando os nomes dos autores forem parte integrante do texto menciona-se a data da publicação citada entre parênteses, logo após o nome do autor, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987-88) ou Anuário... (1987-88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971;

Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente.

*Citação de citação* (Adaptação da ABNT-NBR 10520 feita pela FEPMVZ-Editora). Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Entretanto, nem sempre é possível. Nesse caso, pode-se reproduzir informação já citada por outros autores. Pode-se adotar o seguinte procedimento:

- no texto**, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor do documento consultado;
- na listagem de referência** deve-se incluir a referência completa da fonte citada e outra referência da fonte consultada (citar as 2 referências em separado) não usar o apud como manda a NBR 10520. (Adaptação FEPMVZ-Editora).

*Comunicação pessoal* (ABNT-NBR 10520). Não fazem parte da lista de referências, sendo colocadas apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão "comunicação pessoal", a data da comunicação, nome, estado e país da instituição ao qual o autor é vinculado.

*Documento eletrônico* (ABNT – NBR 6023). Faz parte da lista de referências bibliográficas onde se deve colocar o endereço eletrônico e a data de acesso.

#### TIPOS DE TRABALHOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

**Artigo Científico.** É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Elementos do corpo do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões.

**Relato de Caso.** Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Elementos do corpo do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes).

**Comunicação.** É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo quatro páginas impressas, sem distinção dos elementos do corpo do texto especificados para "Artigo Científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

**Nota Prévia.** É o relato sucinto de um achado excepcional, de um invento ou de uma descoberta que requer publicação rápida para garantir a originalidade ou autoria.

## CARACTERÍSTICAS DOS ELEMENTOS DE UM TRABALHO

**TÍTULO.** Em português e em inglês e vice-versa. Evitar termos não significativos como estudo, exame, análise etc. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

**AUTORES.** Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

**RESUMO e ABSTRACT** devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

**PALAVRAS-CHAVE e KEYWORDS.** No máximo cinco.

**INTRODUÇÃO.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

**MATERIAL E MÉTODOS.** Técnicas e procedimentos de rotina devem ser apenas referenciados. Não se aceitam subtítulos.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO.** Os resultados poderão ser apresentados como um elemento do texto ou juntamente com a discussão, em texto corrido ou mediante ilustrações. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. Comparações, quando pertinentes, devem ser feitas de forma que o leitor chegue a suas próprias conclusões.

**Ilustrações** são tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) de onde foi extraída. A referência bibliográfica completa relativa à fonte da ilustração deve figurar na lista bibliográfica final. As despesas de impressão de ilustrações coloridas correrão por conta dos autores.

**Tabela.** O termo refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Serão construídas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

**Figura.** O termo refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. Os desenhos, gráficos etc. devem ser feitos com tinta preta, bem nítidos. As fotografias, no tamanho de 10 x 15cm, devem ser bem nítidas e de bom contraste, ambos indicando no verso a orientação para impressão, nome do autor e a qual figura se refere. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. Chama-se a atenção para as proporções entre letras, números e dimensões totais da figura: caso haja necessidade de redução, esses elementos também serão reduzidos e podem ficar ilegíveis. Assim, é bom que o tamanho dos desenhos apresentados pelos autores se aproxime do tamanho final impresso. Além de impressas, quando pertinente, devem ser enviadas em arquivo separado, identificado, em Corel Draw ou compatível, extensão .bmp.

**CONCLUSÕES.** As conclusões podem estar inseridas na discussão. Neste caso este item não é necessário. As conclusões não devem ser repetição dos resultados. Lembrar que nem sempre são necessárias.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.** Relacionam-se, em ordem alfabética, as referências bibliográficas, incluindo todas as fontes utilizadas. São adotadas as normas ABNT-NBR-6023 – agosto de 2002, simplificadas conforme exemplos:

### PERIÓDICOS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

### PUBLICAÇÃO AVULSA

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C. F. A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

### DOCUMENTOS ELETRÔNICOS

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related/Articles/>>. Acessado em: 5 dec. 1994.

### TAXA DE PUBLICAÇÃO

O autor, ao submeter o artigo, deverá apresentar um comprovante de depósito no valor de R\$30,00 na conta da FEP-MVZ Editora (Ag. 3610-2; Conta 921482-8; Banco do Brasil) referente à taxa de tramitação juntamente com os dados para emissão da nota fiscal (NOME ou RAZÃO SOCIAL, CPF ou CNPJ, ENDEREÇO).

A taxa de publicação de R\$30,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)