

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

NARA GEANNE DE ARAÚJO MEDEIROS

QUALIDADE DO LEITE UHT E IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium* sp EM BOVINOS COM TUBERCULOSE E NEOPLASIA PULMONAR NA PARAÍBA

PATOS-PB

2016

NARA GEANNE DE ARAÚJO MEDEIROS

QUALIDADE DE LEITE UHT E IDENTIFICAÇÃO DE *Mycobacterium* sp EM BOVINOS COM TUBERCULOSE E NEOPLASIA PULMONAR NA PARAÍBA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

**Prof. Dr. Antônio Flávio M. Dantas
Orientador**

PATOS-PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

M488q Medeiros, Nara Geanne de Araújo

Qualidade do leite UHT e identificação de *Mycobacterium* sp em bovinos com tuberculose e neoplasia pulmonar na Paraíba / Nara Geanne de Araújo Medeiros. – Patos, 2016.
58f.: il. color.

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas"

Referências.

1. Leite contaminado. 2. Análises microbiológicas. 3. Tuberculose.
4. Neoplasia pulmonar. 5. Micobactéria. I. Título.

CDU 614.9

Dedico este trabalho a Jesus (meu Mestre), a minha mãe (Rosália), a meu pai in memoria (Eronides) e ao meu irmão (Allan) por todo apoio e incentivo que me deram nesta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo amor, sabedoria, força, coragem e saúde que me concede em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe Rosália, meu exemplo de amor ao próximo, de dedicação à família, de honestidade. Seu amor me impulsiona a seguir sempre em frente.

A meu irmão que sempre esteve ao meu lado nos momentos que precisei. Você foi muito importante para a realização desse trabalho.

A tia Luzineide, tia Fátima e tio Luiz, exemplo de pessoas íntegras e guerreiras.

Ao meu orientador, Professor Dr. Antônio Flávio Medeiros Dantas, por ter aceitado me orientar, pelas valiosas contribuições e dedicação para a realização desse trabalho.

A Professora Dra. Sara Vilar Dantas Simões por ter aceitado ser minha orientadora. Se hoje estou terminando devo a você também.

A Professora Dra Márcia Almeida Melo por ter me substituído na disciplina durante esses anos e por ter contribuído com seus conhecimentos neste trabalho científico. Muito obrigada,

A Maria Talita Frade Soares por ter contribuído de forma intensa neste trabalho. Sua boa disponibilidade e ajuda jamais será esquecida.

Ao Professor Dr. Sérgio Santos Azevedo por toda ajuda prestada e fundamental para a realização desse trabalho.

A Professora Dra Maria das Graças Xavier de Carvalho, minha eterna orientadora, por ter disponibilizado o Laboratório de Leite e Derivados para a realização das análises.

Ao meu amigo Professor Dr. Gildenor Medeiros Xavier por todo incentivo e disposição em me ajudar nesse período do doutorado.

Ao meu grande incentivador Professor Dr. Carlos Peña Alfaro pelo apoio e disponibilidade em sempre me ajudar.

A Nevinha, por toda ajuda no preparo do material e pela amizade.

A Lisanka, Eduardo, Fabrício, Robério, Platini e todos do setor de Patologia Animal do HV, meu muito obrigada pela ajuda e cordialidade.

Ao secretário da Pós-Graduação, Jonas, por toda atenção e ajuda durante esses anos de doutorado.

A USP pela realização dos exames microbiológicos e moleculares.

A todos os colegas Professores da Unidade de Medicina Veterinária que torceram por mim.

Faltam palavras suficientes para agradecer, mas Deus os abençoe sempre!

RESUMO

Descreve-se nesta tese três trabalhos relacionados com a qualidade do leite UHT, diagnóstico de tuberculose e neoplasia pulmonar associada à micobactéria em bovino. No primeiro capítulo, avaliou-se a qualidade microbiológica do leite UHT produzido no Brasil e comercializado no Estado da Paraíba. Para isso, foram analisadas 135 amostras de 18 marcas e lotes diferentes de leite integral e desnatado, sendo que dessas, 50 amostras foram selecionadas para pesquisa de resíduos de antibióticos. Observou-se que 21,5% das amostras estavam contaminadas por termófilas, 16% por mesófilos e 8,1% por psicrófilas. Não foram identificados resíduos de antibióticos nas amostras avaliadas. Não houve diferença estatística com relação às amostras fora do padrão quanto ao critério de avaliação da frequência de leite por região de produção e por tipos de leite UHT para as bactérias estudadas. No segundo capítulo, identificou-se a presença de tuberculose por *M. bovis* em bovinos no Estado da Paraíba, através de vários métodos de diagnósticos. Foram realizados o exame macroscópico das lesões, histopatológico, coloração de Ziehl-Neelsen (CZN), imuno-histoquímica (IHQ), cultura bacteriológica (CB), PCR e sequenciamento do gene da HSP65 (SG). Todas as amostras apresentaram lesões macroscópicas semelhantes a granuloma tuberculoide, caracterizadas microscopicamente por inflamação granulomatosa, onde os animais jovens apresentavam menor número de lesões e grande quantidade de células inflamatórias. Doze animais foram positivos no teste de tuberculina intradérmico. A visualização de BAAR pela CZN e a marcação do anticorpo na IHQ ocorreu em 11 amostras. Doze amostras foram positivas para *M. bovis* na CB e 11 amostras amplificaram o gene do *Mycobacterium* pelo PCR. Em uma amostra foi isolado *Mycobacterium avium* no SG. No terceiro capítulo, descreve-se um caso de adenocarcinoma pulmonar em uma vaca, associado à presença de *Mycobacterium* sp, isolado e identificado. O quadro epidemiológico, clínico e as lesões macroscópicas eram sugestivas de tuberculose, que foi descartada após análise histopatológica, e confirmada sua associação pelos exames microbiológico e molecular.

Palavras-chaves: leite contaminado, análises microbiológicas, tuberculose, neoplasia pulmonar, micobactéria.

ABSTRACT

Described in this thesis three papers related to the quality of UHT milk, diagnosis of tuberculosis and lung cancer associated with mycobacteria in cattle. In the first chapter, we evaluated the microbiological quality of UHT milk produced in Brazil and marketed in the State of Paraíba. For this they were analyzed 135 samples of 18 different brands and lots of whole and skim milk, and of these, 50 samples were selected for antibiotic residues. It was observed that 21.5% of the samples were contaminated with thermophilic, mesophilic and 16% by 8.1% by psychrophilic. No antibiotic residues were identified in the samples evaluated. There was no statistical difference in relation to non-standard samples as the criterion for assessing the frequency of milk production by region and by type of UHT milk for the studied bacteria. In the second chapter, it identified the presence of tuberculosis and *M. bovis* in cattle in the state of Paraíba, through various diagnostic methods. The macroscopic examination of the lesions was performed, histopathology, Ziehl-Neelsen (CZN), immunohistochemistry (IHC), bacteriology (CB), PCR and sequencing of the HSP65 gene (SG). All samples showed macroscopic lesions similar to tuberculoid granuloma, characterized microscopically by granulomatous inflammation, where the young animals had fewer injuries and large amount of inflammatory cells. Twelve animals were positive in the intradermal tuberculin test. The preview BAAR by CZN and the marking of the antibody in IHC occurred in 11 samples. Twelve samples were positive for *M. bovis* CB amplicaram and 11 samples of *Mycobacterium* gene by PCR. In a sample was isolated *Mycobacterium avium* in SG. The third chapter describes a case of pulmonary adenocarcinoma in a cow, associated with presence of *Mycobacterium* sp, isolated and identified. The epidemiological situation, clinical and macroscopic lesions were suggestive of tuberculosis, which was discarded after histopathology and confirmed its association by microbiological and molecular tests.

Key words: milk tainted, microbiological analyses, tuberculosis, pulmonary cancer, mycobacteria.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
CAPÍTULO II	
Caracterização patológica, microbiológica e molecular da tuberculose bovina no Estado da Paraíba	
Figura 1	
Tuberculose bovina. A) Observa-se áreas amareladas multifocais a coalescentes, centralmente friáveis e caseosas, circundadas por tecido esbranquiçado, características de granulomas tuberculoides na superfície de corte do pulmão. B) Linfonodo traqueobrônquico aumentado de volume apresentando aspecto macroscópico semelhante ao pulmão. C) Aspecto microscópico do granuloma tuberculoide em pulmão, caracterizado por área de necrose (seta), centralmente com mineralização distrófica (cabeça de seta), circundada por inflamação granulomatosa (asterisco). HE. Obj. 10x. D) Observa-se infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas tipo Langerhans (setas), circundando área central de necrose caseocalcárea. HE. Obj. 20x. E) Verifica-se múltiplas bactérias álcool ácido-resistentes (setas). Zielh-Nielsen. Obj. 40x. F) <i>Mycobacterium</i> imunomarcado em marrom pelo método estreptavidina-peroxidase. IHQ. Obj. 40x.....	38
Figura 2	
Características microbiológicas do <i>Mycobacterium</i> spp. A) Colônias brancas, pequenas e superfície granular de <i>Mycobacterium bovis</i> . B) Colônias creme, pequenas e médias de superfície rugosa de <i>Mycobacterium avium</i>	39

Figura 3	Caracterização molecular do <i>Mycobacterium bovis</i>. A) Observa-se a amplificação do DNA do Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pela técnica <i>TB Multiplex PCR</i> . B) Identificação de <i>Mycobacterium bovis</i> pela amplificação do DNA através da técnica <i>RD Multiplex PCR</i>	40
-----------------	--	----

CAPITULO III Adenocarcinoma pulmonar associado à infecção pelo *Mycobacterium sp* em vaca: relato de caso

Figura 1	Adenocarcinoma pulmonar associado à <i>Mycobacterium sp</i> em uma vaca. A) Superfície de corte do pulmão apresentando áreas multifocais a coalescentes amarela-esbranquiçadas, firmes e caseocalcáreas. B) Linfonodo traqueobrônquico aumentado de volume, demonstrando na superfície de corte, áreas difusas semelhantes às observadas no pulmão (metástases). C) Fotomicrografia do pulmão demonstrando massa neoplásica (asterisco) com áreas multifocais de necrose e mineralização distrófica (seta). HE [Bar = 100µm]. D) Aspecto microscópico do adenocarcinoma pulmonar caracterizado por células epiteliais cuboides de citoplasma eosinofílico, núcleo redondo ou oval e pleomorfismo moderado (seta). Observa-se também figura de mitose (cabeça de seta). HE [Bar = 50µm].....	54
-----------------	--	----

Figura 2	Colônias bacterianas amarela-alaranjadas características do <i>Mycobacterium sp</i>	55
-----------------	---	----

LISTA DE TABELAS E QUADRO

	Pag.
CAPÍTULO I	
Caracterização da qualidade microbiológica do leite UHT produzido no Brasil	
Tabela 1	
Perfil microbiológico do leite UHT coletado no período de 2013 a 2014, produzido em diferentes regiões do Brasil e comercializados no Estado da Paraíba.....	23
Tabela 2	
Avaliação da frequência de amostras contaminadas por bactérias mesófilas, psicrófilas e termófilas, por região de processamento e por tipo de leite UHT integral e desnatado, coletadas no período de 2013 a 2014 no Estado da Paraíba.....	24
CAPÍTULO II	
Caracterização patológica, microbiológica e molecular da tuberculose bovina no Estado da Paraíba	
Quadro I	
Perfil das amostras nos Teste de Tuberculina Intradérmica (TTI), Lesões macroscópicas (LM), Histopatologia (HP), Coloração de Ziehl-Neelsen (CZN), Imuno-histoquímica (IHQ), Cultura bacteriológica (CB), PCR e Sequenciamento genético (SG)) durante diagnóstico de TBB realizado nos anos de 2013 a 2014, Estado da Paraíba, Brasil.....	41

SUMÁRIO

	Pag.
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
INTRODUÇÃO	14
Referências	15
CAPÍTULO I Caracterização da qualidade microbiológica do leite UHT produzido no Brasil	
Resumo	18
Abstract	19
Introdução	19
Material e Métodos	20
Resultados e Discussão	21
Conclusão.....	25
Referências	25
CAPÍTULO II Caracterização patológica, microbiológica e molecular da tuberculose bovina no Estado da Paraíba	
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução	31
Material e Métodos	33
Resultados	36
Discussão	41
Conclusões.....	44
Referências.....	45

**CAPÍTULO III Adenocarcinoma pulmonar associado à infecção pelo
Mycobacterium sp em vaca: relato de caso**

Resumo	50
Abstract	51
Introdução	52
Casuística	52
Agradecimentos	57
Referências	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
ANEXOS	60

INTRODUÇÃO

Os alimentos como leite e carne são muito importantes na alimentação humana, pois são fontes de nutrientes essenciais ao equilíbrio do organismo e sua falta pode levar a carências nutricionais sérias e problemas de saúde. Por outro lado, estes produtos apresentando-se em condições higiênicas e sanitárias insatisfatórias podem ser causas de sérios problemas como, veiculação de doenças e perda de sua qualidade através de deteriorações. De acordo com a Organização Internacional de Epizootias (OIE), as doenças transmitidas por alimentos contaminados e as zoonoses são importantes problemas de saúde pública e causas de diminuição da produtividade econômica em países desenvolvidos e em desenvolvimento (OIE, 2007).

O leite submetido ao processo de temperatura ultra alta (UHT) nem sempre é um produto livre de contaminações, podendo sofrer deterioração (BERSOT et al., 2010) em consequência da atividade metabólica natural dos microorganismos. Leite com altas contagens microbiológicas pode causar problemas à saúde pública, alterar as características sensoriais e diminuir a vida útil dos produtos lácteos (FRANCO; LANDGRAF, 1996). O leite cru no Brasil frequentemente tem se apresentado fora dos padrões microbiológicos (PINTO et al., 2006), influenciando negativamente a eficiência do processo UHT e, conseqüentemente, a sua qualidade.

A tuberculose é uma zoonose causada por diferentes espécies bacterianas do gênero *Mycobacterium*, muitas vezes transmitidas ao homem a partir de animais contaminados e veiculada por seus produtos como leite e carne. As conseqüências desta zoonose estão nos significativos coeficientes de morbidade e mortalidade para o homem, nos prejuízos econômicos e na disseminação no rebanho tornando-se fonte de infecção para a população humana (ACHA; SZYFRES, 1977).

O agente etiológico principal da tuberculose bovina é o *Mycobacterium bovis*, mas também pode ser causada por outras espécies do gênero *Mycobacterium*. Esta bactéria é endêmica no Brasil e pode causar uma doença clínica e patologicamente indistinguível da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* nos seres humanos, sendo importante a identificação laboratorial da espécie causadora da doença (MURAKAMI et al., 2009).

O diagnóstico da tuberculose pela Defesa Sanitária dos estados e na Inspeção de Produtos de Origem Animal é realizado através de um número limitado de técnicas

diagnósticas, ficando restrito aos aspectos macroscópicos das lesões durante o abate e ao teste da tuberculinização de alguns animais.

Devido à importância do leite e da carne bovina na alimentação da população brasileira e por serem potenciais transmissores de microorganismos patogênicos como o da tuberculose bovina, esta tese tem como objetivos: caracterizar a qualidade microbiológica do leite UHT produzido no Brasil e comercializado no Estado da Paraíba, identificar *Mycobacterium* sp em amostras de matadouros com Serviço de Inspeção Municipal e em bovinos necropsiados neste estado, caracterizando seus aspectos patológicos, microbiológicos e moleculares, contribuindo diretamente com informações relevantes para o seu diagnóstico e importantes para a saúde pública.

A tese está dividida em três capítulos com artigos científicos elaborados de acordo com as normas de periódicos que foram submetidos à publicação, conforme o que estabelece a NORMA Nº 01/2013 de 09 de julho de 2013 do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária. O primeiro capítulo é um artigo submetido à revista *Ciência Animal Brasileira*, que trata da caracterização da qualidade microbiológica do leite UHT consumido no Estado da Paraíba. O artigo do segundo capítulo foi submetido à revista *Semina* e aborda a caracterização patológica, microbiológica e molecular da tuberculose em bovinos abatidos em matadouros e de propriedades fiscalizadas pela Defesa Agropecuária do Estado da Paraíba. O artigo do terceiro capítulo foi submetido à revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* e descreve um caso de adenocarcinoma pulmonar associado à *Mycobacterium* sp em um bovino encaminhado ao Hospital Veterinário da UFCG com suspeita de tuberculose.

Referências

ACHA, P.N.; ZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington: *Organización Panamericana de la Salud*, 1977. p. 98-111. (Publicación científica, 354).

BERSOT, L.S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N. K. L.; BARCELLOS, V. C.; PINTO, J. P. A. N, MAZIERO, M. T. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). *Archivos Latino Americanos de Nutrición*, v. 60, n. 3, p. 645-652, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

MURAKANI, P. S.; FUVERKI, R. B. N.; NAKATANI, S. M.; BARROS, I. R.; BIONDO, A. W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. *Arquivo de Ciências Veterinária e Zootecia*. v. 12, n.1, p. 67-74. 2009.

OIE, Diretrizes para o controle de perigos biológicos de importância em saúde pública e saúde animal através da inspeção de carnes ante-mortem e post-mortem. Código sanitário para animais terrestres. *Organização Internacional de Epizootias*. 2007. Disponível em www.oie.int/es/normas internacionais. Acesso em 26 de março de 2012.

CAPÍTULO I

Caracterização da qualidade microbiológica do leite UHT produzido no Brasil

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da revista *Ciência Animal Brasileira* (anexo 1) e submetido em abril de 2016.

CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE UHT PRODUZIDO NO BRASIL

Nara G. A. Medeiros^{1*}
Maria das G. X. Carvalho¹
Maria J. Nardeli²
Sergio S. Azevedo¹
Antônio F. M. Dantas¹

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB

²Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes

*Autora para correspondência - ngamedeiros@yahoo.com.br

Resumo

Avaliando-se a qualidade microbiológica em leite UHT produzido nas cinco regiões do Brasil e comercializado no Estado da Paraíba, foram analisadas 135 amostras de 18 marcas e lotes diferentes de leite integral e desnatado, sendo que dessas, 50 amostras foram selecionadas para pesquisa de resíduos de antibiótico. Utilizou-se o método de contagem padrão de prováveis microorganismos em Plate Count Agar (PCA) para bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis, psicrofilas e termófilas, e o Devoltest para pesquisa de resíduos. Observou-se 21,5% das amostras contaminadas por termófilas, 16% de mesófilos e 8,1 % de psicrofilas. Não foram identificados resíduos de antibióticos nas amostras avaliadas. Não houve diferença estatística com relação às amostras fora do padrão quanto ao critério de avaliação da frequência de leite por região de produção e por tipos de leite UHT para as bactérias estudadas. A identificação de bactérias dos grupos mesófilos e termófilos é preocupante, pois dentro destes grupos existem microorganismos causadores de alterações na qualidade do leite e podem provocar danos à saúde do consumidor.

Palavras-chave: alimentos, bactérias, saúde pública.

CHARACTERIZATION OF THE QUALITY MICROBIOLOGICAL OF UHT MILK PRODUCED IN BRAZIL

Abstract

Evaluating the microbiological quality produced UHT milk in five regions of Brazil and marketed in the State of Paraíba were analyzed 135 samples of 18 different brands and lots of whole and skimmed milk, and these 50 samples were selected for antibiotic residues. We used the method of counting probable standard microorganisms in Plate Count Agar (PCA) for strict mesophilic aerobic bacteria and viable facultative, psychrophilic and thermophilic, and Devoltest for residues. There was 21.5% of the samples contaminated with thermophilic, 16% of mesophilic and 8.1% of psychrophilic. No antibiotic residues were identified in the samples evaluated. There was no statistical difference in relation to non-standard samples as the criterion for assessing the frequency of milk production by region and by type of UHT milk for the studied bacteria. The identification of bacteria from mesophilic and thermophilic groups is worrisome because within these groups are causing microorganisms changes in milk quality and may cause damage to consumers' health.

Key words: food, bacteria, public health.

INTRODUÇÃO

O tratamento térmico conhecido como UHT (temperatura ultra alta) é um processo utilizado para esterilização de alimentos através do aquecimento seguido imediatamente do resfriamento, sendo o leite produto UHT o mais comum dos produtos lácteos que passa por este tipo de processamento.

Diversos fatores têm contribuído para a seleção de microorganismos específicos nos produtos lácteos, como psicotróficos em produtos refrigerados e esporulados nos tratados termicamente⁽¹⁾. A eficiência do processo térmico na produção de leite UHT pode se tornar limitada devido à presença de esporos de mesófilos, psicrófilos e termófilos. Este processamento destrói todas as células vegetativas, mas algumas formas esporuladas podem sobreviver⁽²⁾. A baixa qualidade microbiológica dos produtos lácteos é um problema de saúde pública e altera as características sensoriais e a sua vida útil⁽³⁾. A presença elevada de microorganismos como aeróbios mesófilos, psicrófilos e suas toxinas causam problemas

sanitários e grandes perdas econômicas, sendo frequentemente empregada a contagem dessas bactérias como indicador das condições de obtenção e processamento deste leite⁽⁴⁾.

Outro aspecto que deve ser considerado ao se avaliar a qualidade do leite é a presença de resíduos de substâncias antimicrobianas, em decorrência de seu uso para prevenção e tratamento de doenças do gado leiteiro⁽⁵⁾. A temperatura empregada no processo UHT não elimina esses resíduos⁽⁶⁾, que podem ocasionar problemas na audição, alergias, choques anafiláticos, desenvolvimento de cepas resistentes aos antimicrobianos⁽⁷⁾ e problemas na manufatura de produtos lácteos.

A procura elevada por produtos lácteos de prolongada vida de prateleira e com maior praticidade tem resultado em um grande consumo de leite UHT e derivados. Apesar da crescente importância deste produto no mercado, poucos são os trabalhos relacionados à qualidade do mesmo no Brasil.

O leite UHT nem sempre é um produto livre de contaminações, podendo sofrer deterioração⁽⁸⁾, como consequência da atividade metabólica natural dos microorganismos⁽³⁾. Objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica e a presença de resíduos de antimicrobianos em leite UHT produzido no Brasil e comercializado no Estado da Paraíba, considerando a importância da inocuidade que este produto deve apresentar ao ser consumido.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas 135 amostras de leite UHT integral (77 amostras) e desnatado (58 amostras) comercializados nas cinco principais cidades do Estado da Paraíba, de forma aleatória, de 18 marcas e lotes diferentes produzido nas cinco regiões do país. As amostras foram processadas no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Federal de Campina Grande, Estado da Paraíba.

Para a análise microbiológica, as embalagens foram inicialmente descontaminadas, lavadas com água e detergente, secas com toalhas de papel e limpas com etanol a 70%, sendo posteriormente incubadas em estufa à temperatura de 35 a 37°C por sete dias⁽⁹⁾. Após esse período foi realizada a homogeneização do conteúdo, retirada uma alíquota de 25 mL de cada embalagem e transferida para um frasco contendo 225 mL de água peptonada a 0,1% previamente esterilizada, sendo posteriormente efetuadas as diluições seriadas até 10⁻³ neste mesmo meio.

Para contagem em placas de microorganismos no leite, 1,0 mL de cada diluição foi semeado em duplicata diretamente em Placas de Petri esterilizadas, pelo método *pour plate*,

contendo Ágar PCA (Plate Count Agar), e incubadas a 36 +/- 1°C / 48 horas, a 7°C / 10 dias e a 55°C/ 48 horas para pesquisa de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis, psicrófilas e termófilas, respectivamente ^(10,11,12).

A análise de resíduos de antibióticos foi realizada pelo método Delvotest SP Ampola, seguindo as instruções do fabricante. Para tanto, foram retiradas alíquotas de 50 amostras de leite UHT, dentre as 135 utilizadas na avaliação microbiológica, sendo 25 do tipo integral e 25 do desnatado.

A análise dos dados obtidos foi baseada na Portaria nº 370/97 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece até 100 UFC/mL para bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis⁽⁹⁾; no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) no seu Art. 540 parágrafo 2º item 4, onde o leite deve apresentar no máximo 10% de microorganismos psicrófilos e termófilos em relação à contagem total de mesófilos aeróbios⁽¹³⁾ e no Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMvet estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁽¹⁴⁾.

Para a comparação da frequência de amostras fora do padrão para a contagem de bactérias mesófilas, psicrófilas e termófilas, de acordo com a região geográfica de produção do leite UHT no Brasil (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro Oeste) e com o tipo de leite UHT (integral e desnatado), foi utilizado o teste de qui-quadrado ou o teste G⁽¹⁵⁾, adotando-se o nível de significância de 5%. As análises foram feitas com o programa estatístico BioEstat 5.03.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as amostras analisadas foram identificadas 16% (21/135) com contagem de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis fora do padrão estabelecido pela Legislação Brasileira (Tabela 1). Outros estudos realizados em diferentes regiões do Brasil demonstram percentuais maiores e variáveis, sendo em Belo Horizonte-MG (41,2%)⁽¹⁶⁾, São José do Rio Preto-SP (22,7%)⁽¹⁷⁾ e no Paraná variando de 24% a 38,3%^(8,18). Em pesquisa realizada com leite UHT de várias regiões do Brasil, observou-se que 45% estavam fora do padrão permitido⁽¹⁹⁾. Estas pesquisas realizadas sobre a avaliação da qualidade microbiológica do leite UHT mostram médias elevadas de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis, com valores bem superiores ao observado nesse trabalho (Tabela 1). Logo, a

contaminação de leite UHT por estes microorganismos é um problema observado em diversas regiões do Brasil.

Tabela 1 - Perfil microbiológico do leite UHT coletado no período de 2013 a 2014, produzido em diferentes regiões do Brasil e comercializados no Estado da Paraíba.

				Contagem média de	Percentual de
				amostras fora do	amostras fora do
				padrão	padrão
Bactérias					
Mesófilas	Aeróbias	Estritas	e	$5,13 \times 10^3$ UFC/mL	16 % (21/135)
Facultativas					
Psicrófilas				$2,45 \times 10^2$ UFC/mL	8,1% (11/135)
Termófilas				$2,31 \times 10^3$ UFC/mL	21,5 % (29/135)

UFC: Unidade Formadora de Colônias

Ocorrência de mesófilos aeróbios no leite UHT pode ser indicativa de má qualidade do leite cru utilizado, além de condições inadequadas de armazenamento e processamento ou contaminação pós - processamento⁽¹⁹⁾. Várias espécies de bactérias patogênicas para o homem fazem parte do grupo mesófilo, como *Staphylococcus aureus*, cujas toxinas podem causar toxinfecção alimentar, e *Bacillus cereus* produtor de toxinas que causam intoxicação e de esporos que resistem ao tratamento UHT, e secretor de enzimas extracelulares com capacidade de deterioração do leite⁽¹⁴⁾.

A análise dos resultados permitiu identificar que 8,1% e 21,5 % das amostras de leite UHT para bactérias psicrófilas e termófilas, respectivamente, encontravam-se acima de 10% da contagem total de mesófilos aeróbios permitidos pela Legislação Brasileira⁽¹³⁾. Nenhum microorganismo psicrófilo foi evidenciado nas amostras de leite UHT analisadas no estado do Paraná⁽¹⁹⁾, diferente do presente estudo onde foram observado 8,1 % das amostras contaminadas por este grupo de bactérias (Tabela 1). Fazem parte da classe dos psicrófilos, bactérias gram positivas e negativas, tais como: *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Listeria monocytogenes*. A maioria destas secreta enzimas hidrolíticas termorresistentes à temperatura de tratamento do leite UHT, prejudicando sua qualidade devido à sua estocagem a temperatura ambiente por longos períodos⁽²⁰⁾, causando danos à saúde do consumidor.

Esse baixo percentual de bactérias psicrófilas é importante para redução da ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes produzidas por elas, reduzindo alterações significativas na qualidade e nas características organolépticas do leite UHT.

A contagem média de bactérias termófilas neste trabalho foi de $2,31 \times 10^3$ UFC/mL com 21,5 % das amostras fora do padrão (Tabela 1). Rossi Júnior et al⁽²²⁾ encontraram uma população inferior a 1,0 UFC/mL destes microorganismos em uma linha de processamento de uma indústria do Estado de São Paulo, não corroborando com este estudo, cujo resultado elevado poderá ter ocorrido pela presença de esporos altamente resistentes à temperatura do processo UHT, que já estavam presentes no produto em decorrência das condições inadequadas de obtenção da matéria-prima.

Ainda na avaliação do número de bactérias mesófilas, psicrófilas e termófilas do leite UHT nesta pesquisa, não houve diferença estatística com relação às amostras fora do padrão quanto ao critério de avaliação da frequência de leites por região de produção e por tipos de leite UHT (Tabela 2). Estudo realizado por Pereira e colaboradores⁽¹⁹⁾ também não constataram diferença estatística entre as médias das contagens de mesófilos em leite UHT integral e desnatado no estado do Paraná.

Além das questões ligadas à sanidade do rebanho, higiene da ordenha, instalações das propriedades e as condições de transporte do leite cru até os laticínios, que podem aumentar a contaminação bacteriana inicial deste produto, também devem ser observadas as instalações e os procedimentos técnicos empregados na indústria que processa leite UHT que podem contaminá-lo. São necessários estudos que observem todos esses pontos da cadeia de produção para que medidas corretivas possam ser tomadas, reduzindo os riscos à saúde do consumidor e a qualidade sensorial do leite UHT.

Quanto aos resultados observados na análise de resíduo de antibiótico, todas as 50 amostras de leite UHT não apresentaram contaminação. Apesar do resultado satisfatório destas amostras, é importante a monitorização de antibióticos no leite UHT, pois no relatório da ANVISA 2006-2007⁽¹⁴⁾ foram pesquisadas 475 amostras de leite UHT no Brasil e constatou-se presença de betalactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol e sulfametazina. São escassos os levantamentos científicos no Brasil, que tratem deste aspecto tão importante para a saúde do consumidor, pois o uso indiscriminado destes medicamentos nas fazendas é prática constante e seus resíduos apresentam resistência aos tratamentos térmicos como pasteurização e esterilização como relatam Oliveira et al⁽⁶⁾, sendo veiculados aos consumidores de leite UHT.

Tabela 2 - Avaliação da frequência de amostras contaminadas por bactérias mesófilas, psicrófilas e termófilas, por região de processamento e por tipo de leite UHT integral e desnatado, coletadas no período de 2013 a 2014 no Estado da Paraíba.

Regiões	Nº de amostras	Bactérias Mesófilas Aeróbias Estritas e Facultativas	Bactérias Psicrófilas	Bactérias Termófilas
Nordeste	78	10,3 ^a	5,1 ^a	17,9 ^a
Sudeste	26	30,8 ^a	19,2 ^a	38,5 ^a
Centro-oeste	27	18,5 ^a	7,4 ^a	18,5 ^a
Norte	02	-	-	-
Sul	02	-	-	-
Tipos de leite				
Integral	77	19,5 ^a	11,7 ^a	22,1 ^a
Desnatado	58	10,3 ^a	10,3 ^a	3,4 ^a

*Letras iguais na coluna indica que não houve diferença estatística para $P < 0,05$

CONCLUSÕES

Conclui-se que o leite UHT produzido nas diferentes regiões do Brasil e comercializado no Estado da Paraíba, encontrava-se contaminado por bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas e termófilas. Esses grupos bacterianos poderão causar alterações na qualidade do leite e danos à saúde do consumidor. Verificou-se também que a qualidade do leite UHT provavelmente está sendo prejudicada pela não observância dos padrões estabelecidos pela Legislação Brasileira a nível de obtenção do leite cru ou no processamento nos laticínios.

REFERÊNCIAS

1. Moreno I, Vital A, VALLE JLE. Microrganismos responsáveis pelas principais deteriorações do requeijão e outros queijos fundidos. Revista Fazer Melhor. 2002; 19: 72-75. Portuguese.
2. Rosenthal I. Milk and dairy products; properties and processing. In: Processing units in the dairy industry. 1 st. New York: VC; 1991.p. 98.
3. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. 1 ed. São Paulo: Atheneu; 1996. 182 p. Portuguese.
4. Padilha MRF, Fernandes ZF, Leal TCA, Leal NC, Almeida AMP. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [Internet]. 2001 Mar-Apr[cited 2015 Jun 18];34(2):167-171. Available from: www.scielo.br/pdf/rsbmt/v32n2/a03v34n2.pdf. Portuguese.
5. Tronco VM. Manual para inspeção da qualidade do leite. 1ed. Santa Maria: Editora da UFSM; 1997. 166p. Portuguese.
6. Oliveira IGF, Silva MH, Delfino NC, Jesus NM. Determinação de resíduos antibióticos em leites pasteurizado tipo C e esterilizado, comercializado na cidade de Salvador-BA. Revista Instituto CândidoTostes [Internet]. 2007 Mar [cited 2015 mar 01];62(357):413-416. Available from:www.revistadoilct.com.br/rilct/article. Portuguese.
7. Fonseca GP, Cruz AG, Faria JAF, SILVA R, Moura MRL, Carvalho LMJ. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2009; 29(2): 451-453.
8. Bersot LS, Galvão JA, Raymundo NKL, Barcellos VC, Pinto JPAN, Maziero MT. Avaliação microbiológica e físico-química de leites uht produzidos no Estado do Paraná - Brasil. Semina: Ciências Agrárias. 2010; 31(3): 645-652.

9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação da identidade e qualidade do leite UHT. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Diário Oficial da União. 1997 Set 08; seção I. Portuguese.
10. Vanderzant C, Splittstoesser DF. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association; 1992. 1219 p.
11. American Public Health Association (APHA). Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: American Public Health Association; 2001. 676p.
12. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União. 2003 Set 18; seção I; 2003. Portuguese.
13. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29/0 3/52, alterado pelo decreto nº 2.244 de 04/06/97. Diário Oficial da União. 1997 Jun 05. Portuguese.
14. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa nacional de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos expostos ao consumo - PAMvet.2009. Portuguese.
15. Zar JH. Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice-Hall; 1999.663p.Portuguese.
16. Zacarchenco PB, Leitão MFF, Destro MT, Andrigheto C. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. Ciência e Tecnologia Alimentar. 2000; 20(2): 363-368.
17. Coelho OS, Silva N, Brescia, MV, Siqueira AP. Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2001; 53(2): 1-7.

18. Vidal-Martins AMC, Rossi Junior OD, Rezende-Lago NC. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia. 2005;57 (3): 396-400.
19. Pereira JR, Tamanini R, Rios EA, Oliveira VHS, Yamamura AAM, Beloti V. Microbiota mesófila aeróbia contaminante do leite UHT. Revista do Instituto Cândido Tostes [Internet]. 2013 Set/Out [cited 2015 mar 03]:28(394): 25-31. Available from: www.revistadoilct.com.br/rilct/article/viewFile/40. Portuguese.
20. Saeki EK, Matsumoto LS. Contagem de mesófilos e psicrotróficos em amostras de leite pasteurizado e uht. Revista Instituto Cândido Tostes [Internet]. 2010 Nov/Dez [cited 2015 mar]: 65(377): 629-35. Available from: www.revistadoilct.com.br/rilct/article/download/142/152. Portuguese.
21. Arcuri EF, Silva PDL, Brito MAVP, Brito JRF, Lange, CC, Magalhães MMA. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. Ciência Rural. 2008; 38 (8):2250-2255. Portuguese.
22. Rossi Júnior OD, Vidal-Martins AMC, Salotti BM, Bürger KP, Cardozo MV, Cortez, ALL. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. Arquivo Instituto Biológico [Internet]. 2006 Jan/Mar [cited 2015 mar 21]: 7(1): 27-32. Available from: www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V73_1/rossi.PDF. Portuguese.

CAPÍTULO II

Caracterização patológica, microbiológica e molecular da tuberculose bovina no Estado da Paraíba

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da revista Semina (anexo 3) e submetido em abril de 2016.

Caracterização patológica, microbiológica e molecular da tuberculose bovina no Estado da Paraíba

Pathological, microbiological and molecular characterization of bovine tuberculosis in the state of Paraíba

Nara G. A. Medeiros^{1*}, Maria Talita F. Soares¹, Márcia A. Melo¹, Sara V. D. Simões², Marcos Bryan Heinemann³, José Soares Ferreira Neto³, Antônio Francisco de Souza Filho³, Nicolás Céspedes Cárdenas³, Sérgio Santos Azevedo¹, Mônica Adriana Araújo de Souza¹, Antônio F. M. Dantas¹

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária-Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária-Universidade Federal de Campina Grande ² Departamento de Medicina Veterinária-Centro de Ciências Agrárias-Universidade Federal da Paraíba ³ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade de São Paulo

Resumo

Este estudo identificou a presença de tuberculose por *M. bovis* em bovinos no Estado da Paraíba através de vários métodos de diagnóstico. As 17 amostras foram obtidas de animais abatidos em matadouros e de propriedades fiscalizadas pela Defesa Agropecuária deste estado. Foram realizados o exame macroscópico das lesões (EM), histopatológico (HP), coloração de Ziehl-Neelsen (CZN), Imuno-histoquímica (IHQ), Cultura Bacteriológica (CB), PCR e sequenciamento do gene da HSP65 (SQ). Todas as amostras apresentaram lesões macroscópicas semelhantes à granuloma tuberculoide e inflamação granulomatosa no HP e os animais jovens com menor número de lesões e grande quantidade de células inflamatórias. Doze animais foram positivos no teste de tuberculina intradérmico. A visualização de BAAR pela CZN e a marcação do anticorpo na IHQ ocorreu em 11 amostras. Doze amostras foram positivas para *M. bovis* na CB e em 11 amostras houve amplificação do gene da HSP65 do produto da PCR. Uma amostra foi identificada *Mycobacterium avium* no SQ. A tuberculose está presente neste estado. É necessário o uso associado de alguns tipos de análise para um diagnóstico definitivo da tuberculose bovina.

Palavras-chaves: inflamação granulomatosa, *Mycobacterium bovis*, zoonose

Abstract

This study identified the presence of tuberculosis and *M. bovis* in cattle in Paraíba state through various diagnostic methods. The 17 samples were obtained from animals slaughtered in slaughterhouses and inspected properties for Agricultural Defense of this state. The macroscopic examination of the lesions were performed (MS), histopathologic (HP), Ziehl-Neelsen (CZN), Immunohistochemistry (IHC), Bacteriological Culture (BC), PCR and sequencing of the HSP65 gene (SQ). All samples showed macroscopic lesions similar to tuberculoid granuloma and granulomatous inflammation in HP and young animals with fewer injuries and large amount of inflammatory cells. Twelve animals were positive in the intradermal tuberculin test. The preview BAAR by CZN and the marking of the antibody in IHC occurred in 11 samples. Twelve samples were positive for *M. bovis* in the CB and 11 samples was HSP65 gene amplification of the PCR product. A sample was identified as *Mycobacterium avium* in the SQ. Tuberculosis is present in this state. The combined use of some types of analysis for a definitive diagnosis of bovine tuberculosis is required.

Key words: granulomatous inflammation *Mycobacterium bovis*, zoonosis

Introdução

As bactérias do gênero *Mycobacterium* são bacilos imóveis, cujos ácidos micólicos da parede celular conferem a propriedade de álcool-ácido resistência na coloração de Ziehl-Neelsen (LÉVY-FRÉBAULT; PORTAELS, 1992), muito utilizada no diagnóstico da tuberculose. Existem espécies patogênicas e não patogênicas, que podem infectar várias espécies animais e o homem, estando presentes também no meio ambiente.

A tuberculose bovina (TBB) é uma zoonose causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis*, que apresenta sérios riscos à saúde pública humana e veterinária, em especial para indivíduos convalescentes ou imunodeprimidos, além de ocasionar impactos à produtividade dos rebanhos e expressivas perdas econômicas ao setor (FURNALETTO et al., 2012). Esta enfermidade ocorre em todo o mundo, com maior prevalência nos países em desenvolvimento e bovinos leiteiros (ROXO, 1997). Ela está presente em todo o território brasileiro, porém sua prevalência e distribuição regional ainda não foram bem caracterizadas (ÁVILA et al., 2013).

Em alguns países desenvolvidos têm sido implantados programas de erradicação da TBB, que têm reduzido e eliminado a doença nos bovinos. No entanto, o controle e a erradicação da TBB em diversos países são difíceis pela capacidade do *M. bovis* infectar outras espécies domésticas e selvagens (THE CENTER FOR FOOD SECURITY and PUBLIC HEALTH, 2009). O Brasil conta com o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que tem o propósito de eliminar os animais positivos e incentivar a certificação de rebanhos livres da doença utilizando o teste tuberculínico no diagnóstico. O teste cervical simples é realizado com a PPD (Proteína Pura Derivada - Purified Protein Derivative) bovina, produzida a partir da amostra AN5 de *M. bovis*, contendo 1 mg de proteína por mL (32.500 UI). No teste cervical comparativo, utiliza-se também o PPD aviário, produzido a partir da amostra D4 de *M. avium*, contendo 0,5 mg de proteína por mL (25.000 UI) (BRASIL, 2006).

A bactéria infectando o hospedeiro tem a capacidade de sobreviver e de se multiplicar no interior dos macrófagos, sendo sua interação com a célula hospedeira determinante no estabelecimento da infecção (DIAS, 2011). As lesões da TBB são encontradas principalmente em órgãos ricos em tecido reticuloendotelial, como pulmões, linfonodos e fígado. Os sinais clínicos estão diretamente associados à distribuição e quantidade dos tubérculos, embora não sejam lesões patognomônicas, pois podem ser observadas em outras enfermidades (NEILL et al., 1994).

Várias são as dificuldades encontradas no diagnóstico da TBB em larga escala, sendo estas: lesões macroscópicas semelhantes às encontradas em outros processos inflamatórios granulomatosos; limitações relacionadas à sensibilidade e especificidade dos exames histopatológicos que usam coloração hematoxilina-eosina (HE); baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen e teste de reação cutânea (tuberculinização); tempo prolongado e necessidade de grande quantidade de bacilos viáveis na cultura bacteriológica; complexidade e custo da técnica de PCR e a escassez de estudos sobre o método de imuno-histoquímica para esta doença (ZANINI et al., 2001; ZANDEN, 2002). Outro fato importante é que os animais do mesmo rebanho podem estar em fase diferente da infecção pelo *Mycobacterium*, comprometendo a sensibilidade das diferentes técnicas utilizadas, necessitando-se do emprego de várias ferramentas de diagnóstico.

O objetivo desse trabalho é descrever as principais características patológicas da tuberculose e identificar o *Mycobacterium bovis* por técnicas microbiológicas e moleculares em bovinos abatidos em matadouros com Serviço de Inspeção de Municipal e em animais de

propriedades com casos positivos pelo teste de tuberculinização e fiscalizadas pelo Serviço de Defesa Agropecuária do Estado da Paraíba.

Material e Métodos

As amostras foram obtidas em matadouros com Serviço de Inspeção Municipal (SIM) e de animais recolhidos com Teste de Tuberculina Intradérmico positivo de propriedades fiscalizadas pela Defesa Agropecuária do Estado da Paraíba (DAPB). As coletas foram realizadas nos anos de 2013 a 2014.

Foram coletadas amostras de pulmões, linfonodos e fígado com lesões macroscópicas caracterizadas por áreas nodulares amareladas, circundadas por tecido esbranquiçado e centralmente granular e friável, sugestivos de granuloma tuberculoide. As amostras foram obtidas em duplicata para análise histopatológica e microbiológica.

O diagnóstico de TBB foi realizado através do Teste de Tuberculina Intradérmico (TTI), exame macroscópico (EM) das lesões, exame histopatológico (HP) com coloração pela hematoxilina-eosina (HE), pesquisa de bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR) pela coloração de Ziehl-Neelsen (CZN), imuno-histoquímica (IHQ), cultura bacteriológica (CB), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento do gene da HSP65 (SQ).

As amostras para as análises de HP, CZN e IHQ foram fixadas em formol tamponado a 10%. Os fragmentos das lesões foram clivados, processados e incluídos em parafina, feito cortes de 3 µm. Para o exame histopatológico foi utilizada a coloração Hematoxilina-eosina. Os cortes de tecidos com lesões características de tuberculose por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) foram selecionados para realização da CZN e IHQ.

As amostras utilizadas para isolamento e identificação por CB, PCR e SQ foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, congeladas a - 80°C e enviadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP.

Coloração de Ziehl- Neelsen

A coloração foi realizada com o kit de coloração Ziehl-Neelsen Fite seguindo as instruções do fabricante, própria para ser utilizada em cortes histológicos.

Técnica de Imuno-histoquímica

Os cortes selecionados foram aplicados sobre lâminas com carga elétrica, desparafinados e reidratados. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H₂O₂ a 3% e a recuperação antigênica com solução tampão de citrato (pH 6,0). Os cortes foram tratados com leite em pó desnatado a 5%. Foram usados o anticorpo primário policlonal anti-*Mycobacterium* na

diluição 1:100 e o polímero como anticorpo secundário. Como controle positivo foi utilizado tecido positivo para paratuberculose.

Isolamento Bacteriano

O isolamento bacteriano consistiu na descontaminação da amostra seguida da semeadura em meios de cultura sólidos Lowenstein-Jensen e Stonebrink-Leslie com posterior incubação a 37°C por 60 a 90 dias (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1973). A descontaminação foi realizada com NaOH a 4% com posterior neutralização com HCl a 1N, a partir das amostras de fragmentos de tecidos congelados em ultrafreezer (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1972).

Extração do DNA

O método CTAB foi utilizado para o isolamento e purificação do DNA das micobactérias, com algumas adaptações (KREMER et al., 1999). Aproximadamente 50mg de massa bacteriana foram transferidas para um tubo de 1500 µL e misturado com 400 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA pH 8,0). A suspensão foi incubada a 80°C por 30 minutos para a inativação dos bacilos (BREMER-MELHIOR; DRUGEON, 1999). Adicionou-se 50 µL de lisozima na concentração de 10 mg/ml e a mistura foi incubada em overnight. Foram adicionados 75 µL de proteinase K/SDS (proteinase K 10mg/mL e SDS 10%) e incubado a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100 µL de NaCl a 5 M e 100 µL da solução CTAB/NaCl (4,1 g de NaCl e 10g de CTAB em 100 mL de H₂O) e pré-aquecido a 65°C. A mistura foi agitada até o líquido se tornar branco e incubada por 10 minutos a 65°C.

A extração do DNA foi realizada com 750 µL de clorofórmio e álcool isoamílico. Agitação por 10 segundos e centrifugação a 12000 g por 7 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e o DNA foi precipitado com 450 µl de isopropanol e resfriado a -20°C, por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 12000 g, por 15 minutos e o sedimento foi lavado com 1000 µL de etanol 70% gelado e centrifugando a 12000 g por 5 minutos. O sedimento seco foi redissolvido em TE e estocado a - 20°C até o uso.

Técnica - TB Multiplex PCR

O TB Multiplex PCR tem a capacidade de identificar os isolados do gênero *Mycobacterium* e diferenciar o complexo *M. tuberculosis* do complexo *M. avium* e do *M. intracellulare*. Para isto, foram utilizados os seguintes primers: MYCGEN-F (G1) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e MYCGEN-R (G2) (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3') - referentes ao gênero; TB-1A (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') e TB-1B (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3') - referentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*; MYCAV-R (5'-

ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3') - referente ao *Mycobacterium avium*; e MYCINT-F (5'CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3') - referente ao *Mycobacterium intracellulare* (COUSINS et al., 1998).

Foram utilizadas como controles positivos a cepa AN5 de *M. bovis* para o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, a cepa ATCC 582 para o complexo *Mycobacterium avium* e a cepa ATCC 13950 para o *Mycobacterium intracellulare*.

A amplificação foi realizada por desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos; desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 61°C por 2 minutos; extensão a 72°C por 3 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos. O ciclo de amplificação foi realizado 33 vezes.

Técnica RD Multiplex PCR

O RD Multiplex PCR tem a capacidade de diferenciar os membros do complexo *M. tuberculosis* (HUARD et al., 2003). Para isso foram usados os iniciadores RD9-1 (5'-CAAGTTGCCGTTTCGAGCC-3'), RD9-2 (5'-CAATGTTTGTGCGCTGC-3'), RD9-3 (5'-GCTACCCTCGACCAAGTGTT-3'), RD12-1 (5'-GGGAGCCCAGCATTTACCTC-3'), RD12-2 (5'-GTGTTGCGGGAATTACTCGG-3'), RD12-3 (5'-AGCAGGAGCGGTTGGATATTC-3'), TAQ polymerase 1,25 U e 5 µL do DNA. Foram utilizadas como controles positivos a cepa AN5 para o *M. bovis* e a cepa H37Rv para o *M. tuberculosis*.

O ciclo do PCR empregado foi de desnaturação inicial de 95°C por 15 minutos; desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 80°C por 1 minuto, extensão final a 72°C, por 10 minutos. O ciclo foi realizado 45 vezes.

A revelação do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose de 1,5% a 2% (p/v), usando-se tampão de corrida TBE (0,04M Tris-acetato e 0,001M EDTA, pH 8,0). Os géis foram corados na solução de SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain. A visualização e a documentação foram feitas pelo sistema de fotodocumentação automático AlphaImager®.

Resultados

Foram analisados 17 bovinos suspeitos de tuberculose, sendo 16 fêmeas e um macho, mestiços de holandês e de diferentes idades. Doze animais eram de propriedades fiscalizadas pela DAPB com TTI positivo e cinco foram abatidos em matadouros públicos e privados com Serviço de Inspeção Municipal (SIM). Dos 12 bovinos positivos pela tuberculinização, os animais jovens apresentaram reação mais intensa à tuberculina e em todos eles foram observadas lesões macroscópicas semelhantes à granuloma tuberculoide nos pulmões (Figura

1A) e linfonodos traqueobrônquicos aumentados de volume e com aspecto macroscópico semelhante ao pulmão (Figura 1B).

Pela análise histopatológica, todas as amostras apresentaram inflamação granulomatosa (Figura 1C), variando de intensidade quanto à presença de áreas de necrose e quantidade de células inflamatórias. As lesões se caracterizavam por áreas de necrose caseosa com mineralização, circundadas por infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, células epitelioides e células gigantes multinucleadas tipo Langhans, além de alguns linfócitos e plasmócitos, circundados perifericamente por tecido conjuntivo fibroso (Figura 1D). Os animais jovens apresentaram menor número de lesões macroscópicas e histopatológicas, geralmente com um discreto aumento de linfonodos regionais, poucas áreas necróticas e caseosas, e células inflamatórias em grande quantidade.

Em 11 amostras foram visualizados BAAR pela coloração de Zielh-Neelsen (Figura 1E) e também houve marcação positiva pelo anticorpo primário policlonal anti-*Mycobacterium* na IHQ (Figura 1F). Em ambas as técnicas, os bacilos foram encontrados em maior número principalmente nos animais jovens com lesões macroscópicas e histopatológicas menos intensas.

Em 13 amostras houve crescimento bacteriano, sendo 12 com aspecto morfológico de *M. bovis*, caracterizadas por colônias pequenas, de coloração branca, bordas irregulares e superfície granular típica (Figura 2A); e uma amostra com colônias de cor creme, tamanho variando de médio a pequeno, bordas irregulares, superfície rugosa e umas áreas com coloração rósea (Figura 2B). Das 12 amostras com características morfológicas de *M. bovis*, houve amplificação do gene da HSP65 da bactéria em 11 amostras. A evidência da banda 372 pares de base (pb) corresponde ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 3A). A amplificação da região RD12 representada pela banda de 306 pb, e da região RD9 (banda de 108 pb), identifica a amostra como *Mycobacterium bovis* (Figura 3B). Em apenas uma amostra não houve amplificação do gene deste microorganismo. Particularmente, na amostra sem amplificação do DNA do *M. bovis*, o produto da PCR foi submetido a sequenciamento e, através do BLASTN, a sequência foi semelhante ao *Mycobacterium avium* (ID: [gblDQ284771.1](#); e-value: 0.0 e identidade 97%).

Todos os dados obtidos relacionados aos exames realizados nas amostras encontram-se no Figura 1.

Figura 1 - Tuberculose bovina. A) Observam-se áreas amareladas multifocais a coalescentes, centralmente friáveis e caseosas, circundadas por tecido esbranquiçado, características de granulomas tuberculoide na superfície de corte do pulmão. B) Linfonodo traqueobrônquico aumentado de volume apresentando aspecto macroscópico semelhante ao pulmão. C) Aspecto microscópico do granuloma tuberculoide em pulmão, caracterizado por área de necrose (seta), centralmente com mineralização distrófica (cabeça de seta), circundada por inflamação granulomatosa (asterisco). HE. Obj. 10x. D) Observa-se infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos epitelioides e células gigantes multinucleadas tipo Langhans (setas), circundando área central de necrose caseocalcárea. HE. Obj. 20x. E) Verificam-se múltiplas bactérias álcool ácido-resistentes (setas) por Ziehl-Neelsen. Obj. 40x. F) *Mycobacterium* imunomarcado em marrom pelo método estreptavidina-peroxidase. IHQ. Obj. 40x.

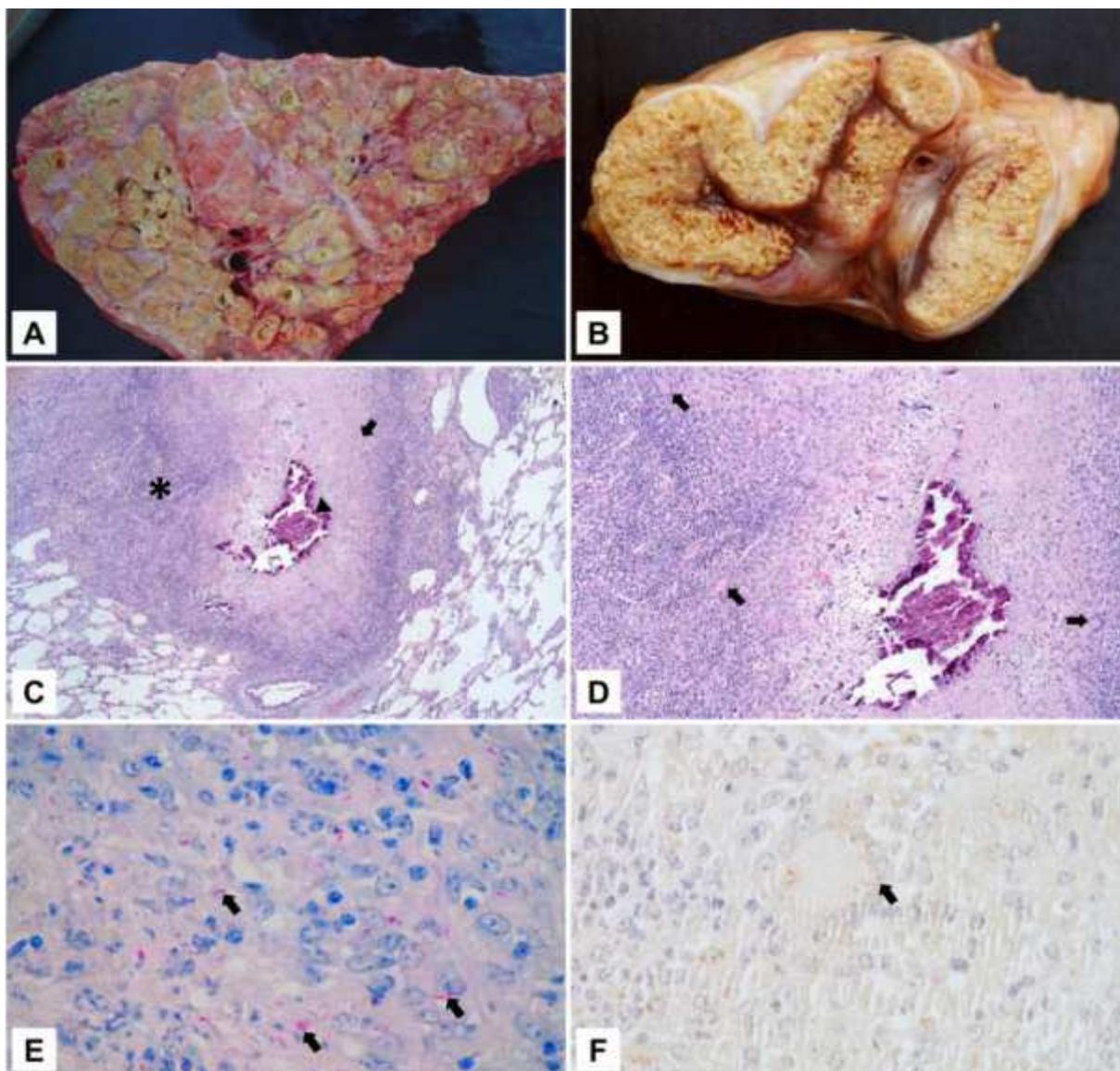


Figura 2 - Características microbiológicas do *Mycobacterium* spp. A) Colônias brancas, pequenas e superfície granular de *Mycobacterium bovis*. B) Colônias creme, pequenas e médias de superfície rugosa, coloração rósea na superfície do meio de cultura características de *Mycobacterium avium*.

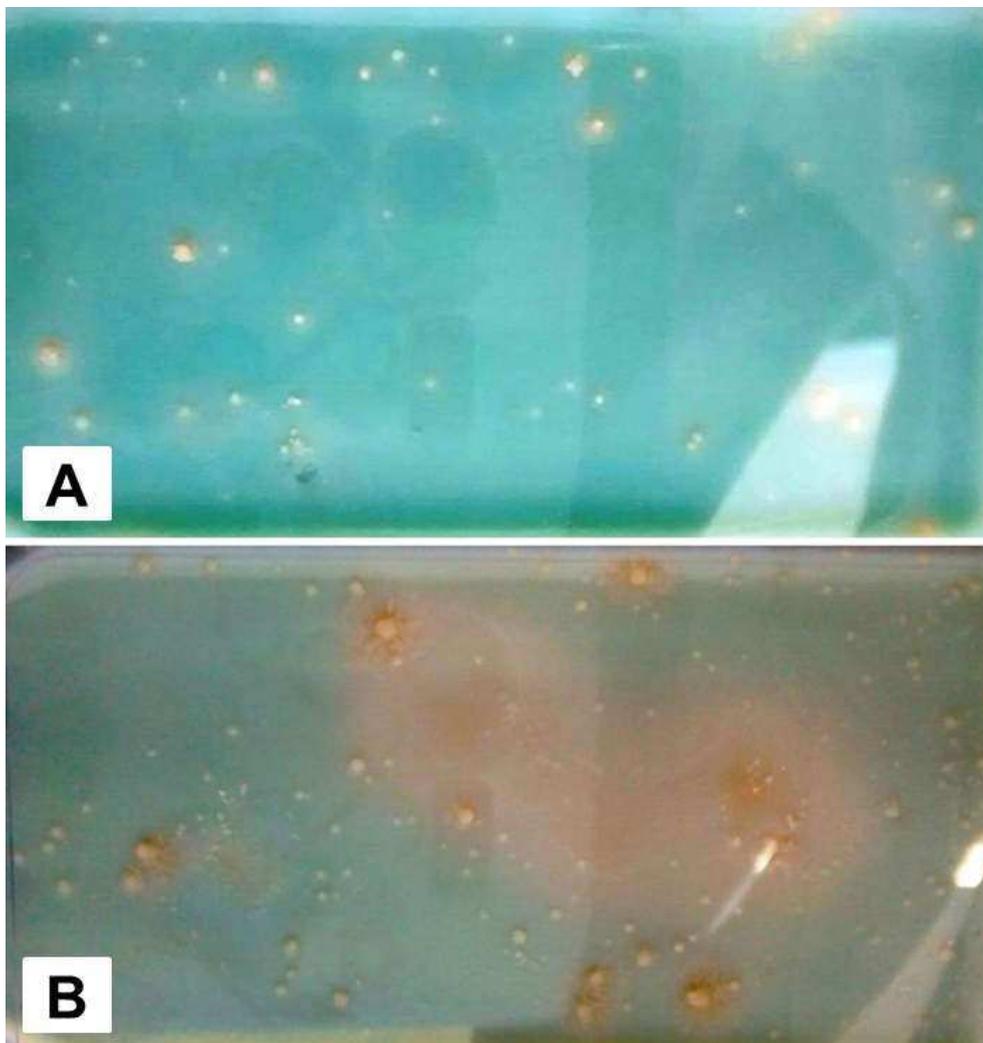
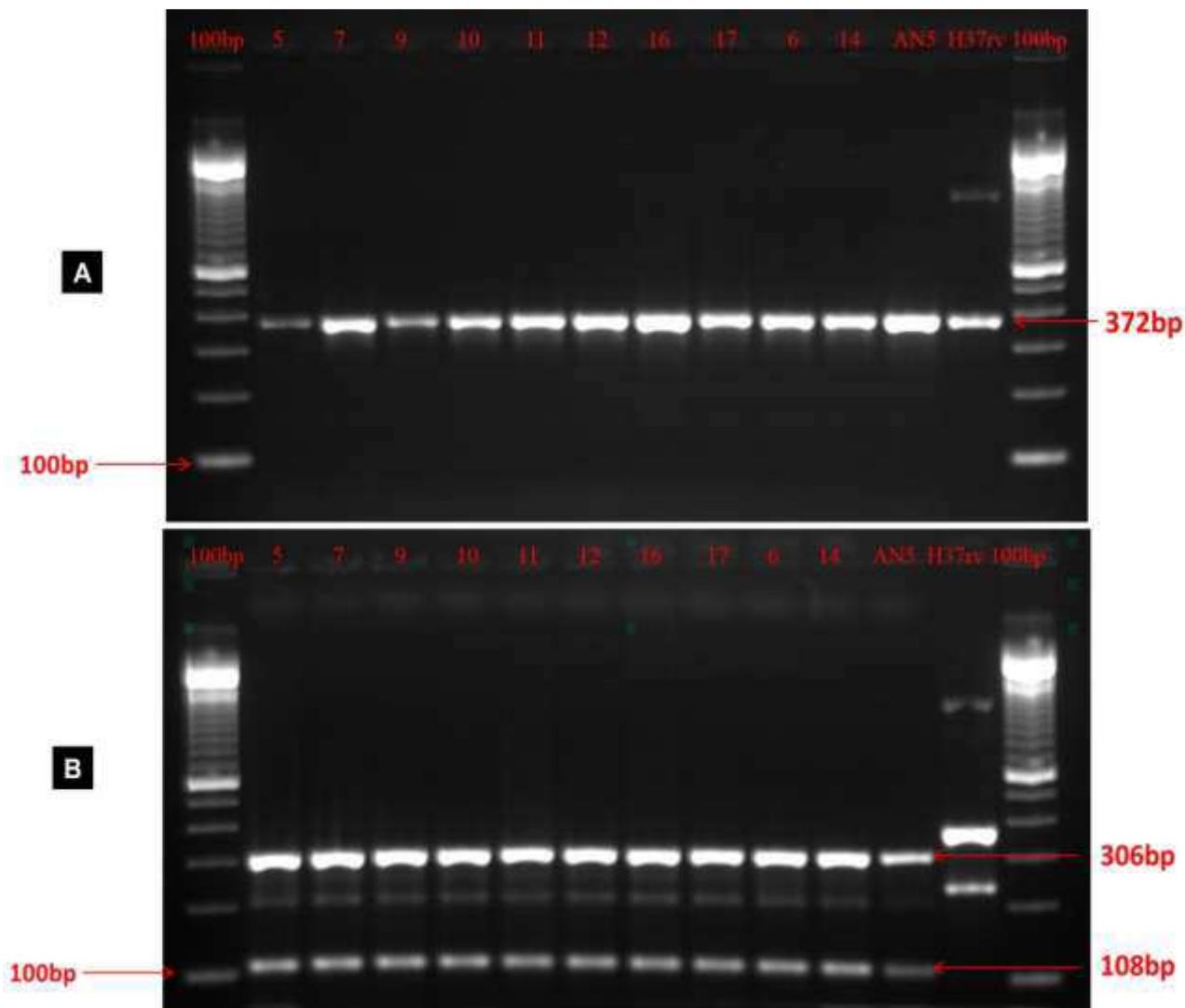


Figura 3 - Caracterização molecular do *Mycobacterium bovis*. A) Observa-se a amplificação do DNA do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica *TB Multiplex PCR*. B) Identificação de *Mycobacterium bovis* pela amplificação do DNA através da técnica *RD Multiplex PCR*.



Quadro 1- Resultados das amostras no Teste de Tuberculina Intradérmica (TTI), Lesões macroscópicas (LM), Histopatologia (HP), Coloração de Ziehl-Neelsen (CZN), Imuno-histoquímica (IHQ), Cultura bacteriológica (CB), PCR e Sequenciamento genético (SQ) durante diagnóstico de TBB realizado nos anos de 2013 a 2014, Estado da Paraíba, Brasil.

Amostra	TTI	LM	HP	ZN	IHQ	CB	PCR	SG
1*	+	S	S	+	+	<i>M. bovis</i>	-	NR
2*	+	S	S	+	+	SC	NR	NR
3	+	S	S	+	+	SC	NR	NR
4*	+	S	S	+	+	SC	NR	NR
5	+	S	S	-	-	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
6	+	S	S	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
7	+	S	S	+	-	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
8	+	S	S	-	-	SC	NR	NR
9*	+	S	S	+	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
10*	+	S	S	+	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
11	+	S	S	-	-	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
12*	+	S	S	+	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
13*	NR	S	S	+	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
14*	NR	S	S	+	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
15	NR	S	S	-	+	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
16	NR	S	S	-	-	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	NR
17	NR	S	S	+	+	I	I	<i>M. avium</i>

Teste de Tuberculina Intradérmica; EM - Exame Macroscópico; HP - Histopatologia; CZN - Coloração de Ziehl-Neelsen; IHQ -Imuno- histoquímica; CB - Cultura bacteriológica; PCR - Reação em Cadeia da Polimerase; SQ - Sequenciamento de produto da PCR; S - Lesões semelhantes às de TBB; NR - Não realizado; SC - sem crescimento; I – inconclusivo. *Animal jovem.

Discussão

Todas as amostras analisadas apresentaram lesões características de tuberculose, variando apenas a intensidade da resposta inflamatória, sendo portanto, apenas um achado sugestivo da infecção, pois outros microorganismos podem desencadear lesões semelhantes, como as produzidas por *Nocardia asteroides* (BENITES et al., 1999; ZANINI et al., 2001). Geralmente as lesões eram discretas nos animais jovens, com pequeno aumento de linfonodos regionais e áreas de inflamação composta por muitos macrófagos, células epitelioides e gigantes em consequência da resposta celular intensa. Nos bovinos mais velhos, observaram-

se granulomas, áreas extensas de necrose, poucas células inflamatórias e mineralização em alguns casos, em virtude da diminuição da resposta celular e aumento da humoral que ocorre com a cronicidade da infecção (MARASSI et al., 2013). Os achados histopatológicos são relevantes pois, de acordo com ANDREAZZA et al. (2015) as características histopatológicas e a variação dos componentes celulares das lesões fornecem uma noção sobre o tempo de evolução da doença, importante para a epidemiologia da TBB e tomada de decisões para o controle e erradicação da mesma.

A TB em bovinos progride lentamente, surgindo inicialmente à resposta celular no hospedeiro, que diminui à medida que a carga microbiana aumenta, em seguida elevando-se a resposta humoral (MEDEIROS et al., 2010). Os animais jovens apresentaram resposta mais intensa à tuberculina, provavelmente devido a resposta celular contra *M. bovis* que ocorre nos primeiros estágios da doença (MARASSI et al., 2013) e diminui com o avanço da infecção.

Em animais mais jovens e em lesões em estágio inicial da infecção, a visualização do bacilo foi mais fácil na CZN e na marcação com anticorpo na IHQ dos bacilos pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, onde se encontra inserido o *M. bovis*. Estes foram encontrados no interior de células gigantes multinucleadas, independente da cronicidade ou não das lesões. Beytut (2011) e Andrezza et al. (2015) encontraram os bacilos também em meio à necrose caseosa.

O isolamento bacteriano nos meios sólidos Lowenstein-Jensen e Stonebrink-Leslie em apenas 13 amostras pode ter sido em função de alguns animais estarem no início da infecção e com pequena carga bacteriana, não suficiente para promover o seu isolamento, pois o teste possui baixa sensibilidade necessitando de uma grande quantidade de bacilos viáveis (MARASSI et al., 2013; RUGGIERO et al., 2007) para não causar resultado falso negativo. O número de microorganismos presentes na amostra é muito importante para o diagnóstico preciso pela cultura bacteriana. Dependendo da fase da TBB, um ou mais métodos de diagnóstico pode ser negativo, pois o tipo de resposta que ele pesquisa pode não estar presente no momento da realização do ensaio.

A CB e PCR são considerados métodos padrões no diagnóstico de TBB, pois através do primeiro se realiza o isolamento do microorganismo e do segundo ocorre à identificação de inserções e deleções no DNA que permitem a identificação da espécie (FORRELLAD et al., 2013; MEDEIROS et al., 2010).

Dos cinco animais positivos para TBB na inspeção post-mortem em matadouros, quatro foram confirmados pela presença de *M. bovis* em CB e PCR e um como *M. avium* pelo sequenciamento do produto da PCR, microrganismo importante para a saúde pública. A

inspeção post-mortem de rotina é crucial para o diagnóstico de TBB em abatedouros, mas em razão de fortes semelhanças entre as lesões causadas pela TBB e outras doenças, muitas vezes não é possível concluir o diagnóstico (REIS et al., 1995), ou são diagnosticadas erroneamente como demonstraram Furlanetto et al. (2012) em abatedouros no Estado do Mato Grosso, onde não foi detectada a presença de *M. bovis* por CB e PCR em lesão classificada como tuberculosa pelo SIF em uma das carcaças. Para Furlanetto et al. (2012) o diagnóstico molecular associado à inspeção *post mortem* em abatedouros seria uma estratégia eficiente para acelerar o processo de erradicação de TB no rebanho bovino de regiões com menor prevalência da doença. Porém, a complexidade do PCR e os custos econômicos ainda restringe sua utilização no diagnóstico desta doença (ZANDEN et al., 2002).

A inspeção *post mortem* dos animais destinados ao consumo nos abatedouros tem grande importância na vigilância epidemiológica da tuberculose, pois países endêmicos que possuem satisfatório desempenho dos seus serviços de inspeção nesses estabelecimentos, juntamente com um consolidado programa de controle e erradicação, têm conseguido reduzir a prevalência da doença, uma vez que o diagnóstico precoce é a chave para o combate da TBB (DE LA RUA DOMENECH, 2006; KANTOR; RITACCO, 2006).

Na amostra 1 houve crescimento de colônias na CB, mas não houve identificação do DNA do *M. bovis* na PCR. Provavelmente, estas colônias bacterianas pertenciam à outra espécie do gênero *Mycobacterium* ou houve falha na execução da técnica.

As amostras 2, 3 e 4 não apresentaram crescimento de *M. bovis* na CB, mesmo com a visualização de BAARs na CZN e na IHQ. O isolamento pode não ter ocorrido pela baixa carga microbiana e devido aos métodos de descontaminação da amostra, que podem ter eliminado contaminantes e alguns bacilos, comprometendo o crescimento no meio de cultura (ZANINI et al., 2001).

Nas amostras 5, 11 e não foram visualizados BAARs e nem houve marcação pelo anticorpo na IHQ, mas a bactéria foi isolada na CB e identificada como *M. bovis* na PCR, confirmando a infecção dos animais.

A não visualização de BAARs nas amostras 6 e 16 e não marcação do anticorpo na IHQ na amostra 7, pode ter ocorrido em virtude do pouco número de células gigantes com o microorganismo e muitas áreas de necrose caseosa no material, que dificultou sua detecção direta, mas não impediu o isolamento e identificação do *M. bovis* na CB e PCR.

Na amostra oito houve reação positiva no TTI, presença de lesões macroscópicas e histopatológicas semelhantes à tuberculose, mas a bactéria não foi visualizada no CZN, o anticorpo não foi marcado na IHQ e não houve crescimento na CB. Pode ter ocorrido

problemas na execução da técnica TTI ou o animal está infectado por outro microrganismo causador de lesões macroscópicas semelhantes às de TTB, como afirmam Zanini et al. (2001).

Na amostra 17, o animal apresentava caquexia e várias lesões características de TBB, BAARs foram visualizados pelo CZN e anticorpo marcado na IHQ. As colônias isoladas tinham características semelhantes ao gênero *Mycobacterium* e no sequenciamento do produto da PCR foi identificado como *M. avium*. Kamijn et al. (2007) relataram que membros do Complexo *M. avium* (MAC) provoca infecção pulmonar e lesões disseminadas em hospedeiros imuno-deprimidos e podem interferir nos testes diagnósticos para *M. bovis*, corroborando com os resultados encontrados neste bovino.

O PNCEBT (BRASIL, 2006) preconiza o TTI para o controle desta enfermidade no país, mais é necessária a aplicação de técnicas diagnósticas com boa sensibilidade e especificidade para não ocorrerem resultados falso-positivos e falsos negativos, dada a importância da TBB para a saúde pública como para a pecuária.

Os dados dessa pesquisa corroboram com a afirmação feita por Marassi et al. (2013) que, uma abordagem multidisciplinar para o diagnóstico e controle da TBB seria mais eficaz para identificar todos os animais infectados, independentemente do estágio da doença e dos achados das lesões macroscópicas e histopatológicas serem semelhantes as que podem ocorrer em outras doenças.

Conclusões

Conclui-se que existe presença de TBB causada por *M. bovis* no Estado da Paraíba em bovinos destinados ao abate e nas fazendas; as técnicas de diagnóstico utilizadas individualmente não proporcionam um diagnóstico definitivo e eficaz desta enfermidade; é necessário o uso de exames que trabalhem com a resposta imune celular e humoral com confirmação dos resultados por CB ou PCR; o TTI é um teste de triagem que deve ser confirmado por outros métodos para confirmação da doença evitando prejuízos econômicos para os proprietários de animais e comprometendo o Programa de Controle e Erradicação de tuberculose do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de relevante importância para a Saúde Pública e Animal e economia do Brasil.

Referências

ANDREAZZA, D.; BOOS, G. S.; BOABAID, F. M.; WOUTERS, A. T. B.; WATERS, F.; SOUZA, S. O.; MENEGAT, M. B.; DRIEMEIER, D. Caracterização histológica e Imuno-histoquímica das lesões de tuberculose em bovinos e de linfadenite granulomatosa em suínos. *Pesq. Vet. Bras.* v. 35 n. 2, p. 129-136. 2015.

ÁVILA L. N.; PEREZ A. M.; FERREIRA NETO J. S.; FERREIRA F.; TELLES, E. O.; DIAS R. A.; AMAKU, M.; GONÇALVES, V.S.P. Análise de detecção de cluster na caracterização espaço temporal da tuberculose bovina no Estado da Bahia. *Pesq. Vet. Bras.* v. 33, n. 11, p. 1313-1318. 2013.

BEYTUT, E. Immunohistochemical evaluation of surfactante proteins and lymphocyte phenotypes in the lungs of cattle with natural tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* v. 91, p.119-124. 2011

BENITES, N. R.; BALIAN, S. C.; FERREIRA NETO, J. S.; SAKAMOTO, S. M.; GUERRA, J. L.; SOUZA, S. L. P.; PANETTA, J.C. Isolamento de *Nocardia asteroides* de lesão granulomatosa em carne bovina. *Hig. Alim.* v. 13, n. 59, p. 35-38.1999.

BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA, 2006. 184p. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em 13 nov. 2015.

BREMER-MELHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. *J. Clin. Microbiol.* v.37, n.7, p. 2350-2351.1999.

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

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Métodos de laboratorio de micobacteriologia veterinária para el aislamiento e identification de micobacterias*. Buenos Aires: CPZ, 1973. 48p.

DE LA RUADOMENECH, R.; GOODCHILD, A. T.; VORDEMEIER, H.M.; HEWINSON, R. G.; CHRISTIANSEN, K.H. Ante-mortem diagnosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* v. 81, p. 190-210.2006.

DIAS, A.F.C. M. Caracterização de estirpes de *Mycobacterium bovis*: estudos de crescimento e de interação com macrófagos. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. 2011.

FORRELLAD, M. A.; KLEPP, L. I.; GIOFFRE, A.; SABIO Y GARCIA, J.; MORBIDONI, H. R.; DE LA PAZSANTANGELO, M.; CATALDI, A. A.; BIGI, F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*.v.4, n. 1, p. 3- 66. 2013.

FURLANETTO, L.V.; FIGUEIREDO, E.E.S.; CONTE JUNIOR, C. A.; SILVA, F. G. S.; DUARTE, R.S.; SILVA, J. T.; LILENBAUM, W.; PASCHOALIN, V.M.F. Prevalência de tuberculose bovina em animais e rebanhos abatidos em 2009 no estado de Mato Grosso, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.64, n. 2, p. 274-280.2012.

HUARD, R, C.; LAZZARINI, L, C.; BUTLER, W. R.; VAN SOOLINGEN, D.; HO, J.L. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.* v.4, p. 1637-1650.2003.

KAMIJN, R. E.; WISSELINK, H.J.; RIJSMAN, V. M. C.; ATOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; BAKKER, D.; VAN ZIJDERVELD, F. G.; EGER, T.; WAGENAAR, J. A.;PUTIRULAN, F.F.; URLINGS, B.A.P. Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pig bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol.* v.120, p. 352-357.2007.

KANTOR, I.N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol.* v. 112, p. 111-118.2006.

KREMER, K.; VANSOOLIGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS, P. W. M.; MARTIN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based

on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.*v. 37, p. 2607-2618. 1999.

LÉVY-FRÉBAULT, V.V.; PORTAELS, F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v. 42, p. 315-323.1992.

MARASSI, C. D.; MEDEIROS, L.; FIGUEIREDO, E.; FONSECA, L. S.; DUARTE, R.; PASCHOALIN, V.; OELEMANN, W. M. R.; LILENBAUM, W. A multidisciplinary approach to diagnose naturally occurring bovine tuberculosis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* v.33, n.1, p. 15-20.2013.

MEDEIROS, L.; MARASSI, C. D.; FIGUEIREDO, E.; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis. *Braz. J. Microbiol.* (In press). 2010.DOI:10.1590/S1517- 83822010005000002.

NEILL, S. D.; POLLOCK, J. M.; BRYSON, D. B.; HANNA, J. Pathogenesis of *Mycobacterium* infection in cattle. *Vet Microbiol.*v. 40, p. 41-52.1994.

REIS, D. O.; ALMEIDA, L.; FARIA, A. R. Estudo comparativo entre linfossarcoma, tuberculose e linfadenites inespecíficas ocorridas em bovinos abatidos e a confirmação histológica. *Hig. Alim.*v. 35, p. 28-30.1995.

ROXO, E. *M.bovis* como causa de zoonose. *Rev. Ciênc. Farm.* v.18, n. 1, p. 101-108.1997.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V. C. A; ROXO, E. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. *Arq. Inst. Biol.* v.74, n.1,p. 55-65.2007.

THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH (CFSPH). Bovine Tuberculosis. 2009.

ZANDEN A.G.M. Spoligotyping a tool in epidemiology diagnosis and control of tuberculosis. Tese de doutorado. Katholieke Universiteit Nijmegen. 2002.

ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C.; LOPES, M.T. P.; OLIVEIRA, R. S.; LEÃO, S. C.; FIOVARANTI, R. L.; ROXO, E.; ZUMARRAGA, M.; ROMANO, M. I.; CATALDI, A.; SALAS, C.E. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopses and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 100, p. 749-752.2001.

CAPÍTULO III

Adenocarcinoma pulmonar associado à infecção pelo *Mycobacterium* sp em vaca: relato de caso

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (anexo 5) e submetido em abril de 2016.

Adenocarcinoma pulmonar associado à infecção pelo *Mycobacterium* sp em vaca: relato de caso

*Pulmonary adenocarcinoma associated with infection by *Mycobacterium* sp in cow: case report*

N. G. Medeiros¹, M. T. F. Soares¹, S. V. D. Simões², M. M. Almeida¹, G. M. N. Aguiar³, M. B. Heinemann⁴, J. S. Ferreira Neto⁴, A. F. Souza Filho⁴, N. C. Cárdenas⁴, A. F. M. Dantas¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária-Universidade Federal de Campina Grande ² Departamento de Medicina Veterinária-Centro de Ciências Agrárias-Universidade Federal da Paraíba ³ Unidade Acadêmica de Viçosa-Campus Arapiraca-Universidade Federal de Alagoas ⁴ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade de São Paulo

RESUMO

Descreve-se um caso de adenocarcinoma pulmonar associado à *Mycobacterium* sp. em uma vaca, mestiça, 10 anos de idade, atendida no Hospital Veterinário, Universidade Federal de Campina Grande. Clinicamente, apresentava postura ortopnéica, estase venosa positiva, ingurgitamento da jugular e gemido expiratório. Após oito dias, o animal morreu e foi realizada a necropsia. Macroscopicamente, os pulmões estavam moderadamente aumentados de volume com áreas multifocais a coalescentes branco-amareladas entremeadas por áreas avermelhadas e firmes na superfície pleural que se aprofundavam ao corte, com múltiplos focos de aspecto caseoso, friáveis e áreas de mineralização. Os linfonodos traqueobrônquicos, ilíacos, lombares aórticos e mamários apresentavam lesões semelhantes. O pericárdio parietal tinha nodulações com mesmo aspecto. De acordo com as características macroscópicas das lesões, suspeitou-se de tuberculose e fragmentos de pulmão e linfonodos foram congelados a -80°C e enviados para isolamento de *Mycobacterium bovis*. Histologicamente, no pulmão havia células neoplásicas cuboides, com moderado pleomorfismo, de citoplasma eosinofílico moderado, núcleo redondo a oval vesiculoso com marcada anisocariose, áreas multifocais de necrose e mineralização com abundante proliferação de tecido conjuntivo e edema intra-alveolar acentuado entre elas. Os linfonodos traqueobrônquicos, ilíacos, lombares aórticos e mamários bem como os nódulos no pericárdio parietal apresentavam alterações neoplásicas

similares às descritas no pulmão, com metástase para os demais órgãos afetados. Na cultura bacteriana houve crescimento de colônias amarela-alaranjadas, superfície rugosa. Na TB Multiplex PCR e RD Multiplex PCR não houve amplificação de DNA de *M. bovis* das colônias isoladas. O produto da PCR foi submetido a sequenciamento e no BLASTN verificou-se que se tratava de *Mycobacterium* sp. Os achados histológicos foram compatíveis com adenocarcinoma pulmonar e o sequenciamento da amostra revelou associação da bactéria com a neoplasia.

Palavras-chave: tuberculose bovina, micobactéria, neoplasia, pulmões

ABSTRACT

A case of lung adenocarcinoma associated with *Mycobacterium* sp is described in a cow, 10 years old, attended at the Veterinary Hospital, Federal University of Campina Grande. Clinically, it presents ortopnéica posture, positive venous stasis, engorgement of the jugular and expiratory grunting. After eight days, the animal died and the autopsy was performed. Grossly, the lungs were moderately increased volume with multifocal areas creamy white coalescing interspersed with reddish and firm areas in the pleural surface that deepened when cut, with multiple foci of caseous, and friable mineralization areas. The tracheobronchial lymph nodes, iliac, aortic and breast lumbar had similar injuries. The parietal pericardium had nodules with the same aspect. According to the macroscopic characteristics of the lesions was suspected tuberculosis and lung fragments and lymph nodes were frozen at -80 and sent for isolation of *Mycobacterium bovis*. Histologically, lung had cuboid neoplastic cells with moderate pleomorphism, moderate eosinophilic cytoplasm, nucleus round to oval with vesicular marked anisocariose, multifocal areas of necrosis and mineralization with abundant proliferation of connective tissue and sharp intra-alveolar edema between them. The tracheobronchial lymph nodes, iliac, aortic and breast lumbar and nodules in parietal pericardium had similar neoplastic changes to those described in the lung, with metastasis to other organs affected. In bacterial culture grew yellow-orange colonies, rough surface. In TB Multiplex PCR and Multiplex RD PCR there was no DNA amplification *M. bovis* isolated colonies. The PCR product was subjected to sequencing and BLASTN it was found that it *Mycobacterium* sp. Histological findings were compatible with pulmonary adenocarcinoma and sequencing sample revealed an association of the bacteria with cancer.

Key words: bovine tuberculosis, mycobacterium, cancer, lungs

INTRODUÇÃO

Os tumores primários de pulmão são raros em bovinos, mas geralmente quando ocorrem é do tipo adenocarcinoma (Viott et al., 2010). No Brasil foram descritos apenas por Viott et al. (2010), Lucena et al. (2011) e Sousa et al. (2014). Geralmente apresentam nódulos sólidos, com áreas centrais de necrose, lembrando macroscopicamente granulomas de tuberculose (Caswell e Williams, 2007).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer da Organização Mundial de Saúde para pesquisa de câncer em humanos, há evidências significativas de que alguns tipos de vírus, bactérias e parasitas associados a infecções crônicas estão associados ao desenvolvimento de neoplasias em humanos, como *Helicobacter pylori* com carcinoma gástrico; vírus da hepatite B e C com hepatocarcinoma; *Opisthorchus viverrini* com carcinoma de vias biliares; *Schistosoma haematobium* com carcinoma de bexiga (Instituto Nacional do Câncer, 2016) e a associação de *Mycobacterium* spp com câncer de pulmão em humanos (Silva et al., 2013).

Na Medicina Veterinária tem sido relatados casos de adenocarcinoma gástrico associados a *H. pylori* em chinchila (Lucena et al., 2012) e relatos de casos de colangiocarcinomas em gatas associados à *Platynosomum fastosum* (Andrade et al., 2012). Entretanto, não foram observados na literatura consultada casos de neoplasias pulmonares em bovinos associados a infecções pelo *Mycobacterium* spp. Desta forma, o objetivo deste trabalho é descrever um caso de adenocarcinoma pulmonar em vaca associado ao *Mycobacterium* spp.

CASUÍSTICA

Um bovino, fêmea, mestiço, de 10 anos de idade foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, localizado na cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil, com queixa de redução de apetite, perda de peso e gemidos há aproximadamente 30 dias, agravando-se nos últimos 15 dias. Ao exame clínico, observou-se postura ortopnéica, estase venosa positiva e ingurgitamento da jugular, gemido expiratório e mucosa ocular levemente ictérica. Houve suspeita clínica de tuberculose ou neoplasia. O animal retornou à propriedade e após oito dias morreu.

Na necropsia, o animal apresentava-se magro, com edema de subcutâneo e presença de transudato em pequena quantidade nas cavidades torácica e abdominal. Os pulmões estavam

moderadamente aumentados de volume com áreas multifocais a coalescentes branco-amareladas entremeadas por áreas avermelhadas, firmes, que ao corte, se aprofundavam ao parênquima pulmonar e apresentavam múltiplos focos de aspectos caseosos, friáveis, com áreas de mineralização (Figura 1A), rangendo ao corte. Os linfonodos traqueobrônquicos, ilíacos, lombares aórticos e mamários encontravam-se difusamente aumentados de tamanho, ao corte com perda da distinção entre as regiões cortical e medular, com coloração branco-amarelada e múltiplos focos de mineralização, semelhante aos achados observados no pulmão (Figura 1B). O pericárdio parietal também continha nodulações multifocais firmes, branco-amareladas, de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro.

Fragmentos dos órgãos foram coletados e fixados em formol a 10% tamponado, processados para exame histopatológico e corados com hematoxilina e eosina. Histologicamente no pulmão havia áreas multifocais a coalescentes de massas neoplásicas (Figura 1C), caracterizadas por células cuboides, com moderado pleomorfismo, de citoplasma eosinofílico moderado, núcleo redondo a oval vesiculoso com marcada anisocariose, com um a dois nucléolos bem evidentes (Figura 1D), associados a áreas multifocais de necrose e mineralização distrófica (Figura 1C). Foram observadas em média duas mitoses no campo de maior aumento (Figura 1D). Entre essas áreas, observou-se abundante proliferação de tecido conjuntivo e edema intra-alveolar acentuado. Os linfonodos traqueobrônquicos, ilíacos, lombares aórticos e mamários, bem como os nódulos no pericárdio parietal apresentavam alterações neoplásicas similares às descritas no pulmão, caracterizando metástases. Nos linfonodos, a proliferação neoplásica ocupava quase todo o parênquima, com extensas áreas de necrose caseosa e mineralização distrófica. Na aorta abdominal havia múltiplos focos de mineralização. Foram observados grupos de células neoplásicas na luz de vasos sanguíneos e linfáticos.

Pela coloração de Ziehl-Neelsen não foi observada a presença de BAAR na amostra pesquisada, o que pode estar relacionada à baixa sensibilidade desta técnica pela escassez de bactérias em lesões crônicas (Estrada-Chavez et al., 2004), não descartando a presença de micobactérias nas lesões encontradas nesse animal.

Fragmentos de pulmão e linfonodos foram congelados a -80°C e enviados ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP para isolamento e identificação de *Mycobacterium bovis*. No isolamento as amostras passaram por descontaminação seguida da semeadura nos meios de cultura Lowenstein-Jensen e Stonebrink-Leslie e incubação a 37°C por 60 a 90 dias. Para identificação do agente

etiológico foram utilizadas as técnicas TB Multiplex PCR e RD Multiplex PCR. A última etapa realizada foi o sequenciamento do gene da HSP65.

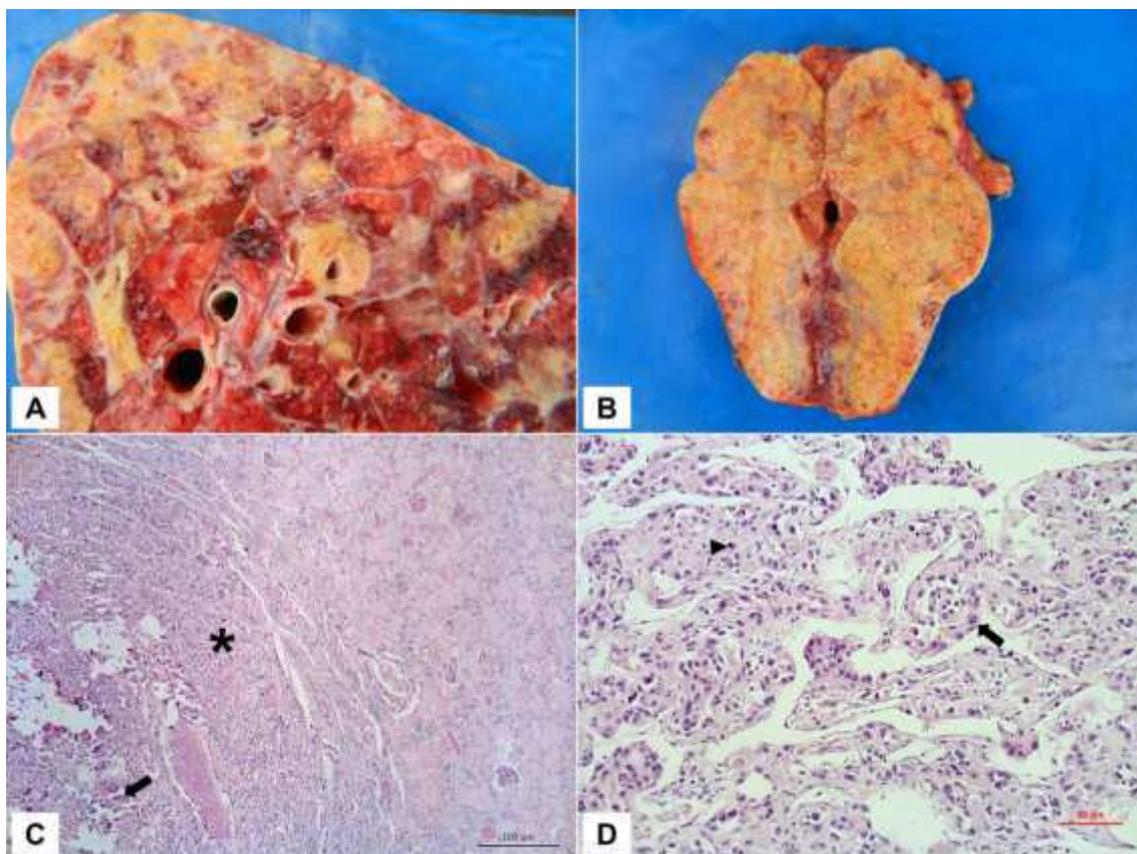


Figura 1 - Adenocarcinoma pulmonar associado a *Mycobacterium* sp em uma vaca. A) Superfície de corte do pulmão apresentando áreas multifocais a coalescentes amarela-esbranquiçadas, firmes e caseocalcárias. B) Linfonodo traqueobrônquico aumentado de volume, demonstrando na superfície de corte áreas difusas semelhantes às observadas no pulmão (metástases). C) Fotomicrografia do pulmão demonstrando massa neoplásica (asterisco) com áreas multifocais de necrose e mineralização distrófica (seta). HE [Bar = 100µm]. D) Aspecto microscópico do adenocarcinoma pulmonar caracterizado por células epiteliais cuboideis de citoplasma eosinofílico, núcleo redondo ou oval e pleomorfismo moderado (seta). Observa-se também figura de mitose (cabeça de seta). HE [Bar = 50µm].

A cultura bacteriana revelou a presença de colônias com crescimento lento e com pigmentação amarela-alaranjada (Figura 2), características de micobactéria atípica, provavelmente do grupo II, de acordo com a descrição de Quinn et al (2004).



Figura 2 - Colônias bacterianas amarela-alaranjadas características do *Mycobacterium* sp.

Na TB Multiplex PCR e RD Multiplex PCR não houve amplificação de DNA de *M. bovis* nas colônias isoladas. O produto da PCR foi submetido a sequenciamento e no BLASTN verificou-se que o isolado era semelhante ao *Mycobacterium* sp., WCM 729965 (ID: [gblKJ873243.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/702074172)), com e-value 0.0 e identidade de 100%. O animal não apresentava tuberculose bovina causada por *M. bovis*, mas estava infectado por uma nova espécie do gênero *Mycobacterium*, uma micobactéria atípica isolada pela primeira vez na África do Sul pelo pesquisador N. Gnebe (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/702074172).

O histórico e quadro clínico do animal associado às lesões macroscópicas de aspecto caseoso com áreas de mineralização sugeriram diagnóstico de tuberculose. Contudo, os aspectos histológicos foram compatíveis com adenocarcinoma pulmonar primário com metástase para linfonodos e saco pericárdico. A insuficiência respiratória e cardíaca congestiva, provavelmente, foi decorrente do aumento da resistência pulmonar pela neoplasia e impedimento da drenagem linfática pelas metástases e também pela compressão do aumento de tamanho dos linfonodos.

Os resultados da cultura bacteriana, PCRs e sequenciamento do gene da HSP65 revelaram que houve associação do adenocarcinoma pulmonar primário com *Mycobacterium* sp. Existem relatos de associações em humanos de adenocarcinoma pulmonar com *Mycobacterium* spp, como as observadas por Sawai et al. (2008). Silva et al. (2013) diagnosticaram TB em 24 pacientes com neoplasias pulmonar, e o tipo histológico mais

comum foi o adenocarcinoma. O risco de câncer pulmonar em pessoas com TB pode aumentar em até 1,8 vezes (Liang et al., 2009).

No Brasil, Viott et al. (2010) em Minas Gerais e Sousa et al. (2014) em São Paulo diagnosticaram adenocarcinoma pulmonar com metástase em alguns órgãos em duas fêmeas bovinas adultas, mas não evidenciaram presença de *Mycobacterium* spp. Lucena et al. (2011) em estudo retrospectivo no Rio Grande do Sul encontraram quatro casos desse tipo de tumor, mas não foi investigado a associação entre este tipo de câncer e esta bactéria.

Apesar de não ter sido diagnosticada tuberculose pulmonar neste estudo, mas a presença de uma espécie do gênero *Mycobacterium*, é importante ressaltar que a relação entre inflamação crônica e câncer está bem estabelecida, mas a relação entre tuberculose e neoplasias ainda não é compreendida. Existem dúvidas da causa primária, se é o tumor ou a tuberculose. Pacientes com neoplasias estão vulneráveis a desenvolverem tuberculose ativa por causa da imunossupressão ocasionada pela desnutrição e quimioterapias agressivas (Harikrishna et al., 2012). No entanto, a inflamação crônica e as cicatrizes da tuberculose podem levar ao desenvolvimento de câncer, pois durante o desenvolvimento do granuloma ocorre um desequilíbrio entre o tecido e os agentes que o danificam, podendo causar danos ao DNA e na reparação dos tecidos predispor a transformação maligna (Russell, 2007).

As micobactérias atípicas têm importância significativa, pois infectam os animais de forma inaparente e são transmitidas ao homem causando reação cruzada com o *M. tuberculosis*, alterando a interpretação da reação tuberculínica e a eficácia da vacina BCG (Vandiviere et al., 1981), provocando em indivíduos sadios resultados falso-positivos e não proteção vacinal. Provavelmente, essas bactérias atípicas podem interferir no resultado do teste de tuberculinização em bovinos, pois o *M. bovis* também pertence ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, além de predispor ou desencadear o surgimento de neoplasias pulmonares em bovinos.

Bovinos infectados com essas espécies atípicas podem se tornar fonte de infecção para pacientes humanos imunossuprimidos, multiplicando-se e causando doenças com sintomatologias variadas. Logo, a detecção dos animais infectados e o conhecimento da existência das espécies atípicas de micobactérias no país são relevantes para a saúde pública e pode diminuir as perdas econômicas com o sacrifício de animais falso-positivos.

Este estudo demonstrou que o *Mycobacterium* sp pode estar associado ao adenocarcinoma pulmonar em bovinos e que são necessários novos estudos para confirmar a patogenicidade dessa bactéria no desenvolvimento da neoplasia e da sua influência nos

resultados do teste de tuberculinização utilizados para o controle e erradicação da tuberculose bovina.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a valiosa colaboração do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, R. L. F. S.; DANTAS, A. F.M.; PIMNETEL. L. A. *et al.* *Platynosomum fastosum* induced cholangiocarcinomas in cats. *Parasitol. Vet.*, v. 190, p. 277-280. 2012.

ESTRADA-CHÁVEZ, C.; DIAZ, O.F.; ARRIAGA, D.C. *et al.* Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnostico de tuberculosis bovina. *Vet. Méx.*, v. 35, n.3, p. 225-236. 2004.

HARIKRISHNA, J.; SUKAVENI, V.; PRABATH KUMAR, D.; MOHAN, A. Cancer and tuberculosis. *JACM.*, v. 13, n.2, p.142-144. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Infecção e Câncer*. Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: www.inca.gov.br/situaçao/arquivos/causalidade_infecção_cancer.pdf. Acessado em: 13 mar.2016.

LIANG, HY.; LI, XL.; YU, XS. *et al.* Facts and fiction of the relationship between preexisting tuberculosis and lung cancer risk: a systematic review. *Int J Cancer.*, v. 125, n.12, p. 2936-44. 2009.

LUCENA, R. B.; RISSI, D.R.; KOMMERS, G.D. *et al.* A retrospective study of 586 tumors in brazilian cattle. *J. Comp. Path.*, v.145, p. 20-24. 2011.

LUCENA, R. B.; RISSI, D.R.; QUEIROZ, D.M.M.; BARROS, C. S. L. Infiltrative gastric adenocarcinoma in a chinchila (*Chinchilla lanigera*). *J Vet Diagn Invest.*, v.24, n. 4, p. 797-800, 2012

QUINN, P. J.; QUINN, P. J. Mycobacterium species. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby: Elsevier Limited, p. 156-169. 2004.

RUSSELL, D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.*,v.5, p. 39-47. 2007.

SILVA, D. R.; VALENTINI JUNIOR, D. F.; MULLER, A. M. *et al.* Pulmonary tuberculosis and lung câncer: simultaneous and sequential occurrence. *J. Bras. Pneumol.*, v. 39, n.4, p. 484-489. 2013.

SOUSA, D. R. L.; RIVERA, L.; QUEVEDO, D. *et al.* Adenoma carcinoma pulmonar em bovinos. *Rev. MVZ Córdoba.*, v. 19, n.3, p. 4358-4363. 2014.

SAWAI, T.; SODA, H.; KOHNO, S. *Mycobacterium intracellulare* pulmonary infection which co-existed and mimicked lung cancer. *Internal Med.*, v. 47, p.459-462. 2008.

VANDIVIERE, H. M.; MELVIN, I. G.; NARAIN, R. *et al.* Profiles of skin test reactivity to antigens of various mycobacterial species in a human population and in experimental infections. *Tubercle.*, v. 61, p. 245-257. 1981.

VIOTT, A. M.; LANGOHI, I. M.; VANNUCCI, F. A. *et al.* Adenocarcinoma pulmonary em um bovino. *Ciência Rural*, v.40, n.2, p. 484-487. 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de microorganismos contaminando o leite UHT produzido a nível nacional e comercializado na Paraíba indica que estão ocorrendo falhas, que podem ser desde a obtenção da matéria-prima, passando pelo processamento industrial e armazenamento. O consumo expõe a população a riscos de contrair doenças, lesando o consumidor, que paga um preço maior pelo produto devido ao processo térmico utilizado, visando ter um produto de maior segurança alimentar.

A presença da tuberculose no rebanho bovino do Estado da Paraíba é um fato importante para a saúde pública, pois a população e principalmente as pessoas portadoras de microorganismos que deprimem o sistema imunológico ou que são submetidas a terapias agressivas como quimioterapia, Médicos Veterinários e trabalhadores da indústria de carne podem se infectarem e terem complicações graves. Logo, é necessária a aplicação de ações mais efetivas no sistema de monitorização desta doença por parte de todos os envolvidos no seu programa de controle e erradicação.

O exame macroscópico realizado na inspeção post-mortem dos bovinos durante o abate e a aplicação do teste de tuberculinização intradérmica nas fazendas, empregados isoladamente, em alguns casos não são suficientes para promoverem o diagnóstico definitivo da tuberculose, em consequência das características particulares do gênero *Mycobacterium* e o estágio da resposta imunológica do hospedeiro.

A presença de micobactérias atípicas como *Mycobacterium* sp. em bovinos pode ser um fator desencadeante para o desenvolvimento de neoplasias malignas pulmonares, semelhantes às descritas em humanos, entretanto, necessita-se de mais estudos que possam esclarecer a patogênese desses tumores associados a espécies do gênero *Mycobacterium*.

A avaliação das características microbiológicas do leite e da carne destinados ao consumo da população é fundamental para a prevenção e controle de alguns microorganismos causadores de doenças, como: bactérias do grupo mesófilo e do gênero *Mycobacterium*. As medidas adotadas durante a inspeção dos produtos de origem animal, retira do consumo humano carcaças, órgãos e vísceras contaminadas e de má qualidade. Além disso, fornece informações sobre as doenças mais prevalentes e permite o rastreamento dos animais. As ações de fiscalização e vigilância da Defesa Agropecuária são fundamentais para a saúde pública humana e animal.