

Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção *post-mortem* de bovinos. *Bacteriological analysis of the tuberculosis as support to the bovine post-mortem inspection*

PINTO, P. S. A.*; FARIA, J. E.; VILORIA, M. I. V.; BEVILACQUA P.D.

*Universidade Federal de Viçosa- Departamento de Veterinária – pintopsa@ufv.br

RESUMO: Como o exame histopatológico, o bacteriológico tem sido apontado como a sinalização mais segura da presença de micobactérias em animais com tuberculose e outras micobacterioses. Foram examinados 48 bovinos reagentes ou suspeitos à prova de tuberculinização intradérmica ano-caudal e comparativa cervical. O exame microbiológico se constituiu do isolamento de *Mycobacterium* sp e da determinação da presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) nas amostras (Ziehl Neelsen). Observou-se uma baixa sensibilidade do exame microbiológico frente ao exame anatomopatológico (38,7%) e, relativamente baixa, à tuberculinização (62%). O exame microbiológico foi positivo diversas vezes, em situações de ausência de lesões, confirmando a sua importância em situações especiais de inspeção que demandem maior proteção à saúde pública. A ocorrência de lesões em órgãos na ausência de micobactérias, foi o segundo perfil de diagnóstico entre diferentes métodos, apresentado em ordem de frequência. Estes resultados reforçam a necessidade de avaliação microbiológica simultânea a outros recursos diagnósticos, bem como o emprego conjunto do isolamento e da baciloscopia em lâmina, para a análise microbiológica. A comprovação das micobactérias atípicas, comuns em bovinos, como agentes etiológicos da tuberculose humana, principalmente em pacientes portadores do vírus HIV, refletem a importância da atualização do conceito da patogenicidade desse grupo de bactérias ao homem, bem como do seu diagnóstico em animais produtores de carne.

PALAVRAS CHAVE: tuberculose, exame microbiológico, micobactérias, inspeção de carnes.

SUMMARY: As the histopathological, the bacteriological exam has been the safest method to show the mycobacteria presence in animals with tuberculosis and other mycobacteriosis. Forty eighth positive or suspects bovine tuberculin were examined. The bacteriological exam was performed with the mycobacteria culture and the determination of the acid-fast bacilli presence. The sensitivity of the bacteriological exam to the anatomopathological exam was low (38,7%) and higher to the tuberculin (62%). In the absence of lesions, the result of the bacteriological exam was positive several times, showing its importance in special situations of inspection that demand more public health protection. The mycobacteria absence and the occurrence of lesions in organs simultaneously, was the second diagnosis profile among different methods. These results reinforce the need of the simultaneous bacteriological evaluation with other diagnoses methods, as well as the simultaneous employment of the culture and the direct acid-fast bacilli demonstration for the bacteriological analysis. The confirmation of the atypical mycobacteria, that is common in bovine, as etiologic agents of the human tuberculosis, mainly in carriers of the HIV virus, reflects the importance to update the concept of the human pathogenicity of that microorganisms and the importance of its diagnosis in meat producing animals.

KEYWORDS: tuberculosis, microbiological analysis, mycobacteria, meat inspection.

Rev. Bras. Saúde Prod. An. 3 (1):10-15, 2002.

Publicação Online da EMV/UFBA – <http://www.rbspa.ufba.br>

INTRODUÇÃO

O estudo bacteriológico da tuberculose serve para controlar o diagnóstico realizado no campo ou durante a inspeção em matadouros e permite avaliar a eficácia da prova da tuberculinização (CPZ, 1986).

Além de revelar altos índices de mortalidade e de morbidade no homem, sobretudo em pacientes imunodeprimidos, como os acometidos pelo vírus HIV, a tuberculose

constitui uma significativa causa de condenação de animais em matadouros e de mortalidade animal, resultando numa perda econômica estimada em 10% da produção leiteira e em 20% da produção da carne bovina brasileira (Grange & Yates, 1994; Ferreira & Bernardi, 1997).

A possibilidade de ocorrência de reações paralérgicas na prova da tuberculinização,

Rev. Bras. Saúde Prod. An. 3 (1):10-15, 2002.

causadas por micobactérias atípicas, em particular o *Mycobacterium intracellulare*, além de outros microrganismos, alerta para a observância de cuidados especiais na prática da inspeção *post-mortem* de bovinos suspeitos ou reagentes, principalmente dos provenientes de rebanhos leiteiros, onde a incidência da tuberculose é alta (Castro & Nemoto, 1972; Langenegger & Langenegger, 1981; Souza *et al.*, 1999).

Tem sido relatada a presença de micobactérias em bovinos e suínos na ausência de lesões anatomopatológicas, tornando insuficiente a análise macroscópica dos órgãos, como o único critério para o diagnóstico da infecção micobacteriana (Brown & Neuman, 1979).

Por outro lado há situações em que não se detectou micobactérias em lesões anatomopatológicas sugestivas de tuberculose (Brown & Neuman, 1979; Balian *et al.*, 1997).

Os bovinos constituem uma importante fonte de infecção de micobacterioses, principalmente por *M. intracellulare* para o homem, destacando-se como o principal agente de tuberculose humana causada por micobactérias atípicas. *M. scrofulaceum* tem sido incriminado como causador de adenites cervicais em crianças (Castro & Nemoto, 1972).

Embora o *M. bovis* seja o isolado mais comum em tuberculose bovina, a presença de micobactérias atípicas nesta espécie tem despertado muita atenção em diversos países, principalmente devido às constatações

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados 48 animais reagentes ou suspeitos à prova de tuberculinização intradérmica ano-caudal e comparativa cervical, gerando 147 unidades amostrais submetidas ao exame anatomopatológico. As referidas unidades amostrais foram sistematicamente compostas dos linfonodos cervicais superficiais e ilíacos internos de todos os animais, que apresentavam lesões ou não,

científicas mostrando que estas micobactérias causam importantes doenças pulmonares e extra-pulmonares no homem (Castro & Nemoto, 1972).

Na primeira metade do século XX, a tuberculose pulmonar humana causada pelo *M. bovis* tinha uma baixa prevalência entre 0,5 e 5,0%, mas nas últimas décadas, os registros mostram tendências de elevação do número de casos de tuberculose pulmonar por *M. bovis*, em comparação a outros órgãos. Cerca de 40-60% das lesões tuberculosas causadas por *M. bovis* se manifestam nos pulmões (Grange & Yates, 1994).

Micobactérias atípicas, muito comuns no ambiente, podem causar doenças humanas tão sérias e extensas como a tuberculose, mas, sem dúvida, com capacidade bem menor de causar doenças clínicas (CPZ, 1986; Grange & Yates, 1994).

Se faz necessário discutir o significado do teste microbiológico, como método diagnóstico auxiliar à inspeção *post-mortem* no intuito de aperfeiçoar a estimativa dos riscos de transmissão da tuberculose ao homem pelo consumo de carne, valorizando os mais recomendados em situações particulares.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o desempenho do recurso microbiológico como apoio à inspeção *post-mortem* em situação especial, quando os bovinos eram suspeitos ou reagentes ao teste de tuberculinização.

além de outros linfonodos e órgãos, sobretudo o pulmão, que apresentavam lesões sugestivas ou típicas de tuberculose ao exame anatomopatológico.

O grupo dos animais estudados se caracterizou por bovinos mestiços holandês-zebú, de ambos os sexos, idade variando de 1 a 10 anos e

procedência de uma mesma propriedade da cidade de Viçosa-MG.

O exame microbiológico se constituiu do isolamento de *Mycobacterium sp* e da baciloscopia (Ziehl Neelsen), através da determinação da presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), realizados nos 31 órgãos com lesão e em outros 46 linfonodos sem lesões, aleatoriamente escolhidos.

O método de exploração anatomopatológica dos animais se baseou nas normas do exame *post-mortem* do Serviço de Inspeção Federal, descritas em Brasil (1971).

No mesmo dia da colheita das amostras foi processado o material destinado aos ensaios microbiológicos.

Os métodos de isolamento dos bacilos e da baciloscopia foram baseados na metodologia proposta pelo Centro Panamericano de Zoonoses (CPZ, 1986).

As unidades amostrais foram encaminhadas ao laboratório, individualmente em sacos plásticos, posteriormente foram mergulhados em álcool e flambados (Langenegger & Langenegger, 1981); destes foram retirados, assepticamente, vários fragmentos com cerca de 2g de peso cada um e triturados em gral, adicionando-se solução fisiológica na proporção 1:3 e areia estéril. O macerado foi tratado com solução de NaOH a 5% em partes iguais (2ml), durante 15 minutos em estufa a 37°C, visando a descontaminação do material. A amostra tratada foi centrifugada a 2.500g,

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra os resultados dos exames microbiológico e anatomopatológico, obtidos a partir da seleção de 50 órgãos entre os 147 examinados à inspeção *post-mortem* dos 48 bovinos positivos ou suspeitos à tuberculinização. A partir desses resultados foi possível estabelecer os perfis de diagnóstico combinando os diferentes recursos analíticos

durante 20 minutos, seu sedimento foi recolhido, neutralizado com solução de HCl 0,1N (pH 6,5 a 7,2), com vistas à sementeira de 0,3 a 0,5ml deste homogenato em meio de Löwenstein Jensen, com e sem glicerol, seguida de incubação a 37°C durante 3 meses, fazendo observações do crescimento de micobactérias diariamente.

Foram repetidos os ensaios microbiológicos das amostras congeladas que apresentaram resultados positivos no exame anatomopatológico e, preliminarmente, no microbiológico.

Para a análise comparativa dos resultados dos exames microbiológico, tuberculina e anatomopatológico foi selecionada uma amostragem composta de 50 unidades de amostras, constituídas de 31 fragmentos com lesões macroscópicas típicas ou sugestivas de tuberculose localizadas em tecidos diversos, além de 19 linfonodos cervicais superficiais ou ilíacos internos coletados sem lesões, porém positivos ao exame microbiológico.

Foram consideradas lesões típicas, aquelas caseosas ou calcificadas, purulentas ou não. As lesões sugestivas apresentavam características nodulares, predominantemente hemorrágicas, de tamanhos e formas variados.

Os resultados obtidos nas avaliações das provas de tuberculina, microbiológica e anatomopatológica foram dispostos em tabelas de contingência e comparados através do cálculo de medidas de sensibilidade e especificidade diagnóstica.

pesquisados, bem como dimensionar a sua frequência.

Nesta amostragem, 25 diferentes animais mostraram lesões macroscópicas sugestivas ou típicas de tuberculose ou revelaram a presença de micobactérias. Dos referidos órgãos 34 procederam de animais tuberculina positivos e 16 suspeitos.

Apenas 12% das 50 amostras selecionadas para análise foram positivas ao isolamento e 50% à investigação de BAAR. Observou-se que a combinação da baciloscopia com o isolamento aumentou a eficiência do exame microbiológico, ampliando sua sensibilidade para 62% (tabela 2). Tanto nos bovinos

tuberculina positivos, quanto nos suspeitos, predominou o perfil de diagnóstico M+A-, ou seja, microbiológico positivo na ausência de lesões, ocupando o segundo lugar, o M-As, microbiológico negativo na presença de lesões sugestivas.

Tabela 1. Frequência dos perfis de diagnóstico da tuberculose bovina: tuberculinização positiva ou suspeita, exame microbiológico positivo (M+) ou negativo (M-) e exame anatomopatológico típico (At), sugestivo (As) ou negativo (A-).

Tuberculinização	Perfil		Frequência	
	Microbiológico	Anatomopatológico	Distribuição	%
Positiva	M+	At	5	14,7
		As	6	17,6
		A-	11	32,4
		Subtotal	22	64,6
	M-	At	5	14,7
		As	7	20,7
Subtotal		12	35,4	
	Total	34	100,0	
Suspeita	M+	At	1	6,3
		A-	8	50,0
		Subtotal	9	56,3
	M-	At	1	6,3
		As	6	37,4
		Subtotal	7	43,7
	Total	16	100,0	

Provavelmente a maioria das cepas positivas se trate de micobactérias atípicas, que têm sido encontradas em bovinos sem lesões aparentes (Castro & Nemoto, 1972).

A ausência de micobactérias ocorrida em 35,4% das amostras de animais tuberculina positivos com lesões típicas ou sugestivas (tabela 1), pode estar associada ao seu baixo número encontrado nas lesões no momento da coleta das amostras ou à dificuldade de isolamento de cepas de *M. bovis*, eventualmente presentes nas amostras, por intermédio do meio de cultura utilizado, o Löwenstein-Jensen (CPZ, 1986).

Embora a baciloscopia seja considerada um exame básico em tuberculose humana, sobretudo do escarro, ela não é tão sensível no diagnóstico da tuberculose animal, pois os bacilos nem sempre são visualizados na amostra, mesmo na presença de lesões. Para se obter uma baciloscopia positiva em diagnóstico

bacteriológico nas formas extrapulmonares, a amostra deve ter pelo menos 10^5 bacilos/ml (CPZ, 1986).

Segundo Brown & Neuman (1979) e Balian *et al.* (1997), a ausência de micobactérias em análises de lesões anatomopatológicas sugestivas de tuberculose pode estar associada a três hipóteses:

- deficiência do método de isolamento com morte na descontaminação ou dificuldade de se multiplicar no cultivo;
- morte da micobactéria após promover a lesão, pela defesa do próprio organismo;
- lesão causada por outro tipo de microrganismo.

As tabelas 2 e 3 mostram os resultados, que podem ser úteis na verificação do desempenho do exame microbiológico frente aos exames de tuberculinização e anatomopatológico, respectivamente.

Tabela 2 - Frequência dos resultados do exame microbiológico de bovinos, segundo a sua reação à tuberculinização.

Testes	Lâmina		Isolamento		Lâmina ou Isolamento		Total	
	+	-	+	-	+	-		
Tuberculinização	Positiva	19	15	3	31	22	12	34
	Suspeita	6	10	3	13	9	7	16
	Total	25	25	6	44	31	19	50

Tabela 3 - Frequência dos resultados do exame microbiológico de bovinos positivos ou suspeitos à tuberculinização, segundo a sua condição anatomopatológica.

Testes	Positivo	Negativo	Total	
Anatomopatológico	Positivo*	12	19	31
	Negativo	19†	0‡	19
	Total	31	19	50

*12 lesões macroscópicas típicas (5 calcificadas) e 19 sugestivas.

†13 oriundos de lâmina e 6 do isolamento.

‡Não investigado

Apareceram lesões macroscópicas típicas ou sugestivas de tuberculose em 62% das amostras estudadas.

Observou-se uma baixa sensibilidade do exame microbiológico frente ao exame anatomopatológico (38,7%) e, relativamente baixa, à tuberculinização (62%), considerando que expressiva parte da amostragem foi selecionada pelos resultados positivos ao exame anatomopatológico. Entretanto o exame microbiológico indicou a presença de micobactérias em 38% das amostras aparentemente sem lesões, confirmando a sua importância em situações especiais de inspeção que demandem maior proteção à saúde pública, como no caso de abate de bovinos positivos ou suspeitos à tuberculinização.

Estas considerações reforçam a necessidade de avaliação microbiológica simultânea a outros recursos diagnósticos, bem como o emprego conjunto do isolamento e da baciloscopia em lâmina, para a análise microbiológica.

A comprovação das micobactérias atípicas como agentes etiológicos da tuberculose humana, principalmente em pacientes portadores do vírus HIV, refletem a importância da atualização do conceito da

patogenicidade desse grupo de bactérias ao homem, bem como do seu diagnóstico em animais produtores de carne (Castro & Nemoto, 1972; Barreto *et al.*, 1993; Saad *et al.*, 1997).

Falhas no diagnóstico, desprezando o exame microbiológico, sobretudo a identificação do agente causador, tem contribuído para o aumento do número de casos de tuberculose bovina no Brasil, segundo Souza *et al* (1999). Estes autores alertam para a possibilidade de ocorrência de uma epidemia de tuberculose nos próximos anos, em razão dessas falhas, que dificultam ainda mais a programação de medidas de controle, que, segundo Ferreira Neto & Bernardi (1997), são incipientes no país atualmente.

No emprego dos recursos disponíveis, de acordo com os objetivos perseguidos com vistas à aplicação de medidas de controle da tuberculose, deve-se considerar a nova filosofia de controle de qualidade dos produtos de origem animal, integrando as funções de inspeção, controle de qualidade e vigilância sanitária em toda a cadeia produtiva, considerando o princípio da rastreabilidade e permitindo melhores definições de risco, com reflexos diretos na economia e na prevenção da saúde pública e animal.

CONCLUSÕES

Confirmou-se a importância da tuberculização como método de seleção de animais que possam representar risco à saúde pública, bem como verificou-se uma deficiência de sensibilidade do exame microbiológico frente ao exame anatomopatológico e à tuberculização. Entretanto o exame microbiológico foi positivo diversas vezes, em situações de ausência de lesões, confirmando a sua importância em situações especiais de inspeção que demandem maior proteção à saúde pública.

Considerando-se a redefinição da influência das micobactérias de origem animal e ambiental na saúde pública, nos últimos anos, e a grande variação do nível de desempenho dos métodos convencionais de investigação da tuberculose em animais destinados ao abate, há necessidade de se adotarem estratégias que combinem os recursos anatomopatológico e microbiológico entre si e com outros, como a tuberculização e outros mais modernos e de maior desempenho, com vistas ao aprimoramento das ações de decisão sanitária do médico veterinário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balian SC; Ribeiro P; Vasconcellos SA; Pinheiro SR; Ferreira-Neto JS; Guerra JL, *et al.* Linfadenites tuberculóides em suínos abatidos no Estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias. *Rev. Saúde Pública* 1997; 31(4):391-7.
- Barreto JA; Palaci M; Ferrazoli L; Martins MC; Suleiman J; Lourenço R, *et al.* Isolation of *Mycobacterium avium* complex from bone marrow aspirates of AIDS patients in Brazil. *J. Infect. Dis.* 1993; 168:777-9.
- Brasil/MA. Inspeção de carnes: padronização de técnicas, instalações e equipamentos. Brasília: DIPOA/DICAR; 1971.
- Brown J; Neuman MA. Lesions of swine lymphonodes as a diagnostic test to determine mycobacterial infection. *Appl. Environ. Microbiol* 1979; 37(4):740-3.
- Castro AFP; Nemoto H. Occurrence of atypical mycobacteria in the lymphonodes of apparently healthy slaughtered cattle in São Paulo, Brasil. *Rev. Microbiol* 1972; 3(2):75-8.
- Centro Panamericano de Zoonosis - CPZ. Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis III. Sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas. La identificación de micobactérias. Buenos Aires; 1986. (Nota técnica, 28).
- Ferreira Neto JS; Bernardi F. Control of bovine tuberculosis, particularly in Brazil. *Higiene Alimentar* 1997; 11:9-13.
- Grange JM; Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.* 1994; 40:137-51.
- Langenegger CH; Langenegger J. Prevalência e distribuição de sorotipos de micobactérias do complexo MAIS isoladas de suínos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 1981; 1(3):75-80.
- Saad MH; Vincent V; Dawson DJ. Analysis of *Mycobacterium avium* complex serovars isolated from AIDS patients from southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1997; 92:471-5.
- Souza AW; Souza CFA; Souza RM; Ribeiro RMP; Oliveira AL. A importância da tuberculose bovina como zoonose. *Higiene Alimentar* 1999; 13 (59):22-7.