

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

TUBERCULOSE EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*, var. *bubalis*-Linnaeus, 1758): DIAGNÓSTICO, AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA, FATORES DE RISCO E GEORREFERENCIAMENTO EM REBANHOS DA BAIXADA MARANHENSE – MA, BRASIL

Vanessa Evangelista de Sousa

São Luís – MA
2013

Vanessa Evangelista de Sousa

TUBERCULOSE EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*, var. *bubalis*-Linnaeus, 1758): DIAGNÓSTICO, AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA, FATORES DE RISCO E GEORREFERENCIAMENTO EM REBANHOS DA BAIXADA MARANHENSE – MA, BRASIL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Hamilton pereira Santos

São Luís – MA
2013

Sousa, Vanessa Evangelista de.

Tuberculose em búfalo (*Bubalus bubalis*, var. *bubalis* – Linnaeus, 1758): diagnóstico, avaliação da resposta alérgica, fatores de risco, georeferenciamento em rebanhos da Baixada Maranhense – MA, Brasil / Vanessa Evangelista de Sousa.– São Luís, 2013.

91 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2013.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 30/07/2013 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. DSc. Hamilton Pereira Santos
1º Membro

Prof. DSc. Ferdinan Alemeida Melo
2º Membro

Prof. DSc. Hélder de Moraes Pereira
Orientador

Aos meus pais Francisco Walber Pereira de Sousa e Aldina Evangelista Coêlho, pelo amor, admiração, confiança, dedicação, incentivo e pelas dificuldades que juntos enfrentamos; aos meus irmãos Renata, Carlos Eduardo e Rafael que sempre estiveram ao meu lado. A Eles por serem as grandes razões da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e bênçãos concedidas.

A meu pai Francisco Walber Pereira de Sousa, minha mãe Aldina Evangelista Coelho e irmãos Renata, Carlos Eduardo e Rafael pelo incentivo e compreensão.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

Ao meu Orientador Professor DSc. Hélder de Moraes Pereira, pela oportunidade, dedicação e total confiança na execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor DSc. Hamilton Pereira Santos pelo incentivo, amizade, apoio, conselhos e ensinamentos durante esta etapa de minha vida.

A todos os professores do Curso de Mestrado em Ciência Animal, por terem contribuído para minha formação.

A minha amiga Janaira Silva Sá pela ajuda e companhia durante momentos de grande dificuldade ao longo deste trabalho.

Ao grupo de Estudo e Pesquisa com Ruminantes Domésticos, especialmente a Glenda Barros, Rafael Soares, Gabriel Xavier, Mayra Oliveira, Emerson Antônio, Carlos Eduardo Rabêlo, Thalita Lima e Ana Américo por terem contribuído diretamente para a realização desta pesquisa.

Aos meus colegas Iralbert Santos, Ynady Costa, Juciely Oliveira, Nancileny Bezerra e Danilo Bezerra pela grande colaboração.

Ao colega Roberto Carlos Arruda, pela grande ajuda no processamento dos dados de georreferenciamento.

Aos meus colegas de mestrado, em especial a Adriana Vívian, Edvaldo Amorim, Inaldo Macêdo, Alessandra Lima, Valéria Bittencourt pelos conselhos, apoio e momentos de descontração mesmo nos momentos difíceis.

As minhas vizinhas amigas e irmãs Lourdinha, Júlia e Márcia por terem me adotado e acima de tudo pela amizade, conselhos, apoio e companhia durante esta etapa, serei eternamente grata.

Ao funcionário do Laboratório de Doenças Infecciosas, Evangelista a quem carinhosamente chamamos “Evan” pelo auxílio prestado durante as atividades no Laboratório.

A Francisca (“Fran”) atual secretária da coordenação do mestrado, bem como Laudicéia e Rosângela pelo empenho, dedicação e carinho.

Aos motoristas, Ricardo, Marion, Rony e Mauro por nos conduzir de forma tranquila e alegre durante as viagens.

A todos os funcionários do Curso de Medicina Veterinária, em especial a D. Socorro, Emerson, Rubens e Rony que carinhosamente me chamam de “flor”.

A todos os proprietários, em especial ao Sr. Antônio Augusto (*in memória*), Raimundo Nonato, Tenack Júnior, Sérgio Muniz e Marcelo Bezerra por terem cedido seus animais e aberto as portas de suas casas sempre nos recebendo de forma acolhedora, além de se tornarem grande parceiros de trabalho.

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela oportunidade do PROCAD.

Aos Professores DSc. Andrey Lage e Marcos Bryan Heinneman pela parceria, orientações e ensinamentos.

A Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED), por nos ter dado suporte na localização das propriedades.

A Fundação de Apoio a Pesquisa e Tecnologia do Estado do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento desta pesquisa através do REBAX.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para pesquisa.

Ao PROCAD-NF, pelo auxílio durante dois meses de estágio na UFMG.

Ao Laboratório IDEXX pela parceria e doação dos kits de ELISA.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

SOUSA, V. E. **Tuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*, var. *bubalis*-Linnaeus, 1758): diagnóstico, avaliação da resposta alérgica, fatores de risco e georreferenciamento em rebanhos da Baixada Maranhense – MA, Brasil.** [Tuberculosis in buffalos (*Bubalus bubalis*, var. *bubalis*-Linnaeus, 1758): diagnosis, evaluation of the allergic response, risk factors and georeferencing in cattle of the Baixada Maranhense – MA, Brasil.]. 2013. (91 folhas). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2013.

A tuberculose é uma enfermidade infectocontagiosa de caráter crônico e evolução lenta em que os sinais clínicos somente serão evidenciados na doença avançada ocasionando perdas significativas na produção de leite e carne. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi estudar a tuberculose em búfalos através do diagnóstico, resposta alérgica, fatores de risco e georreferenciamento na Baixada Maranhense, Maranhão. O estudo foi realizado em 17 rebanhos, distribuídos em 7 municípios da Baixada Maranhense. Sendo assim, dos 30 municípios que compõe a região da Baixada Maranhense (AGED, 2011), sete, foram trabalhados nesta pesquisa. Desta forma, foram avaliados 17 rebanhos oriundos dos municípios de Arari, Matinha, Olinda Nova do Maranhão, Pinheiro, São João Batista, Viana e Vitória do Mearim. Foram avaliados 477 búfalos, sendo 444 fêmeas e 33 machos de diferentes raças e com idade variando entre 1,5 a 216 meses. Os animais foram submetidos ao Teste Cervical Comparativo (TCC) e as amostras de sangue ao teste de ELISA indireto. Para cada rebanho foi aplicado um questionário epidemiológico, a fim de determinar fatores de risco associados à infecção pelo *M. bovis*. A frequência de animais positivos ao TCC foi de 7,58% (n=36). A avaliação da resposta alérgica mostrou que os aumentos médios da espessura da dobra pele de bubalinos induzidos pela aplicação da tuberculina aviária e bovina, apresentaram médias variando de 12,24 a 14,82 mm e 11,99 a 13,68 mm respectivamente. Dos 455 soros sanguíneos avaliados através da técnica de ELISA indireto, observou-se 13,41% (n=61) de animais reagentes. Com base nos dados pode-se concluir que a da infecção pelo *M. bovis* é baixa; o aumento máximo da espessura da pele ocorreu 72 horas após a inoculação das tuberculinas; foram considerados fatores de risco para a transmissão do *M. bovis*, instalações, densidade animal e realização de tuberculinização; o estudo espacial demonstrou que a infecção pelo *M. bovis* encontra-se distribuída de forma homogênea na região estudada.

Palavras – chave: Bubalinos, reação alérgica cutânea, doenças infecciosas, Maranhão

ABSTRACT

SOUSA, V. E. **Tuberculosis in buffalos (*Bubalus bubalis*, var. *bubalis-Linnaeus, 1758*): diagnosis, evaluation of the allergic response, risk factors and georeferencing in cattle of the Baixada Maranhense – MA, Brasil.** [Tuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*, var. *bubalis-Linnaeus, 1758*): diagnóstico, avaliação da resposta alérgica, fatores de risco e georreferenciamento em rebanhos da Baixada Maranhense – MA, Brasil.]. 2013. (91 pages). Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2013.

The tuberculosis is a chronic infectcontagious disease of slow evolution wherein the clinical signs only will be evidenced in the advanced disease causing significant losses in milk production and meat. In that way, the object of this work was to study tuberculosis in buffalos through diagnosis, allergic response, risk factors and georeferencing in the Baixada Maranhense, Maranhão. The study was performed in 17 cattles, distributed in 7 municipalities of the Baixada Maranhense. Thus, of the 30 municipalities that composes the region of Baixada Maranhense (AGED, 2011), 7 were worked in this research. Were evaluated 17 cattles from the municipalities of Arari, Matinha, Olinda Nova do Maranhão, Pinheiro, São João Batista, Viana e Vitória do Mearim. Were evaluated 477 buffalos, 444 females and 33 males from different races and age varying between 1,5 to 216 months. The animals were submitted to the Comparative Cervical Test (TCC) and the blood samples to the Indirect ELISA test. For each cattle was applied an epidemiologic questionnaire, in order to determine the risk factors associated with the infection of *M. bovis*. The frequency of positive animals to TCC was 7,58% (n=36). The evaluation of allergic response showed that the average increases the thickness of the fold of buffalo's skin induced by application of avian and bovine tuberculin, showed averages ranging from 12,24 to 14,82mm and 11,99 to 13,68mm, respectively . of the 455 blood serum evaluated through the technique of indirect ELISA, it was observed that 13.41% (n= 61) of animals reagents. On the basis of the data it can be concluded that the infection with *M. bovis* is low; the maximum increase of skin thickness was 72 hours after inoculation of tuberculin; were considered risk factors for the transmission of *M. bovis*, facilities, animal density and performance of tuberculin; The study space demonstrated that infection with *M. bovis* is distributed homogeneously in the region studied.

Key – words: Buffaloes, allergic skin reaction, infectious diseases, Maranhao

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	21
2.1. Geral	21
2.2. Específicos.....	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1. Histórico da tuberculose.....	23
3.2. Histórico do teste tuberculínico	24
3.3. Situação da tuberculose no mundo.....	25
3.4. Situação da tuberculose no Brasil.....	27
3.5. Etiologia	29
3.6. Epidemiologia	30
3.7. Fatores de risco associados à infecção pelo <i>Mycobacterium bovis</i>	31
3.8. Patogenia.....	33
3.9. Imunopatogenia	34
3.10. Sinais Clínicos	35
3.11. Achados anotomapatológicos	35
3.12. Diagnóstico	36
3.12.1. Teste da Prega Caudal.....	40
3.12.2. Teste Cervical Simples.....	40
3.12.3. Teste Cervical Comparativo.....	40
3.13. Controle e Profilaxia.....	41
3.14. Importância econômica da tuberculose.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1. Área de estudo.....	46
4.2. Amostragem.....	47
4.3. Tuberculinização	48
4.4. Coleta das amostras de sangue	51
4.5. Análise das amostras.....	52

4.6. Análise univariada da associação dos fatores de risco à infecção pelo <i>M. bovis</i>	52
4.7. Planejamento estatístico	54
4.8. Estudo espacial.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICES.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição quantitativa do número de amostras avaliadas de bubalinos por Municípios e rebanhos na Baixada Maranhense - Maranhão, 2013	48
Tabela 2. Parâmetros de interpretação para obtenção dos resultados do Teste Cervical Comparativo – TCC em búfalos da Baixada Maranhense – Maranhão, 2013	49
Tabela 3. Distribuição das frequências da infecção pelo <i>M. bovis</i> em rebanhos bubalinos em Municípios da Baixada Maranhense – Maranhão, 2013	60
Tabela 4. Distribuição por faixa etária das frequências da infecção pelo <i>M. bovis</i> em rebanhos bubalinos em Municípios da Baixada Maranhense – Maranhão, 2013	62
Tabela 5. Média aritmética e desvio padrão (mm) dos aumentos da espessura da pele de bubalinos da Baixada Maranhense, 2013	64
Tabela 6. Análise univariada da associação dos fatores de risco com a infecção pelo <i>M. bovis</i> em rebanhos bubalinos na Região da Baixada Maranhense - Maranhão, 2013	67
Tabela 7. Avaliação das técnicas de ELISA Indireto e Teste Cervical Comparativo em amostras de soro de rebanhos bubalinos na Região da Baixada Maranhense, Maranhão, 2013.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem da localização geográfica da Região da Baixada Maranhense, Maranhão	47
Figura 2. Fotografia da sequencia do Teste Cervical Comparativo (TCC) em Bubalinos	50
Figura 3. Fotografia de búfalos com resultados positivos para tuberculose.....	51
Figura 4. Fotografia da coleta de sangue em búfalo através da venopunção da jugular	52
Figura 5. Fotografias das etapas da técnica de ELISA indireto	53
Figura 6. Gráfico da frequência da infecção pelo <i>M. bovis</i> em rebanhos bubalinos na Região da Baixada Maranhense – Maranhão, 2013	57
Figura 7. Fotografia de uma fêmea bubalina positiva ao Teste Cervical Comparativo apresentando sinais clínicos sugestivos de tuberculose	58
Figura 8. Valores médios da espessura da pele de bubalinos (mm) no local de aplicação da tuberculina aviária e bovina, em diferentes tempos da leitura, cervical comparativo, em municípios da Baixada Maranhense, Maranhão, 2013.....	63
Figura 9. Figura demonstrando possíveis fatores de risco associados à infecção pelo <i>M. bovis</i>	68
Figura 10. Mapa da visão espacial da tuberculinização em bubalinos na Região da Baixada Maranhense – Maranhão, 2013.....	69
Figura 11. Mapa do georreferenciamento em rebanhos bubalinos positivos e negativos ao Teste Cervical Comparativo em Municípios da Baixada Maranhense – Maranhão, 2013	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- TCC** – Teste Cervical Comparativo
TCS – Teste Cervical Simples
TPC – Teste da Prega Caudal
CFT – Caudal Fold Test
FPA – Fluorescent Polarization Assay
MAPIA – Multiantígen Print Immunoassay
RT – Rapid Test
DPP – Dual Path Platform
ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay
µm – Micrômetro
Th1 - T *helper* 1
IL12 – Interleucina 12
IFN-γ – Interferon gama
TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF-β - Fator de Necrose Tumoral beta
cm – Centímetro
ml - mililitro
PPD – Protein Purified Derivate
UI – Unidade Internacional
ΔA – Variação da Reação Aviária
ΔB – Variação da Reação Bovina
µl – Microlitros
OD – Densidade Óptica
GPS – Sistema de Posicionamento Global
mm - milímetro

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A espécie ruminante búfalo (*Bubalus bubalis*) originários da Ásia, Europa e Caribe foi introduzida no Brasil no final do século XIX na região norte do país, em áreas alagadas com temperaturas acima de 30°C e umidade relativa do ar em torno de 75 a 80%, condições estas exigidas para adaptabilidade da referida espécie. O búfalo asiático ou búfalo de água é classificado no gênero *Bubalus*, espécie *bubalis*. O *Bubalus bubalis* pertence à classe *Mammalia*, subclasse *Ungulata*, ordem *Artiodactyla*, subordem *Ruminantia*, família *Bovidae*, subfamília *Bovinae*, tribo *Bovini* (BORGUESE, 2005).

No Brasil, os búfalos chegaram entre 1870 e 1890, através da Ilha de Marajó no estado do Pará, trazidos por fugitivos procedentes da Guiana Francesa, e devido à grande capacidade de adaptação aos mais diversos climas, multiplicaram-se rapidamente (ROCHA, 2007a; ZAVA, 1987; VIEIRA, 2011).

Existem diversas raças de bubalinos no mundo, no Brasil são reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos as raças Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi e Carabao (VIEIRA, 2011).

A população mundial de búfalos supera 195.266.180 cabeças, sendo 189.792.054 milhões na Ásia (97,19%), 3.800.025 milhões na África (1,94%), 1.283.860 milhões nas Américas (0,65%), 390.031 na Europa (0,19%) e 210 Oceania (0,03%) (FAO, 2011)

Embora de forma tímida, a bubalinocultura está se desenvolvendo no país como uma alternativa rentável e saudável. Isto se deve a fácil adaptação ambiental que o búfalo apresenta. A produção e o consumo de leite de búfalo vêm crescendo em função da demanda por alimentos como queijos e manteiga. Os elevados teores de gordura e sólidos totais no leite de búfala aumentam o rendimento na fabricação dos derivados em relação ao leite de vaca. A carne desses animais também é apreciada, possuem menores índices

de gordura, colesterol, calorias e maior teor de proteína e minerais que a dos bovinos (MAPA, 2011).

O efetivo de búfalos no Brasil é de 1.278.075 cabeças, sendo 820.133 mil de cabeças na Região Norte, 134.016 na Região Sudeste, 125.692 Região Nordeste, 118.842 Região Sul e 79.392 na Região Centro-Oeste (IBGE, 2011).

Em diversas regiões do mundo, o búfalo é um importante produtor de carne e leite, na Região amazônica do Brasil notadamente no Estado do Pará, este animal é explorado com esta finalidade, onde, ao lado de criações das raças especializadas Murrah e Jafarabadi dentre outras, predominam grandes rebanhos mestiços mediterrâneos (FREITAS et al., 2001a).

No Maranhão a bubalinocultura iniciou-se na década de 30 com a aquisição de 23 búfalos oriundos da Ilha de Marajó. Os animais foram levados para a um local chamado Barro Vermelho, atualmente Município de Cajari localizado na região da Baixada Maranhense (VASCONCELOS, 2012).

O Maranhão é o estado que mais cresce em número de bubalinos por apresentar um crescimento anual superior a 10%. O Estado é detentor do maior rebanho bubalino da Região Nordeste e ocupa o terceiro lugar do rebanho nacional ficando atrás somente dos Estados do Pará e Amapá, cujos rebanhos são de 485.033 e 235.549 cabeças, respectivamente (IBGE, 2011).

Atualmente o estado do Maranhão possui um rebanho de 82.650 cabeças (IBGE, 2011). Deste quantitativo, 51.409 encontram-se na região da Baixada Maranhense (AGED, 2011).

A espécie bubalina devido à alta rusticidade representada pela excelente adaptação a pastagens grosseiras de campos e várzeas destaca-se também na produção de alimentos em áreas consideradas insatisfatórias à exploração de bovinos (FREITAS et al., 2001).

A grande maioria dos rebanhos bubalinos são trabalhados sem controle sanitário específico para a espécie e muitos dados são desviados da criação de bovinos (LOPES et al., 2006).

Informações científicas a cerca da sanidade de búfalos no país, são deficientes, uma vez que estes são considerados animais de alta rusticidade, e assim, resistentes a várias enfermidades que acometem os demais ruminantes (MOTA et al., 2002). Entretanto, os búfalos são susceptíveis a vários agentes etiológicos sejam infecciosos ou parasitários que acometem principalmente os bovinos (MOTA et al., 2002). Dentre as enfermidades que acometem bubalinos destaca-se a tuberculose.

O primeiro registro de tuberculose em bubalinos foi 1889, na Hungria. Alguns autores chegaram a crer que os búfalos eram mais sensíveis à tuberculose que os bovinos, enquanto que outros pensavam o contrário. Atualmente sabe-se que ambas as espécies, quando criadas em condições sanitárias e alimentares semelhantes, são igualmente susceptíveis ao bacilo da tuberculose (LÁU, 2006).

A tuberculose é uma enfermidade infectocontagiosa de caráter crônico, caracterizada pela formação de granulomas específicos, denominados tubérculos (OLIVEIRA et al., 2007). A doença assume um papel relevante, principalmente nos países em desenvolvimento, não só no aspecto da saúde pública, mas também por ocasionar uma queda de até 18% na produção, além da condenação de carcaças no abate e implicações no comércio nacional e internacional de animais e seus produtos (COSIVI et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2008; NEVES et al., 2011).

O *Mycobacterium bovis* é o agente causador da tuberculose, doença de evolução lenta em que os sinais clínicos somente serão evidenciados na doença avançada, e animais com lesões extensas podem apresentar-se em bom estado de saúde. A perda da condição física torna-se evidente com a progressão da doença (RADOSTITS et al., 2002; BRASIL, 2006). Alguns animais podem apresentar perda de peso, debilidade, anorexia, caquexia, sinais respiratórios, apetite seletivo e temperatura oscilante. A doença pode acarretar perdas de 10 a 25% na produção de leite e carne (SMITH, 1993; RADOSTITS et al., 2002).

A principal porta de entrada do *M. bovis* é a via respiratória, que aproximadamente em 90% dos casos, ocorre pela inalação de aerossóis contaminados com o microrganismo (BRASIL, 2006). A disseminação do bacilo ocorre frequentemente pela respiração, podendo ser eliminado por corrimento nasal, leite, fezes e urina (RUGGIERO et al., 2007).

Para o diagnóstico da tuberculose a reação tuberculínica, a bacteriologia e a histopatologia são os métodos mais utilizados (BRASIL, 2006).

O búfalo adaptou-se de forma satisfatória à região da Baixada Maranhense, pastando em campos abertos e alagados, com técnicas de manejo deficientes e/ou inadequadas a estas condições ambientais. O desconhecimento da real condição sanitária deste rebanho tornou esta pesquisa um desafio científico considerável, uma vez que os produtos oriundos desta espécie ainda são consumidos em pequena escala, face ao preconceito e a não confiabilidade da procedência e saúde destes animais. Desta forma, este trabalho é de grande relevância, uma vez que visou conhecer a condição da tuberculose nos rebanhos bubalinos da Baixada Maranhense, onde se observa um forte crescimento da bubalinocultura, sobretudo, no que diz respeito ao melhoramento genético desse rebanho.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Estudar a tuberculose em búfalos através do diagnóstico, avaliação da resposta alérgica, fatores de risco e georreferenciamento na Baixada Maranhense, Maranhão.

2.2 Específicos

- Conhecer a ocorrência da Tuberculose em búfalos da Baixada Maranhense;
- Avaliar a resposta alérgica cutânea em diferentes tempos no Teste Cervical Comparativo;
- Identificar possíveis fatores de riscos associados à tuberculose em rebanhos bubalinos da Baixada Maranhense;
- Realizar estudo espacial, por meio do georreferenciamento de casos de tuberculose na Baixada Maranhense;
- Avaliar o teste ELISA indireto no diagnóstico da tuberculose em búfalos da Baixada Maranhense.

REVISÃO LITERÁRIA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico da Tuberculose

A tuberculose é uma enfermidade tão antiga quanto a civilização, e sua natureza exata como zoonose foi debate por muitas décadas. Desde a antiguidade, a cerca de 5.000 anos A.C, há registros de lesões ósseas compatíveis com a tuberculose em múmias de faraós e sacerdotes do Egito (CORRÊA & CORRÊA, 1992; ROSEMBERG, 1999).

Somente a partir do século XX as descobertas científicas sobre a tuberculose se tornaram proeminente. Em 1810, Carmichael (apud GRANGE, 2001) associou o consumo de leite bovino com a ocorrência da escrófula, tuberculose nos linfonodos cervicais que gera uma linfadenopatia principalmente em crianças (ROXO, 1996).

Em 1868 foi publicada uma série de informações que comprovavam a transmissão em coelhos tanto da tuberculose bovina como humana. Somente em março de 1882, Robert Koch realizou uma apresentação oral à Sociedade Fisiológica de Berlim, comunicando suas descobertas sobre o bacilo da tuberculose, pouco tempo depois, publicou sobre sua etiologia em um periódico de Berlim. Diante destes achados surgiram os primeiros movimentos pela eliminação da doença nos bovinos e no homem (GRANGE, 2001).

No início do século XX, inúmeras dúvidas relacionadas à tuberculose animal e humana, bem como o potencial zoonótico da tuberculose bovina, fizeram com que o governo inglês montasse uma comissão denominada “Royal Commission on Tuberculosis” para estudar sobre o assunto a fim de desenvolver um programa de pesquisa que viesse elucidar a tuberculose bovina e sua relação com a tuberculose humana. Em 1911, concluiu-se que bovinos tuberculosos constituíam risco à saúde humana e que algumas medidas precisavam ser tomadas, uma vez que a ocorrência da enfermidade em animais era alarmante (FERREIRA NETO & BERNARDI, 2001; RUGGIERO, 2004).

A expansão da tuberculose humana no mundo tem como uma das principais causas a epidemia de AIDS, devido ao fato da coinfeção por *M. tuberculosis* e HIV causar um efeito devastador tanto na população HIV - infectada, como na população imunocompetente em geral, acelerando o curso da AIDS e a progressão da tuberculose. Devido à imunodeficiência ocasionada pelo HIV aproximadamente um terço dos pacientes com AIDS morrem de tuberculose. (RUGGIERO, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE, 2004). Alguns autores afirmam que as complicações da AIDS são devidas às micobacterioses, por razões ainda desconhecidas, sendo as espécies do complexo *M. avium* as que frequentemente causam doenças associada a esta síndrome (RAMOS et al., 2000; FREITAS et al., 2001b).

3.2 Histórico do teste tuberculínico

Em 1990, seguindo a descrição de 1882 do bacilo da tuberculose, Robert Koch anunciou um fator isolado a partir do caldo de cultura filtrado, capaz de parar o crescimento do bacilo não só em tubos de ensaio, mas no animal. Este fator ficou rapidamente conhecido como tuberculina, hoje descrita como velha tuberculina de Koch. Mais tarde, Koch mudou seu ponto de vista com relação as propriedades curativas da tuberculina , quando observou que em indivíduos infectados, a mesma provocava febre, calafrios e vômitos e que estes sinais não ocorriam em indivíduos não tuberculosos (MONAGHAN et al., 1994).

A técnica foi adaptada para utilização em bovinos quando se descobriu que os animais tuberculosos apresentavam respostas térmicas após injeções subcutâneas de 0,2–0,5 mL de tuberculina. Em 1891, o Comitê da Universidade da Pensilvânia, concluiu que após o uso da tuberculina produzida na Alemanha, vacas tuberculosas apresentavam reações febris a injeção subcutânea; vacas saudáveis não produziam reações com doses moderadas de tuberculina; que a tuberculina não apresentava efeito curativo; vacas

deixavam de reagir após repetidas doses de tuberculina e que esta apresentava um valor no diagnóstico da tuberculose bovina. Durante o VI Congresso Internacional de Veterinária realizado em Berna, foi apoiado por unanimidade a resolução de que a tuberculina é um meio de diagnóstico valioso na luta contra a tuberculose (MILLER, 1989; MONAGHAN et al., 1994).

Os primeiros relatos sobre a confiabilidade do teste sugere que uma proporção elevada de gado reagentes apresentavam lesões de tuberculose ao abate e acreditava-se que o teste detectou 90-95% dos bovinos tuberculosos (M'FADYEAN, 1899; FRANCIS, 1947).

Na última década do século XIX o teste foi bastante utilizado por Bang na Dinamarca, M'Fadyean no Reino Unido, Nocard na França e Pearson nos Estados Unidos. A utilização do teste subcutâneo em um programa no Distrito de Columbia, EUA, entre 1909 e 1918 reduziu o percentual de bovinos tuberculosos de 18,87% para 0,84%. (MILLER, 1989; MONAGHAN et al., 1994).

3.3 Situação da tuberculose no mundo

A tuberculose é uma enfermidade de distribuição mundial. A infecção de búfalos por *M. bovis* já foi relatada na África (África do Sul, Uganda e Tanzânia), Ásia (Tailândia, Índia e Paquistão), Austrália e Brasil. Os búfalos são considerados reservatórios para *M. bovis* do Sul África podendo transmitir o patógeno a outros animais (MICHEL et al., 2006; TADAYON et al., 2006). Na África do Sul a prevalência de tuberculose em búfalo pode chegar a até 92% (DE VOS et al., 2001; TADAYON et al., 2006).

Vanamayya et al., (1987), avaliando os testes de tuberculina e de Johnin em búfalos, observaram 15 animais reatores dos 32 avaliados. Pesquisa sobre zoonoses foram realizadas em búfalos no Egito, e observaram que a taxa de incidência de tuberculose é de 2,82%, sendo o maior percentual em animais mais velho (4,96%) e menor, em animais jovens (1,29%) (MANSOUR, 1994).

No nordeste da Tailândia três tipos de testes tuberculínicos foram utilizados para avaliar 73 búfalos tuberculosos e 12 não tuberculosos. Dos 73 búfalos, 30 (41%) foram detectados pelo teste da prega caudal, 46 (63%) pelo teste cervical simples e 56 (77%) através do teste Stormont. Dos 12 não tuberculosos 5 (42%), 4 (34%), e 10 (83%) foram reagentes aos três testes anteriormente mencionados, respectivamente (KANAMEDA et al., 1999).

Timothy et al., (2001), através de necropsias e exames histopatológicos estudaram a prevalência da tuberculose em búfalos africanos entre 1991 e 1992, observaram que aproximadamente 10% (207/2.071) dos animais, e 43% dos rebanhos (26/60), eram positivos. A prevalência dentro rebanhos variou de 55,6%, na zona sul, para níveis não detectáveis na zona norte. Em 1998, 18,6% (115/616) dos animais e 63,3% (10/30) dos rebanhos amostrados apresentaram lesões consistentes com infecção de tuberculose.

Guanziroli et al., (2008), ao avaliarem 402 búfalos da raça murrâh oriundos do nordeste argentino, detectaram 0,99% (n=4) de animais positivos e 1,49% (n=6) suspeitos através do teste da prega caudal, os 10 animais positivos e suspeitos quando submetidos ao teste cervical comparativo, 50% (n=5) reagiram positivamente.

Michel & Simões (2009), comparando dois testes rápidos para a detecção de *M. bovis* em búfalos africanos, utilizaram dois kits comerciais de ensaio imunocromatográfico e observaram um percentual de 17% (17/100) de animais infectados nos dois testes, sendo 16% (16/100), teste A e 6% (6/100) no teste B.

Javed et al., (2010), avaliando a tuberculose em búfalos e rebanhos bubalinos de duas cidades em Punjab (Paquistão), através do teste cervical comparativo, detectaram prevalências de 14% e 2,6%, respectivamente. Estudo realizado em 2010 na África do Sul, Garine-Wichatitsky observou uma prevalência de 10,5% de animais positivos ao ensaio de interferon-gamma.

No Canadá, 212 bisões machos e fêmeas foram submetidos ao teste da prega caudal e testes sorológicos para detecção da infecção por *Mycobacterium bovis*. Os pesquisadores detectaram uma prevalência de

tuberculose de 47,2% (Caudal Fold Test - CFT), 6,1% (Fluorescent Polarization Assay - FPA), 7,1% (Multiantigen Print Immunoassay - MAPIA), 12,3% (Rapid Test 30 – RT 30), 11,3% (Rapid Test 20 – RT 20), 7,1% (Rapid Test 20 ST – RT 20 ST) e 6,1% (Dual Path Platform - DPP) (CHAPINAL et al., 2012).

3.4 Situação da tuberculose no Brasil

No Brasil, a tuberculose em búfalos tem sido observada no criatório (MORAES, 1990; PORTUGAL et al., 1971) e abate (FREITAS et al., 1997), no entanto apesar de um certo grau de conhecimento da enfermidade nesta espécie, dados de prevalência ainda são escassos (FREITAS et al., 2001).

Melo et al., (1965) e Portugal et al., (1971), avaliando animais no Estado de São Paulo, observaram frequências de 15,2% e 6,04%, respectivamente, de animais reagentes à tuberculinização. Em 1990, Láu estudando tuberculose em búfalos na região amazônica do Brasil, relatou 8% de taxas de infecção.

Estudo realizado no estado do Pará Freitas et al., (2001), buscando a prevalência da tuberculose em búfalos abatidos para consumo em estabelecimentos da região metropolitana de Belém, observaram uma prevalência geral de 7,7% e de 4,2% e 3,5% entre animais machos e fêmeas, respectivamente. Também no estado do Pará, Ribeiro (2003) avaliando 1.063 bubalinos pertencentes a 10 propriedades localizadas nos Municípios de Castanhal, Ipixuna, Nova Timboteua, Oriximiná e Ilha do Marajó, detectou que 37,32% e 8,11% de animais positivos à tuberculinização simples e comparada, respectivamente.

Mota (2002), estudando a ocorrência de tuberculose em 1303 búfalos no município de Parintins – AM detectou frequência de 20,4% de animais positivos ao teste cervical comparativo.

Enquanto Freitas et al., (2006), realizando um levantamento da ocorrência da Tuberculose em rebanhos leiteiros no estado do Pará através do TCC, onde, das 29 unidades produtoras, a tuberculose foi diagnosticada em

apenas uma propriedade no Município de Santarém, revelando uma prevalência de 0,21%.

Leite et al., (2006), comparando duas técnicas de tuberculinização em 122 búfalos do Rio Grande do Norte, detectaram 17% (21) de animais positivos à tuberculinização simples, estes ao serem submetidos ao teste cervical comparativo somente 2,5% (3) reagiram positivamente.

No Estado do Maranhão, Pereira et al., (2009) avaliando 155 búfalos oriundos do Município de Arari, observaram uma frequência de 13,54% de animais positivos por meio da prova alérgica de tuberculinização comparada. Ribeiro et al., (2011), pesquisando tuberculose em búfalos da Regional de Viana, relataram que dos 210 animais submetidos ao teste de ELISA 13,3% (28) foram soropositivos.

Ribeiro (2003), realizando estudos a fim de determinar parâmetros para uso da tuberculinização intradérmica em búfalos, avaliaram a evolução da reação 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação, e observaram que às 77,3 horas foi o tempo em que ocorreu o máximo de aumento da espessura da dobra da pele. Em 1998, Roxo e colaboradores avaliando a reação do teste em búfalos e bovinos, observaram que o aumento máximo da espessura da pele ocorreu às 72 horas e que as reações em búfalos foi 1,69 vezes maior que nos bovinos.

Já Silva et al., (2006), avaliaram a resposta alérgica cutânea em diferentes tempos de mensuração em caprinos (12, 24, 48 e 72 após inoculação), visando o estabelecimento dos parâmetros de interpretação através do teste intradérmico, e observaram maior intensidade da reação às 48 horas. Estudo semelhante, foi realizado por Cyrillo et al., (2007), buscando avaliar a resposta alérgica cutânea à tuberculina em ovinos, e também detectaram que a espessura da pele foi maior 48 horas após a inoculação.

3.5 Etiologia

A tuberculose é uma enfermidade causada por bastonetes curtos imóveis, aeróbios, não capsulados, não esporulados, não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, medindo 0,3 µm de largura por 0,5 a 7,0 µm de comprimento, sendo a álcool-ácido-resistência sua principal característica. Entretanto, algumas destas características, inclusive coloração superpõem-se nos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* (BRASIL, 2006; RUGGIERO et al., 2007; MARQUES et al., 2008). O bovino, o homem e aves em geral são as três espécies que contribuíram para a perpetuação da tuberculose (BRASIL, 2006).

As micobactérias apresentam mais de 100 espécies descritas e são classificadas taxonomicamente como pertencente à ordem *Actinomycetales*, família *Micobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium* (MATTHIAS, 1988; RUGGIERO et al., 2007) .

Até 1970 o bacilo tuberculoso bovino foi considerado uma variante do *Mycobacterium tuberculosis* e denominado *M. tuberculosis* variante *bovis* ou *M. tuberculosis* subespécie *bovis*. Karlson & Lessel em 1970 propuseram sua classificação como espécie individual denominada *Mycobacterium bovis* (BRASIL, 2009).

No Brasil Torres e Pacheco em 1938, isolaram o *M. bovis* em lesões humanas, tratando-se da primeira publicação na literatura médica nacional (SOUZA et al., 1999).

As principais espécies de importância epidemiológica para o homem pertencem ao complexo *M. tuberculosis*, que compreende: o *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* (patogênico apenas para a ratazana – *Microtis agrestis*), *Mycobacterium africanum* (ainda não isolado no Brasil) e o *Mycobacterium canettii*, não patogênico para o homem (ABRAHÃO, 1998; DUCATI et al., 2004; BROSCH et al., 2002; CORNER, 1994; RUGGIERO et al., 2007).

Além das micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, existem aquelas pertencentes ao complexo MAIS (*M. avium*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*). No homem, essas micobactérias só tem importância para indivíduos com imunodeficiência. Entretanto, para bovinos e bubalinos provocam reações inespecíficas à tuberculinização dificultando o diagnóstico da tuberculose nestas espécies, por esta razão, também são denominadas “atípicas”, “anônimas”, “não tuberculosas”, “oportunistas”, “ambientais” dentre outras (RUGGIERO, 2004; BRASIL, 2006).

3.6 Epidemiologia

O bovino, o homem e as aves foram as espécies hospedeiras que contribuíram para a perpetuação da tuberculose durante séculos, através da manutenção do *Mycobacterium* na natureza. O *M. bovis*, apresenta um alto grau de virulência tanto para os animais quanto para o homem, diferentemente do agente causador da tuberculose humana, *M. tuberculosis*, sendo mais virulento para o homem que aos bovinos. O *M. tuberculosis*, não causa doença progressiva nos bovinos e bubalinos, porém, ocasionalmente poderá sensibilizá-los ao teste tuberculínico (BRASIL, 2006). A infecção de bovinos por *M. avium* não é frequente, mas podem ocorrer lesões a nível de linfonodos, que raramente generalizam, no entanto da mesma forma que as demais micobactérias do complexo MAIS, podem provocar sensibilizações alérgicas inespecíficas, interferindo no teste de tuberculínico (O'REILLY & DABORN, 1995; MODA et al., 1996; LAGE et al., 1998; SALAZAR, 2005).

O *M. bovis* é um patógeno ubiqüitário e apresenta um amplo leque de hospedeiros tornando seu modelo de transmissão o mais complexo dentre os microrganismos patogênicos. Diversas espécies são susceptíveis a este bacilo, entretanto poucas atuam como hospedeiros mantenedores da infecção, tranferindo-a efetivamente para outras espécies, a exemplo dos bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus*, em todo o mundo, búfalos *Bubalus bubalis* especialmente na Austrália e *Syncerus caffer* na África equatorial, o bisão *Bison bison* na

América do Norte, e os cervos *Odocoileus virginianus* e *Cervos elaphus* na Nova Zelândia e América do Norte (MORRIS et al., 1994; WATERS et al., 2003; SALAZAR, 2005).

A tuberculose é uma enfermidade primordialmente respiratória, em que a transmissão entre as espécies ocorre basicamente via aerógena (MORRIS et al., 1994; O'REILLY & DABORN, 1995; RUGGIERO et al., 2007).

Diversos fatores como idade, ambiente e práticas de higiene influenciam nas rotas de infecção do gado. A transmissão via digestiva pode ocorrer em animais jovens através da ingestão de leite e colostro contaminados. A maior possibilidade de transmissão se dá pela via aerógena devido a própria conduta natural do rebanho, especialmente em fazendas com alta densidade de rebanho, estabulação e através da venda ou troca de animais (NEILL et al., 1994, RUGGIERO et al., 2007).

Bovinos e bubalinos constituem a principal fonte de infecção para os rebanhos, sendo a principal forma de introdução da tuberculose a aquisição de animais infectados (BRASIL, 2006).

3.7 Fatores de risco associados à infecção pelo *Mycobacterium bovis*

A rota normal da infecção se dá pela inalação de gotículas infectadas que são expelidas dos pulmões pela tosse. Bezerros e seres humanos também podem infectar-se pela ingestão de leite cru de vacas infectadas, uma vez que o curso da doença é lento, levando meses ou anos para matar um animal podendo transmitir a doença para outros rebanhos antes da manifestação dos sinais clínicos. Portanto, animais domésticos e selvagens infectados são as principais formas de propagação da doença (OIE, 2011).

Os rebanhos leiteiros em particular estão sob maior risco, uma vez que os métodos de criação permitem contato direto entre animais, tanto no momento da ordenha, como nos meses de estabulamento durante o inverno. Reservatórios silvestres de *M. bovis* são as principais vias de infecção para bovinos de pasto em alguns países (BEER, 1988; CORRÊA & CORRÊA, 1992;

RADOSTITS et al., 2002). Pastos e alimentos contaminados constituem menor importância na transmissão da doença. O animal infectado, o bovino é capaz de transmitir a doença, mesmo antes do desenvolvimento das lesões nos tecidos. O bacilo pode ser eliminado pela respiração, leite, fezes, corrimento nasal, urina, secreções vaginais e uterinas e pelo sêmen. A transmissão transplacentária é considerada rara ou inexistente em bovinos, e a intra-uterina e pelo coito menos comuns (CORRÊA & CORRÊA, 1992; NEILL et al.,1994; ROXO, 1995; RADOSTITS et al., 2002).

O *M. bovis* não é a principal causa de tuberculose humana, a qual tem como agente etiológico o *M. tuberculosis*, entretanto seres humanos são suscetíveis à tuberculose bovina. O homem pode ser infectado tanto pela ingestão de leite cru de animais infectados, quanto pela inalação de gotículas infectantes. É estimado em alguns países que até 10% de tuberculose humana é devido a tuberculose bovina (OIE, 2011).

Os principais fatores que favorecem a transmissão da tuberculose nos rebanhos são: contato aproximado entre animais, principalmente leiteiro, criados em sistema de confinamento ou de forma semi-intensiva; presença de um animal infectado, fonte permanente de disseminação do *M. bovis* no ambiente e condições ambientais favoráveis à resistência do agente (BRASIL, 2003; OLIVEIRA et al.,2007), além do tamanho do rebanho (PROAÑO-PEREZ et al., 2006), aptidão do rebanho; densidade animal; produtividade; sistema de aleitamento e período (OLIVEIRA et al., 2008); vacas em lactação; animais em contato com outras espécies como carnívoros, pequenos ruminantes, suínos e animais selvagens; animais mais velhos; introdução de animais oriundos de outros rebanhos também constiuem fatores associados à ocorrência de tuberculose (PROAÑO-PEREZ et al., 2009). Outros autores consideram manejo, idade, raça (PEREZ et al.,2002), sistema de produção, grupo genético, sistema de ordenha, resfriamento do leite e monitoramento da produção como fatores de risco para tuberculose (BELCHIOR, 2001).

3.8 Patogenia

Pouco se conhece das características e processo infeccioso desta enfermidade e outras micobacterioses no búfalo, bem como a extensão do processo infeccioso, localização das lesões, via de infecção e outros agentes micobacterianos (FREITAS et al., 2001).

A infecção pelo *M. bovis* em bovinos e bubalinos aproximadamente em 90% dos casos ocorrem pela via respiratória, por meio na inalação de aerossóis contaminados com o microrganismo (BRASIL, 2006). Em animais jovens a infecção pela via digestiva também pode ocorrer, devido a ingestão de leite e colostro contaminados (NEILL et al., 1994). Considerando a transmissão via respiratória, o bacilo ao atingir o alvéolo pulmonar é capturado por macrófagos e seu destino determinado pelos seguintes fatores: virulência do microrganismo, carga infectante e resistência do hospedeiro (BRASIL 2006; MARQUES et al., 2008).

Quando a infecção se dá via respiratória através da inalação de aerossóis, o pulmão é o primeiro órgão a ser acometido. Após atingir o alvéolo pulmonar, o bacilo é fagocitado por macrófagos e seu desenvolvimento ou não no hospedeiro depende da infectividade do microrganismo, da carga infectante e da resistência oferecida pelo organismo invadido. Se não forem eliminados os bacilos se multiplicam no interior dos macrófagos até destruí-los. Esses bacilos que saem dos macrófagos rompidos são fagocitados por outros macrófagos alveolares ou por monócitos vindos da corrente circulatória. Por volta de duas a três semanas após a inalação do agente infeccioso cessa a multiplicação do mesmo, onde ocorre resposta imune celular e uma reação de hipersensibilidade tardia, ocorrendo necrose de caseificação para conter o crescimento intracelular das micobactérias. Esse processo envolve a mediação por linfócitos T, com migração de novas células de defesa ao local da infecção, que levarão à formação dos granulomas da tuberculose. Essas lesões são constituídas por uma parte central, às vezes com área de necrose de caseificação, envolvida por células epitelióides, células gigantes, linfócitos,

macrófagos e uma camada de fibroblastos na superfície. Os bacilos da lesão da tuberculose no parênquima pulmonar propagam-se para os linfonodos regionais, nos quais desencadeiam a formação de novo granuloma e assim formam o complexo primário (SMITH, 1993; 2002; RADOSTITS et al., 2002; BRASIL, 2006)

A infecção generalizada pode assumir a forma miliar abrupta e maciça, com um grande número de bacilos na circulação; a forma mais comum que é protraída que se dá por via sanguínea ou linfática que acomete pulmão, linfonodos, fígado, baço, ossos, úbere, rins, sistema nervoso central, disseminando-se por todos os tecidos (BRASIL, 2006). Nos bubalinos, a tuberculose crônica é a mais frequente (GUINDI et al., 1975; ADAWY, 1985), sendo os gânglios retrofaríngeos e mediastínicos os mais atingidos (SMALL & THOMSON, 1986; LÁU, 2006).

3.9 Imunopatogenia

Na resposta imune mediada por células, macrófagos e células dendríticas ou células de Langerhans fagocitam e processam o *M. bovis* e apresentam os antígenos para os linfócitos modulados em T helper 1 (Th1), que expressam co-receptores CD4 + e liberam quimiocinas tipo Interleucina 12 (IL12), IFN- γ e Fator de Necrose Tumoral- α e β (TNF- α e TNF- β), que estimulam o recrutamento de outros macrófagos, linfócitos e fibroblastos. Este processo ocorre entre duas e dez semanas após o contato com o agente, sendo a resposta mais eficiente contra o bacilo. Constata-se, no sangue periférico de bovídeos tuberculosos, a quimiocina IFN- γ de perfil que pode ser detectada no ensaio diagnóstico (NEILL et al., 2001; POLLOCK et al., 2001; SALAZAR, 2005; MURAKAMI et al., 2009).

3.10 Sinais clínicos

Somente na doença avançada os sinais clínicos são evidenciados. Porém, animais com lesões extensas podem apresentar-se aparentemente saudáveis. A perda da condição física torna-se evidente com a progressão da doença (RADOSTITS et al., 2002; BRASIL, 2006).

Animais afetados geralmente são assintomáticos, mas podem apresentar sinais clínicos característicos como: emagrecimento progressivo, tosse, dispnéia, aumento de linfonodos, redução na produção (OLIVEIRA et al., 2007), debilidade, febre, anorexia, corrimento nasal seroso ou purulento, aumento de linfonodos periféricos, principalmente os da cabeça e pré-escapulares (RIET-CORREA, et al, 2007, OIE, 2013a). A doença pode acarretar perdas de 10 a 25% na produção de leite e carne (SMITH, 1993; RADOSTITS et al., 2002; RIET-CORREA, et al, 2007; LIEVORE, 2008). Animais tuberculosos, quando submetidos à marcha forçada, tendem a posicionar-se atrás dos demais, demonstrando cansaço e baixa capacidade respiratória (BRASIL, 2006).

A ausência dos sinais clínicos na fase inicial da doença e sendo a tuberculose uma zoonose de risco ocupacional, constitui risco de infecção para aqueles que trabalham com animais, tais como: veterinários, produtores de leite, trabalhadores rurais, funcionários de frigoríficos entre outros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993; O'REILLY & DABORN, 1995; SENASA, 2000; GUANZIROLI et al., 2008).

3.11 Achados anatomopatológicos

As lesões provocadas pelo *M. bovis*, não são patognomônicas da tuberculose. Nos bovinos apresentam coloração amarelada e ligeiramente esbranquiçada nos búfalos. Os nódulos medem aproximadamente 1 a 3 cm de diâmetro apresentando um aspecto purulento ou caseoso, com presença de cápsula fibrosa, podendo apresentar necrose de caseificação no centro da

lesão, ou ainda calcificação nos casos mais avançados. Em 70% a 90% dos casos, as lesões encontram-se em linfonodos da cabeça e tórax, e 66% dos animais necropsiados apresentam apenas uma única lesão visível. Em 95% dos casos, as lesões estão localizadas em linfonodos (mediastínicos, retrofaríngeos, bronquiais, parotídeos, cervicais, inguinais superficiais e mesentéricos), pulmão e fígado (NEILL et al., 1994; LOPES et al., 2006; BRASIL, 2006). Com menor frequência, podem estar presentes em intestino e tecido mamário, ou em qualquer outro órgão ou tecido do animal (BRASIL, 2006).

3.12 Diagnóstico

O diagnóstico da tuberculose pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Os diretos envolvem a detecção e identificação do agente etiológico no material biológico. Os indiretos pesquisam uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral ou celular (BRASIL, 2006).

O diagnóstico clínico, associado à tuberculinização, possibilita a identificação de animais com tuberculose avançada, os quais geralmente apresentam um decréscimo da sensibilização alérgica, podendo, por vezes, chegar à anergia (MONAGHAN et al., 1994; BRASIL, 2006; GUANZIROLI et al., 2008). Pode-se afirmar que existem métodos diagnósticos adequados para o desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina. No entanto, não existe um método diagnóstico da tuberculose bovina que tenha uma eficácia absoluta. A reação tuberculínica, a bacteriologia e a histopatologia são os métodos mais utilizados para o diagnóstico da tuberculose bovina e bubalina (BRASIL, 2006).

Em consequência ao tipo de criação, os bubalinos estão mais expostos a micobactérias atípicas, podendo contribuir para um grande número de reações falso-positivas em decorrência de reações cruzadas ao PPD bovino (EID et al., 2001; LOPES et al., 2006). De acordo com Freitas et al. (2001), o

impacto provocado pelas micobactérias atípicas no diagnóstico da tuberculose em bubalinos ainda não foi bem definido.

Roxo et al., (1998), realizaram estudos a fim de estabelecer parâmetros específicos para o diagnóstico da tuberculose em búfalos pela técnica de tuberculinização. Alguns autores revelam que os bubalinos desenvolvem maiores reações à tuberculinização que os bovinos, e sugerem que a técnica de tuberculinização (RIBEIRO, 2003) e os parâmetros para leitura sejam os mesmos usados para bovinos (LÁU, 1994; GUANZIROLI et al., 2008). Já outros pesquisadores, afirmam que a interpretação do teste não deve ser a mesma usada para bovinos, uma vez que as reações em bubalinos são mais acentuadas e perduram por mais tempo. Sendo assim, aconselha o uso da chave de interpretação recomendada por Brasil (2004), considerando positivas reações que se apresentar quente, dolorosa, com exsudato ou necrosada (AWAD & MAHAMOUD, 1957; SHUKLA & SINGH, 1972).

Radostits et al., (2002), afirmam que o teste imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para os antígenos micobacterianos imaturos apresenta valor limitado, mas um teste de ELISA que pesquise anticorpos, para definir o antígeno do *M. bovis* antes e após o teste cutâneo, parece ser útil para detectar os reagentes não específicos.

Empregando PPD bovino como antígeno de captura de ELISA, Ritacco et al., (1987) relataram uma sensibilidade de 90% e especificidade de 89,8% para o diagnóstico de tuberculose. Além disso, em outros estudos utilizando o mesmo teste, Casillas et al., (1995) relataram 76,5% de sensibilidade no México, enquanto Lilenbaum et al., (1999) relataram uma sensibilidade de 86,7% e especificidade de 90,6% em rebanhos leiteiros no Rio de Janeiro.

Embora ensaios sorológicos não possam ser considerados em primeiro lugar escolha de métodos diagnósticos para tuberculose, muitos pesquisadores descrevem estratégias para o seu uso (SILVA, 2001; LILENBAUM & FONSECA, 2006; DE LA RUA DOMENECH et al., 2006). Suas recomendações são com base na existência de animais anérgicos (SILVA,

2001; MEDEIROS et al., 2010; AAGAARD et al., 2006), bem como aumento de títulos de anticorpos em estágios mais avançados da doença (POLLOCK & NEILL, 2002; WELSH et al., 2005). Pelo ELISA, Lilenbaum e Fonseca (2006) identificaram vacas tuberculosas em 18 rebanhos envolvidos em um programa de controle da tuberculose, e posteriormente confirmada a infecção pelo isolamento de *M. bovis* em lesões pulmonares. Nestes casos, o teste ELISA foi utilizado como diagnóstico complementar, identificando vacas anérgicas.

Segundo a organização Mundial de Saúde (OIE, 2011b), o diagnóstico da tuberculose através de exames de sangue já estão disponíveis, a exemplo do Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de interferon gama e o ELISA indireto que detecta as respostas de anticorpos. A execução logística e laboratorial de alguns desses testes pode ser um fator limitante. O uso de sangue baseados em ensaios podem ser vantajosas, especialmente com animais de jardim zoológico e selvagens, embora interpretação do teste possa ser dificultada pela ausência de dados para algumas espécies. (OIE, 2011b).

O ensaio de ELISA para diagnóstico da tuberculose pode ser utilizado como um exame complementar aos ensaios baseados na imunidade celular, e se mostra útil para identificar a infecção em animais anérgicos. Porém, mesmo sendo um método simples, rápido e de fácil execução, tanto a sua especificidade como a sua sensibilidade precisariam ainda ser aperfeiçoadas, embora alguns países o utilizem em seus programas de controle associado ao teste de tuberculina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994; RUGGIERO et al., 2007). Carlos et al (2013) afirmam que há ainda uma falta de conhecimento no que se refere a resposta imune de búfalos a infecção pelo *M. bovis*, sendo necessário estudos mais abrangentes com base em testes sorológicos para melhorar a identificação de animais imunologicamente anérgicos desta espécie.

De acordo com Lilenbaum (2000), o método de diagnóstico mais confiável para doenças determinadas por microrganismos, sem dúvida é o isolamento e identificação do agente etiológico, a partir de lesões oriundas de

animais enfermos. Riet- Correa (2007), afirma que o diagnóstico bacteriológico, mediante isolamento e tipificação da bactéria, é necessário para a vigilância epidemiológica da enfermidade. Enquanto o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2006) recomenda que isolamento de qualquer bactéria do gênero *Mycobacterium sp*, a semeadura seja realizada nos meios de cultura Lowenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie, uma vez que o diagnóstico bacteriológico por isolamento requer um longo período de incubação (30 a 90 dias), pois o *M. bovis* cresce lentamente em meios de cultura artificiais.

O diagnóstico alérgico cutâneo com tuberculina é o teste básico para programas de controle e erradicação da tuberculose bovina em todo o mundo. O diagnóstico pode revelar infecções a partir de três a oito semanas após a exposição ao agente, apresentando boa sensibilidade e especificidade e é considerado como técnica de referência pela OIE (BRASIL, 2006; FIGUEIREDO et al., 2010).

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), com o objetivo de reduzir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde animal e humana, bem como promover a competitividade na pecuária nacional (BRASIL, 2006).

O teste de tuberculinização vem sendo utilizado no diagnóstico da tuberculose bovina a mais de cem anos (MONAGHAN et al., 1994), como nos bovinos o teste tem sido usado rotineiramente em bubalinos (PORTUGAL et al., 1971), utilizando os mesmos critérios de interpretação (BRASIL, 2006).

Segundo a Instrução Normativa Nº 06, de 08 de janeiro de 2004, do Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (LÁU, 2006), no Brasil, três tipos de testes são reconhecidos como oficiais para o diagnóstico de tuberculose: Teste Cervical Simples (TCS), o Teste da Prega Caudal (TPC) e o Teste Cervical Comparativo (TCC) (BRASIL, 2006). Os animais positivos ao teste tuberculínico devem ser marcados com

ferro candente com a letra “P” no lado direito da face e destinados ao abate sanitário (BRASIL, 2001).

3.12.1 Teste da Prega Caudal – TPC

A execução teste, consiste na inoculação via intradérmica de PPD (Protein Purified Derivate) bovina, na dosagem de 0,1 ml, 6 cm a 10 cm da base da cauda, na junção da pele pilosa e glabra. A leitura deve ser feita 72 ± 6 horas após a inoculação e consiste na comparação da prega inoculada com a do lado oposto, por meio visual e palpação. O TPC deve ser utilizado, rotineiramente, em sistemas de produção de gado de corte (BRASIL, 2006; LÁU, 2006).

3.12.2 Teste Cervical Simples – TCS

A realização do TCS consiste na inoculação, via intradérmica de 0,1 ml de tuberculina PPD bovina (LÁU, 2006), na região cervical, no terço médio, a uma distância igual das bordas superior e inferior do pescoço, ou escapular, na região da espinha da escápula a 20 cm da cernelha. A região deve ser demarcada por tricotomia, evitando-se locais com lesões ou nódulos de parasitos. A espessura da dobra da pele deve ser mensurada com o auxílio de um cutímetro antes da inoculação, e as medidas serão anotadas no formulário para o exame de tuberculose. A leitura é realizada 72 ± 6 horas após a inoculação e, a interpretação do resultado baseia-se nas características da reação, podendo ser negativa, inconclusiva ou positiva (BRASIL, 2006). O Teste Cervical Simples é recomendado como teste de rotina, em sistemas de produção de gado de leite, cujo objetivo é rastrear a doença (LÁU, 2006).

3.12.3 Teste Cervical Comparativo – TCC

O TCC consiste na inoculação intradérmica de 0,1 ml de PPD aviário (cranialmente) e 0,1 ml de PPD bovino (caudalmente). Antes da inoculação, os

locais são demarcados por tricotomia e com o auxílio de um cutímetro, realizam-se as medidas da espessura da pele. E então se procede com a inoculação em que ambas as tuberculinas são inoculadas no terço médio do pescoço com uma distância de 15 a 20 cm uma da outra. Na leitura considera-se a diferença da subtração do resultado da segunda medida (72 ± 6 horas após a inoculação), com o resultado da primeira medida (antes da inoculação) (LÁU, 2006; BRASIL, 2006). Este é o teste confirmatório e deve ser utilizado em animais reagentes aos TCS e TPC, além de ser recomendado como teste de rotina rebanhos com ocorrência de reações inespecíficas, para estabelecimentos certificados como livres e rebanhos bubalinos (BRASIL, 2006).

3.13 Controle e Profilaxia

O controle e erradicação da tuberculose baseiam-se, principalmente, na realização periódica de testes tuberculínicos e abate dos animais que reagirem positivamente (RIET-CORREA et al., 2007). Sendo assim, ao adquirir animais, deve-se submetê-los ao teste antes de introduzi-los no rebanho (BRASIL, 2006). Em criações de gado de corte, pode-se identificar a infecção através do estudo das lesões observadas durante o abate (CORRÊA; CORRÊA, 1992; RIET-CORREA et al., 2001; CASTRO et al. 2009). De acordo com Brasil (2006), as instalações devem apresentar boa ventilação, incidência direta da luz solar e submetidas a higienização e desinfecção periódicas.

Baseando-se no uso do teste tuberculínico e no sacrifício de animais positivos, conforme estabelecido por normas internacionais, diversos países, especialmente nas Américas, instituíram programas de controle e erradicação da tuberculose bovina. Alguns países adotaram além da capacitação e credenciamento de médicos veterinários para o diagnóstico da tuberculose bovina, a certificação de "rebanhos livres" e "áreas livres", a fim de estimular as medidas de controle e erradicação da doença. Um dos benefícios dos programas de erradicação da tuberculose bovina é reduzir as perdas

econômicas e os entraves para o comércio exterior de animais e seus produtos, além da prevenção da doença na população humana (ROXO, 1996)

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT foi instituído em 2001, visando reduzir a prevalência e a incidência da doença, criar um número relevante de propriedades certificadas e monitoradas, a fim de fornecer ao consumidor produtos de qualidade. De acordo com Brasil (2006) o procedimento de certificação, o programa segue os princípios técnicos recomendados pela OIE. Nas propriedades que entram no processo de certificação, os animais são submetidos ao teste de tuberculinização, buscando conhecer as condições sanitárias dos rebanhos e os animais positivos que devem ser sacrificados. Para tanto, todo o rebanho será testado até a obtenção de três testes negativos durante um período de nove meses e para a manutenção do certificado, as normas sanitárias estabelecidas devem ser cumpridas com a obrigatoriedade de repetir os testes anualmente (BRASIL, 2006).

Devido a uma dificuldade na aplicação de normas técnicas para propriedades livres com sistema de criação extensivo e grande número de animais, criou-se a certificação de propriedades monitoradas, cuja adesão é voluntária. Para o certificado de monitoramento, os testes são realizados por amostragem e caso haja animais positivos, aqueles não incluídos na amostragem deverão ser submetidos ao teste e os positivos eliminados do rebanho, para então receber o certificado. Nas propriedades monitoradas, somente fêmeas com idade superior 24 meses e machos reprodutores são testados a cada dois anos (BRASIL, 2006).

3.14 Importância Econômica da tuberculose

Pouco se conhece da tuberculose em búfalos e o procedimento necessário para um diagnóstico correto nesta espécie. Isto tem sido causa de erros significativos, com sérios prejuízos ao setor produtivo e à economia nacional. O mais significativo deles é o abate de animais de alta linhagem

zootécnica, erroneamente, tidos como doentes. A porcentagem de erros, em testes mal elaborados, no diagnóstico da tuberculose é de 25 a 38%. Somam-se a isso, os riscos para a saúde pública decorrente da presença de animais, sem diagnóstico de eficácia comprovada (LÁU, 2006).

Da mesma forma que nos bovinos, a ocorrência da tuberculose em búfalos tem sido relatada em diversos países, ocasionando perdas econômicas com redução da eficiência reprodutiva, condenação de carcaças (PORTUGAL et al., 1971; MANDAL & SINGH, 1975; VACCARO et al., 1982; VANAMAYYA, 1987; HAAGSMA, 1995; ROXO et al., 1998), queda na produção de leite, perda de peso, restrição à importação (LILENBAUM et al., 1998; PEREZ et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008), descarte precoce, morte de animais (MOTA et al., 1992; LOPES et al., 2006), aumento do intervalo entre partos, produção de crias debilitadas, altas taxas de reposição no rebanho, eliminação de animais de alto valor zootécnico, perda de credibilidade e valor comercial da unidade de criação (BRASIL, 2001; ABRAHÃO et al., 2005).

No México, as perdas econômicas devido à presença da tuberculose chegam a 450 milhões de dólares, como consequência de uma limitada exportação de gado para os Estados Unidos da América (DOF, 1996; ENRÍQUEZ-CRUZ et al., 2010).

Em um rebanho argentino, vacas tuberculosas apresentaram uma queda de 18% na produção de leite, devido ao atraso na primeira lactação e redução do número e duração das lactações quando comparadas a animais sadios (KANTOR & RITACCO, 1994).

No gado leiteiro, a doença ocasiona uma perda de peso de 36%, diminuição da produção de leite em 13%, e 12% na taxa de reprodução, além de um impacto adicional devido a custos de diagnóstico e tratamento de gado e seres humanos e descarte correto de carcaças de animais infectados (PROAÑO-PEREZ et al., 2009). Oliveira et al. (2007), afirmam que a manifestação da tuberculose determina uma redução de 10 a 20% na produção de leite e ganho de peso, infertilidade e condenação de carcaça.

A tuberculose é considerada um dos principais entraves à criação, apresentando grande importância para os rebanhos leiteiros, tanto pelo caráter zoonótico como pelo consumo do leite cru e ainda, pelos impactos negativos sobre a produção animal (BERR, 1998)

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A Baixada Maranhense está localizada a leste da Ilha de São Luís, no norte do Estado do Maranhão (1°59' - 4°00' S e 44°22' - 45°33'w), limitando-se ao Norte com o litoral e o Oceano Atlântico, ao Sul com a região dos cocais, a Leste com a região pré-Amazônica e a Oeste, com o cerrado. É descrita como uma região de origem geológica recente mal drenada e sujeita a inundações periódicas, sofrendo em vários pontos influência de água salgada. Constitui um ecossistema complexo com rios, lagos, estuários e áreas alagáveis, sendo o homem parte importante no manejo, utilização e conservação de muitos de seus componentes (SERRA,2004).

De acordo com a regionalização da AGED (2011), a região da Baixada Maranhense é constituída por 30 municípios, sendo 17 na regional de Pinheiro (Turiânia, Bequimão, Cururupu, Pedro do Rosário, Porto Rico, Serrano do Maranhão, Apicum-Açu, Bacuri, Cedral, Central do Maranhão, Guimarães, Mirinzal, Pinheiro, Peri-Mirim, Presidente Sarney, Santa Helena e Turiaçu) e 13 na regional de Viana (Arari, Bacurituba, Cajari, Cajapió, Matinha, Olinda Nova do Maranhão, Palmeirândia, Penalva, São João Batista, São Bento, São Vicente de Ferrer, Viana e Vitória do Mearim) (Figura 1).

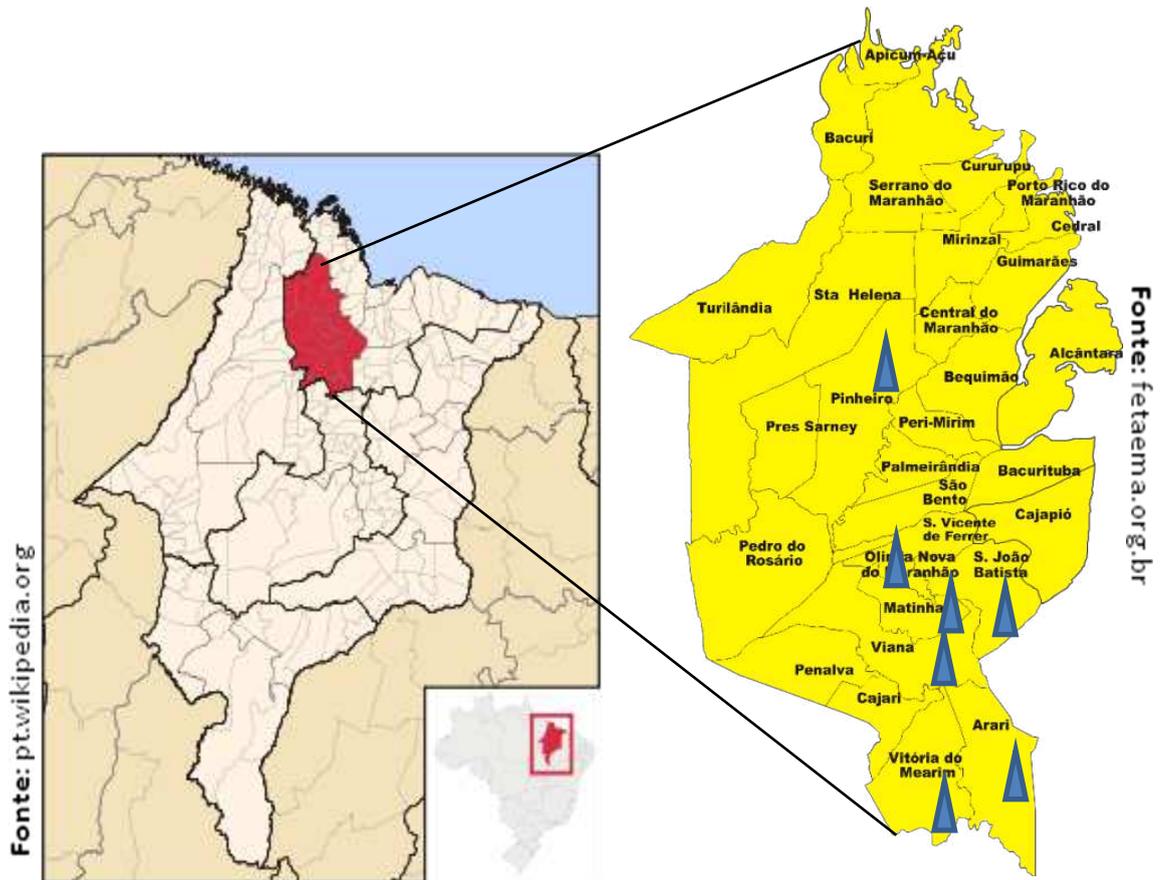


FIGURA 1. Imagem da localização geográfica da Região da Baixada Maranhense, Maranhão.

4.2 Amostragem

Para a determinação da amostragem foi utilizada a fórmula segundo Triola (1999) adaptada por Callegari e Jacques (2003), conforme descrição abaixo.

$$n_0 = \frac{1}{(E_0)^2} \quad \text{e} \quad n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

Onde: n_0 = 1ª aproximação do tamanho da amostra;
 E_0 = erro amostral tolerável (4,5%);
 n = tamanho da amostra;
 N = tamanho da população (51409).

Assim: **$n = 489$ ajustado para 477 animais.**

O ajuste do cálculo das amostras de 489 para 477 se deu em virtude da disponibilidade de rebanhos para o desenvolvimento desta pesquisa. Sendo assim, dos 30 municípios que compõe a região da Baixada Maranhense (AGED, 2011), sete, foram trabalhados nesta pesquisa. Desta forma, foram avaliados 17 rebanhos oriundos dos municípios de Arari, Matinha, Olinda Nova do Maranhão, Pinheiro, São João Batista, Viana e Vitória do Mearim (Tabela 1) (Figura 1).

Dos 477 búfalos avaliados, 444 eram fêmeas e 33 machos, sendo 100 da raça murreh, 366 mestiços de murreh e 11 mestiços de carabao, com faixa etária variando entre 1,5 a 216 meses.

TABELA 1. Distribuição quantitativa do número de amostras avaliadas de bubalinos por município e rebanhos da Baixada Maranhense - Maranhão, 2013

Município	Nºde Rebanhos/Município	Total de amostras/Município
Arari	2	150
Matinha	3	35
Olinda Nova do Maranhão	3	34
Pinheiro	1	37
São João Batista	2	34
Viana	1	94
Vitória do Mearim	5	93
TOTAL	17	477

4.3 Tuberculinização

Para a realização do Teste Cervical Comparativo, os animais foram contidos em tronco ou utilizando métodos de contenção zootécnicos. Os locais de inoculação foram demarcados por tricotomia, evitando áreas com lesão ou

nódulos de parasitos e abscessos vacinais. Em seguida foi realizada a mensuração da espessura da dobra da pele com o auxílio de um cutímetro de mola (Hauptner®). Logo após, foi inoculada na região cervical, posterior ao processo espinhoso da escápula a 20 cm da cernelha, onde foram inoculados, por via intradérmica, 0,1mL de PPD aviário (2.500 / UI) cranialmente e 0,1mL do PPD bovino (5.000/UI) (Laboratório Tecpar) caudalmente, com distância mínima entre as duas, de 15 a 20 cm. A inoculação foi realizada utilizando-se pistolas de dose automática (Hauptner®) (Figura 2). As medidas da dobra da pele, local da inoculação da tuberculina aviária e bovina, foram anotadas nos respectivos campos do formulário para o referido exame (Apêndice A). A leitura do teste, foi realizada após decorridas 24, 48 , 72 e 96 horas da tuberculinização, a fim de avaliar a resposta alérgica cutânea à tuberculina.

Para o diagnóstico, foi considerada a leitura de 72 horas conforme preconizado pelo PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal), de modo que os resultados foram obtidos a partir da subtração, da medida da dobra da pele às 72 horas com a medida da dobra da pele do dia da inoculação, tanto para o PPD aviário (ΔA) quanto para o PPD bovino (ΔB). A obtenção do resultado final se deu através da subtração das duas variações ($\Delta B - \Delta A$) (Figura 3). Os resultados dos animais reagentes foram interpretados de acordo a Tabela 2.

TABELA 2. Parâmetros de interpretação para obtenção dos resultados do Teste Cervical Comparativo – TCC em búfalos da Baixada Maranhense - Maranhão, 2013

	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Interpretação
$\Delta B < 2,0$	-	Negativo
$\Delta B < \Delta A$	< 0	Negativo
$\Delta B \geq \Delta A$	0,0 - 1,9	Negativo
$\Delta B > \Delta A$	2,0 – 3,9	Inconclusivo
$\Delta B > \Delta A$	$\geq 4,0$	Positivo

Fonte: MAPA 2006

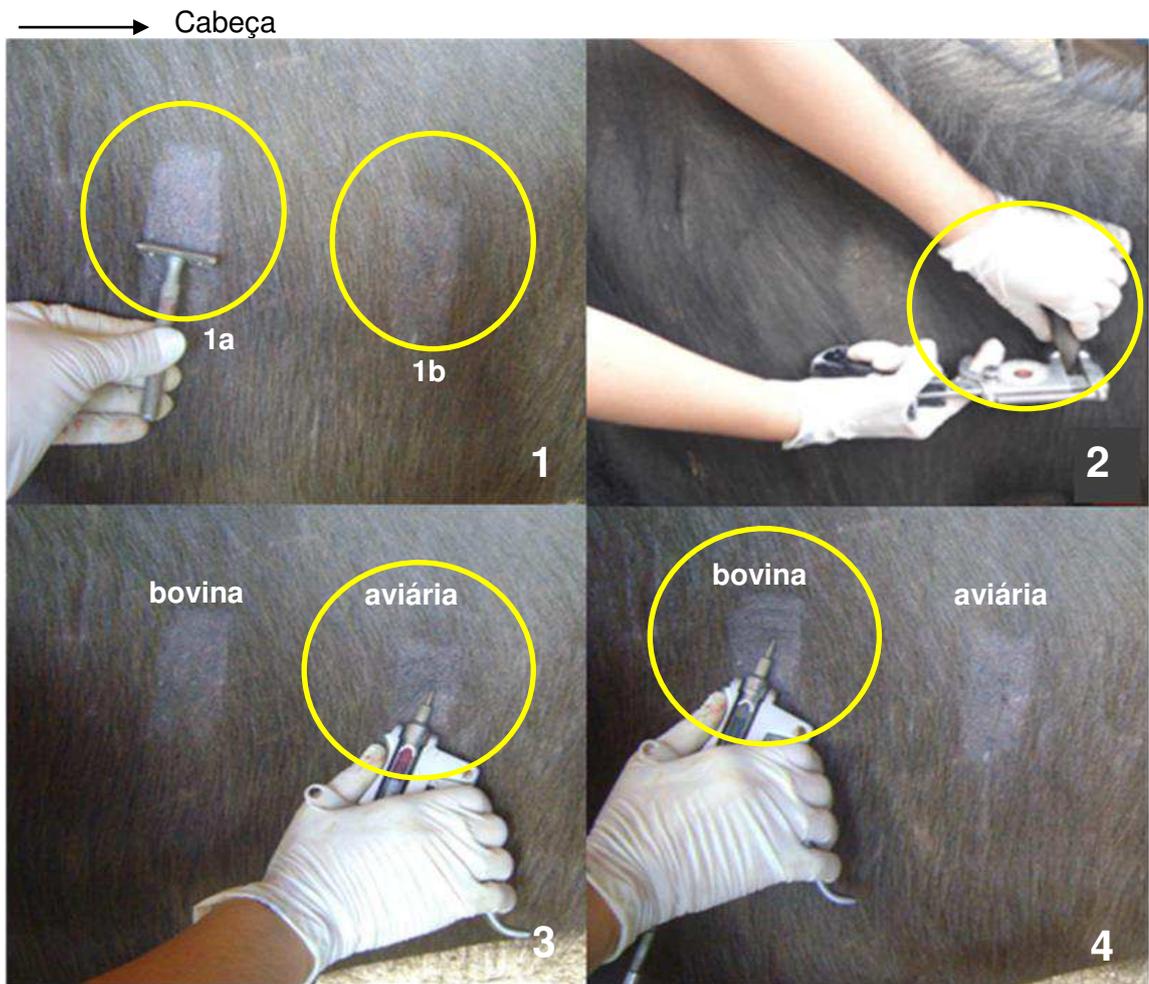


FIGURA 2. Fotografia da sequência do Teste Cervical Comparativo (TCC) em Bubalinos: Tricotomia realizada na região da escápula (1); posterior ao processo espinhoso da escápula (1a) a 20 cm as cernelha (1b); mensuração da espessura cutânea antes da inoculação (2); inoculação da Tuberculina Aviária (3) e Bovina (4).



FIGURA 3. Fotografia de búfalos com resultados positivos para tuberculose. Reações à tuberculina bovina (1a e 2a) e aviária (2a e 2b), onde se observa o aumento da espessura da pele devido à reação de hipersensibilidade após 72 horas das inoculações das tuberculinas.

4.4 Coletas das Amostras de Sangue

Com o animal ainda contido, utilizou-se álcool a 70%, a fim de promover a antissepsia da área a ser puncionada. Posteriormente, as amostras de sangue foram coletadas através da venopunção jugular, com auxílio de agulhas (25 x 8) estéreis, adaptadores e tubos a vácuo de 10 ml (Figura 4).

Após a coleta, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente em posição inclinada, até a retração do coágulo. Estas foram acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA.

No laboratório, o sangue foi centrifugado a 2.000 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos. Em seguida as alíquotas de soro foram transferidas para microtubos plásticos em duplicatas e estocadas a -20°C , até a realização dos testes sorológicos.



FIGURA 4. Fotografia da coleta de sangue em búfalo através da venopunção da jugular.

4.5 Análise das amostras

O processamento das amostras para o teste ELISA indireto, foi realizado no laboratório de imunodiagnóstico do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão. A identificação de bovinos portadores de anticorpos anti-*M. bovis* foi realizada mediante a técnica de ELISA-indireta, utilizando Kit (Mycobacterium Bovis Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories, EUA). O preparo das placas englobou as adições do controle positivo, controle negativo, amostras de soro em cada cavidade e a placa foi incubada por 60 minutos a uma temperatura de 18-26°C. Em seguida procedeu-se com a lavagem da placa utilizando-se 300µl solução de lavagem. Posteriormente, foi adicionado o conjugado e a placa incubada durante 30 minutos na temperatura de 18 a 26°C, para posterior lavagem. Feito isso, foi adicionado 100µl do substrato e incubada por 15 minutos em temperatura de 18 a 26°C e em seguida adicionou-se 100µl da solução de interrupção e então a placa foi encaminhada para leitura em leitor de ELISA, utilizando o comprimento de onda de 450nm (Figura 5).

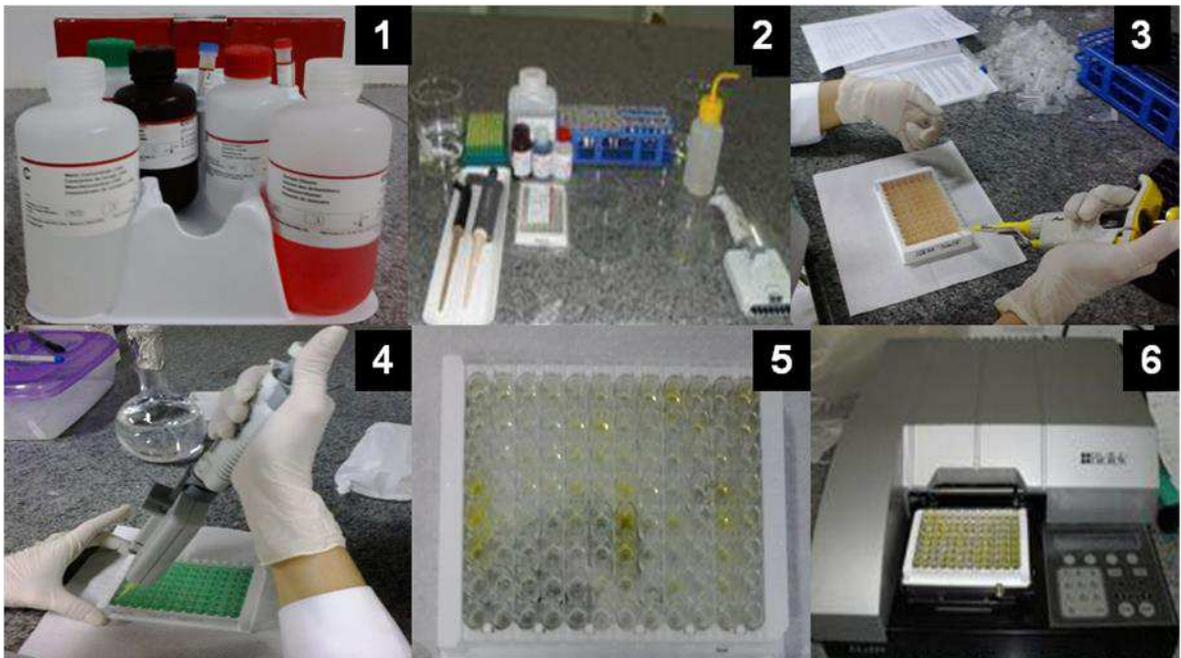


FIGURA 5. Fotografias das etapas da técnica de ELISA indireto: Kit comercial utilizado (1); Organização do material para realização do teste ELISA indireto (2); Distribuição das amostras em placa (3); Adição do conjugado enzimático (4); Adição do último reagente, solução de bloqueio (5); Leitor ELISA (6).

A interpretação dos resultados foi determinada pelo cálculo da razão das densidades ópticas (OD) das amostras testadas com relação ao controle positivo, utilizando um filtro com comprimento de onda de 450 nm, como mostra a fórmula abaixo:

$$A/P = \frac{\text{Amostra A } 450 - \text{NC}\bar{x}}{\text{PC}\bar{x} - \text{CN}\bar{x}}$$

Amostras com razão $A/P \geq 0,30$ OD foram classificadas como positivas para anticorpos contra o *M. bovis* e valores de $OD < 0,30$ foram consideradas negativas. Para que o teste fosse validado era necessário que a diferença das médias dos controles positivos fosse $\geq 0,300$ OD e a média dos controles negativos $\leq 0,200$ de densidade óptica.

4.6 Análise univariada da associação dos fatores de risco à infecção pelo *M. bovis*

Foi aplicado um questionário epidemiológico (Apêndice B), a fim de determinar fatores de risco associados à infecção pelo o *M. bovis* avaliando-se as seguintes variáveis: sexo, faixa etária, tamanho do rebanho, sistema de criação, aptidão do rebanho, alimentação, instalações, aquisição de animais, origem dos animais adquiridos, quarentena, assistência veterinária, densidade animal, propriedade vizinha, área de criação cercada, contato com animais de propriedades vizinhas, criação associada a outras espécies, realização do teste tuberculínico, ocorrência de doenças, emagrecimento progressivo e sinais clínicos respiratórios.

4.7 Planejamento Estatístico

A presente pesquisa trabalhou com uma variável quantitativa, cujas amostras foram calculadas com base na fórmula descrita por Triola (1999); adaptada por Callegari e Jacques (2003). Essas amostras foram classificadas como amostras por conveniência em razão da disponibilidade de animais a serem avaliados. Isto pode ser explicado devido ao fato da pesquisa está sendo realizada com tuberculose, enfermidade de notificação obrigatória junto aos órgãos de defesa (AGED; MAPA). Sendo assim, alguns criadores se recusaram a participar do presente estudo.

Os resultados de frequência da infecção pelo *M. bovis* na Região da Baixada Maranhense e nos municípios avaliados, foi feita através divisão do número de animais positivos pelo número de animais amostrados, utilizando-se análise estatística descritiva por meio de distribuições absoluta e relativa.

O teste t foi utilizado para a comparação das mensurações das reações pelas tuberculinas bovina e aviária, e o teste t pareado para o resultado do teste cervical comparativo. O nível de significância utilizado na

decisão dos testes estatísticos será de 5% e intervalos de confiança de 95%, utilizando-se o programa Minitab® 16.1.1. para a obtenção das análises.

Para o estudo da associação entre a positividade e fatores de riscos analisados, utilizou-se estatística por meio do teste Exato de Fisher ou, teste Qui-quadrado de independência, quando as condições para o teste Exato de Fisher não foram verificadas. O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5% (0,05) e obtiveram-se os intervalos com confiabilidade de 95%. O programa utilizado para a obtenção da análise foi o InStat 2.0 versão 2003 e o EpiInfo 3.43 versão 2007.

4.8 Estudo Espacial

Para o estudo espacial utilizou-se um receptor do Sistema de Posicionamento Global - GPS (Tracker Multilaser®), sob a forma de coordenadas geográficas, relacionadas em latitudes e longitudes, com o respectivo sistema em grau, minutos e segundos. Para a obtenção dos mapas será utilizado o software GPS TrackMaker® v. 13,0.

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, conforme protocolo nº 008/2012, para a execução da pesquisa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 477 animais avaliados, dois, oriundos dos municípios de São João Batista e Vitória do Mearim não retornaram para a leitura de 72 horas, sendo assim, os mesmos foram excluídos dos resultados de tuberculinização. Desta forma, dos 475 animais avaliados, observou-se uma frequência de 7,58% (n=36) de animais positivos e 92,42% (n=439) negativos (Figura 6). Dos 34 animais que reagiram ao teste, somente um, apresentava sinais clínicos sugestivos de tuberculose (dispnéia, tosse, aumento de linfonodo cervical superficial) (Figura 7).

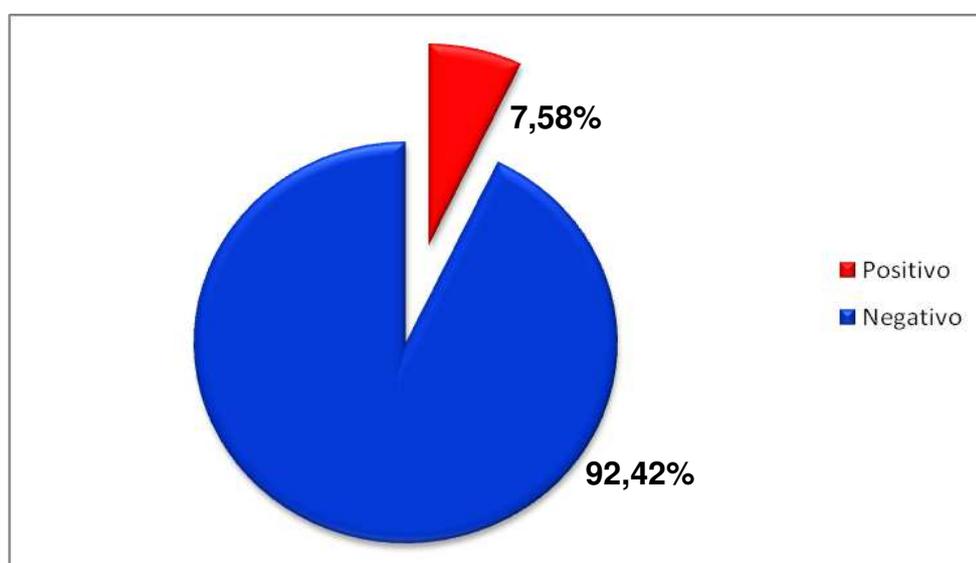


FIGURA 6. Gráfico da frequência da infecção pelo *M. bovis* em rebanhos bubalinos na Região da Baixada Maranhense – Maranhão, 2013.



.FIGURA 7. Fotografia de uma fêmea bubalina positiva ao Teste Cervical Comparativo apresentando sinais clínicos sugestivos de tuberculose: Animal em estado de caquexia (1), Ausculta pulmonar (2); animal apresentando dispnéia (3) e pulmão com lesões calcificadas (4).

Os resultados obtidos nesta pesquisa estão próximos dos descritos por Freitas et al., (2001), quando observaram uma prevalência de 7,7%, sendo 4,2% machos e 3,5% fêmeas em búfalos abatidos para consumo em estabelecimentos da região metropolitana de Belém. Na região amazônica do Brasil, Láu (1990) detectou 8% de tuberculose em búfalos e Ribeiro (2003) detectou 8,11% de bubalinos positivos ao teste cervical comparativo no estado do Pará.

Assemelham-se ainda, aos resultados de Pereira et al., (2009) que relataram uma frequência de 13,54% de positividade em búfalos do município de Arari – MA através do TCC e Javed et al., (2010), no Paquistão detectaram 14% de búfalos positivos através do teste cervical comparativo.

Diferindo, porém de Mota (2002), que encontrou uma frequência de 20,4% de búfalos positivos no município de Parintins – AM, enquanto Leite et al., (2006), detectaram 17% e 2,5% de animais positivos aos teste de tuberculinização simples e comparada respectivamente, no Rio Grande do Norte e Freitas et al., (2006), obtiveram uma prevalência de 0,21% no município de Santarém quando realizaram um levantamento da ocorrência da Tuberculose em rebanhos leiteiros no estado do Pará através do TCC. Guanzioli et al., (2008), avaliando búfalos no nordeste argentino, detectaram 0,99% (n=4) de animais positivos e 1,49% (n=6) suspeitos através do teste da prega caudal, estes 10 animais quando submetidos ao teste cervical comparativo, 50% (n=5) reagiram positivamente.

As diferenças entre os resultados podem ser justificadas pelos diferentes tipos de criação, manejo de animais, grupo ou faixa etária dos animais avaliados na pesquisa, além de fatores geográficos, tipo de exploração utilizada no rebanho e população amostrada. Entretanto, os resultados indicam que a infecção pelo *M. bovis*, ocorre em frequências importantes nos rebanhos bubalinos, confirmando que esta espécie é susceptível à tuberculose tanto quanto os bovinos.

A frequência de animais positivos para tuberculose é baixa, no entanto, demonstra a presença do *Mycobacterium* na Região da Baixada Maranhense, dado importante por se tratar de uma enfermidade infectocontagiosa de caráter zoonótico, responsável por ocasionar perdas significativas aos rebanhos e danos à saúde pública.

Apesar da tuberculose animal está inserida nos programas oficiais de controle do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), observa-se a necessidade de maior atenção no que se refere a informações

aos produtores, bem como maior rigor na realização dos testes e sacrifício dos animais infectados, uma vez que não existe vacina como forma de prevenção.

Entre os municípios estudados, Olinda Nova do Maranhão e Viana apresentaram maiores frequência de animais positivos, com 11,77% (n=4) e 11,70% (n= 11) respectivamente, seguidos pelos municípios de Matinha, Arari e Vitória do Mearim com frequências de 8,58% (n= 3), 7,33% (n= 11) e 5,44% (n= 7), respectivamente (Tabela 3).

Neste estudo, observou-se uma frequência de 21,15% (n=5) de rebanhos positivos, com uma variação de 0 a 33,33%, Diferindo dos resultados de Timothy et al., (2001), que ao avaliarem búfalos africanos, relataram que 43% dos rebanhos eram positivos, cuja variação foi de 55,6% a níveis não detectáveis.

TABELA 3. Distribuição das frequências da infecção pelo *M. bovis* em rebanhos bubalinos em Municípios da Baixada Maranhense - Maranhão, 2013

Município	Nº de animais positivos	Nº de animais negativos	Total de animais testados
Arari	11(7,33%)	139 (92,67%)	150
Matinha	3(8,58%)	32 (91,42%)	35
Olinda Nova do Maranhão	4(11,77%)	30 (88,23%)	34
Pinheiro	-	37 (100%)	37
São João Batista	-	33 (100%)	33
Viana	11(11,70%)	83 (88,30%)	94
Vitória do Mearim	7 (7,60%)	85 (92,40%)	92
Total	36	439	475

Avaliando-se a variável faixa etária, verificou-se que a mais acometida foi aquela cujos animais apresentavam idade superior a 12 meses, com frequência de 8,20% (n= 35) de positivos, enquanto animais com idade inferior a 12 meses apresentaram 2,85% (n=1) de reações positivas (Tabela 4). No Egito, foram realizadas pesquisas sobre zoonoses em búfalos, e foi observada que a taxa de incidência de tuberculose é maior em animais mais velho (4,96%) e menor, em jovens (1,29%) (MANSOUR, 1994), corroborando com os resultados deste estudo.

É razoável supor que quanto maior a idade do animal, maiores são as chances dele se expor ao agente. À medida que vão adquirindo mais idade, aumenta o convívio com outros animais possivelmente infectados, principalmente quando entram na idade reprodutiva. Além disso, na idade adulta os animais estão no ápice das suas atividades produtivas e reprodutivas, quando são exigidos ao máximo.

É importante enfatizar que a infecção pelo *M. bovis* está presente na Região da Baixada Maranhense, conforme observado pelas frequências apresentadas nos municípios, rebanhos e animais. E, diferentemente de infecções que cursam de forma aguda, esta, por ser ocasionada por uma bactéria que induz infecção assintomática, a positividade ao TCC representa a presença do animal portador e potencial disseminador do *Mycobacterium* no rebanho. Portanto, no geral, o estudo realizado mostrou que a tuberculose consiste em um problema sanitário para produtores maranhenses.

TABELA 4. Distribuição por faixa etária das frequências da infecção pelo *M. bovis* em rebanhos bubalinos em Municípios da Baixada Maranhense, Maranhão, 2013

FAIXA ETÁRIA	POSITIVO		NEGATIVO	
	Nº	%	Nº	%
≤12 meses	01	2,85	34	97,15
<12 meses	36	8,20	404	91,81
TOTAL	36	7,58	439	92,42

A avaliação da resposta alérgica mostrou um aumento da espessura da dobra da pele de forma gradativa. Os aumentos médios da espessura da pele de bubalinos induzidos pela aplicação da tuberculina aviária e bovina na região cervical apresentaram médias variando de 12,24 a 14,97 mm e 11,99 a 13,80 mm respectivamente. O ápice da reação alérgica foi observado nas 72 horas após a aplicação da tuberculina aviária, o mesmo tendo sido observado para a reação pela tuberculina bovina (Figura 8). Nas 24 horas seguintes ocorreu um decréscimo para ambas as reações, o que pode ser explicado por uma reação tardia de linfócitos T (Th1), que após migrarem para o sítio da injeção do antígeno e liberarem citocinas como a interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ) possibilitam uma sensibilização do endotélio vascular e a migração de células do sistema imune (Janeway & Travers 1997).

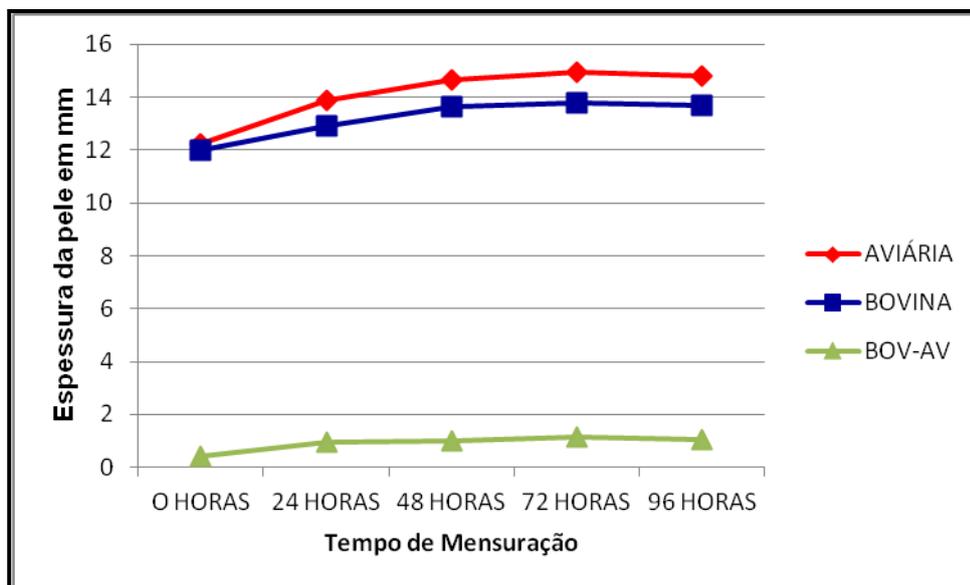


FIGURA 8. Valores médios da espessura da pele de bubalinos (mm) no local de aplicação da tuberculina aviária e bovina, em diferentes tempos da leitura, cervical comparativo, em municípios da Baixada Maranhense, Maranhão, 2013.

Quando comparando as médias de mensurações das reações produzidas pela tuberculina aviária e bovina nos diferentes tempos, observou-se diferença estatística significativa entre 0 hora e os demais tempos e 24 horas e os demais ($p < 0,05$). Enquanto, as médias às 48, 72 e 96 horas, não apresentaram diferença estatística em ambas as tuberculinizações ($p > 0,05$). Entretanto, quando a comparação foi realizada entre as tuberculinas aviária e bovina, verificou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) a partir das 24 horas, demonstrando que as reações aumentaram de forma gradativa com o passar do tempo até atingir o pico máximo, quando então começam a decrescer (Tabela 5).

TABELA 5. Média aritmética e desvio padrão (mm) dos aumentos da espessura da pele de bubalinos induzidos pelas tuberculinas aviária e bovina, aplicadas na região cervical, em diferentes tempos de leitura, em búfalos da Baixada Maranhense, Maranhão, 2013

Tuberculinas	Nº de animais	0 hora(at)	24 horas(pt)	48 horas(pt)	72 horas(pt)	96 horas(pt)
Av	473	12,24 ^{aA}	13,87 ^{bB}	14,64 ^{dC}	14,97 ^{fCD}	14,82 ^{hCDE}
		(3,36)	(4,21)	(4,40)	(4,65)	(4,64)
Bov	473	11,99 ^{aA}	12,90 ^{cB}	13,61 ^{eC}	13,80 ^{gCD}	13,68 ^{eCDE}
		(5,24)	(3,95)	(4,45)	(4,79)	(4,81)

Médias com letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre animais sensibilizados por *M. avium* e *M. bovis* (P<0,05).

Médias com letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre a intensidade das reações provocada pelo *M. avium* e *M. bovis* em diferentes tempos de leitura (P<0,05).

at= medida da espessura da pele em mm, antes da tuberculinização.

pt= medida da espessura da pele em mm, após inoculação da tuberculinização.

Av= tuberculina aviária.

Bov= tuberculina bovina.

Os resultados de mensuração da espessura da pele obtidos nesta pesquisa aproximam-se dos encontrados por Ribeiro (2003), que ao realizar estudos a fim de determinar parâmetros para uso da tuberculinização intradérmica em búfalos, avaliando a evolução da reação 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação, observaram que às 77,3 horas foi o tempo em que ocorreu o máximo de aumento da espessura da dobra da pele.

Roxo et al., (1998), avaliando a reação do teste em búfalos e bovinos, observaram que o aumento máximo da espessura da pele ocorreu às 72 horas e que as reações em búfalos foi 1,69 vezes maior que nos bovinos. Isto pode ser explicado como consequência ao tipo de criação, tornando os búfalos mais susceptíveis a micobactérias atípicas, podendo ocasionar um grande número de reações falso positivas em decorrência de reações cruzadas ao PPD bovino (EID et al., 2001). Fato este, que pode comprometer a interpretação do teste, uma vez que Freitas et al., (2001), afirmaram que o impacto das micobactérias atípicas no diagnóstico da tuberculose em búfalos ainda não foi bem definido.

Estudos visando a determinação de parâmetros de interpretação através do teste intradérmico após 12, 24, 48 e 72 horas da inoculação das tuberculinas foram realizadas por Silva et al., (2006) e Cyrillo et al., (2007) em caprinos e ovinos, respectivamente, e observaram maior intensidade da reação às 48 horas em ambas as espécies.

Os critérios para realização e interpretação do teste de tuberculinização em búfalos devem seguir o padrão recomendado para bovinos de acordo com o PNCEBT (BRASIL, 2001). No entanto, quando se trata dos parâmetros de interpretação adotados para o diagnóstico da tuberculose em búfalos, se faz necessário uma revisão dos mesmos, bem como da sensibilidade e especificidade do teste (ROXO et al., 1998; MOTA et al., 2002; LOPES et al., 2006). Lopes et al., (2006) sugerem a elaboração de uma nova tabela de interpretação das reações alérgicas, visando a redução de casos de animais falso-positivos, assim como a revisão do tempo de leitura e os locais de inoculação.

Ribeiro (2003), afirma que as diferenças anatômicas e fisiológicas entre as espécies bovina e bubalina, podem influenciar de forma negativa na interpretação dos resultados e, conseqüentemente, no estabelecimento de um programa de controle e erradicação da tuberculose bovina em búfalos.

Dentre as variáveis abordadas no questionário epidemiológico, instalações, densidade animal e realização de tuberculinização foram consideradas fatores de risco por apresentarem dados sugestivos da presença da infecção pelo *M. bovis*, bem como prováveis fatores de risco para a infecção no rebanho. O estudo da associação com a transmissão pelo *M. bovis*, foi considerada significativa quando $p < 0,05$ (Tabela 6).

Neste estudo, a variável tipo de instalações, apresentou associação significativa ($p < 0,05$) para aqueles rebanhos cujas instalações possuíam curral/bezerreiros e curral/bezerreiro/piquete maternidade/sala de ordenha. As propriedades que possuíam tais condições foram as que apresentaram maior número de animais positivos, sugerindo que quanto maior o grau de tecnificação, maior a probabilidade de ocorrer a infecção. Estas condições

podem ser potencializadas pelo fato dos animais estarem em contato constante (aglomeração), propiciando a disseminação do *Mycobacterium*.

A variável densidade animal foi considerada fator de risco para infecção pelo *M. bovis* com 20 vezes mais chances de apresentarem a infecção. Além de apresentar associação significativa para a transmissão ($p < 0,05$). Isto pode ser explicado pela própria conduta do rebanho, que tende a se aglomerar propiciando uma disseminação do agente por via aerógena, considerada a principal via de transmissão.

A realização de testes tuberculínicos também foi considerada fator de risco, pois os rebanhos que os realizavam, apresentaram 35 vezes mais chances de apresentar a infecção. Esta variável constituiu associação significativa ($p < 0,05$) para a infecção. A realização de esquemas de testes tuberculínicos e sacrifício de animais infectados constitui a principal forma de erradicar e prevenir a enfermidade.

As variáveis tamanho do rebanho, sistema de criação, aquisição de animais, quarentena, assistência veterinária, contato de animais com propriedades vizinhas, presença de outras espécies, ocorrência de doenças e emagrecimento progressivo, apesar de não terem apresentado valor de “p” significativo ($p > 0,05$), são consideradas de risco para infecção, devido ao valor de OR (*odds ratio*) ser maior que um (Figura 9). Desta forma, essas variáveis podem ser consideradas como indicadores indiretos de tecnificação, e assim apresentando risco associados ao aumento da frequência da tuberculose.

Os principais fatores que favorecem a transmissão da tuberculose no rebanho são o contato aproximado entre animais, principalmente leiteiros, criados semi-intensivamente ou em confinamento; presença de um animal portador, fonte constante de disseminação do agente no ambiente e resistência deste às condições ambientais favoráveis (BRASIL, 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

TABELA 6. Análise univariada da associação dos fatores de risco com a infecção pelo *M. bovis* em rebanhos bubalinos na Região da Baixada Maranhense - Maranhão, 2013

Variáveis		Positivos		Negativos		Total		OR	IC 95%	P
		Nº	%	Nº	%	Nº	%			
Sexo	fêmeas	23	5,00	419	88,00	442	93,00	0,54	0,15; 1,93	0,58
	machos	3	1,00	30	6,00	33	7,00			
Faixa etária	≤12meses	2	0,00	108	23,00	110	23,00	3,80	0,08; 16,34	0,05
	>12 meses	24	5,00	341	72,00	365	77,00			
Tamanho do rebanho	≤ 100 animais	1	6,00	7	41,00	8	47,00	5,60	0,47; 66,48	0,29
	>100 animais	4	24,00	5	29,00	9	53,00			
Sistema de criação	extensivo	3	18,00	12	71,00	15	88,00	17,85	0,68; 465,32	0,07
	semi-intensivo	2	12,00	0	0,00	2	12,00			
Aptidão do rebanho	leite	3	18,00	1	6,00	4	24,00	0,06	0,00; 0,91	0,05
	corte	2	12,00	11	65,00	13	76,00			
alimentação	pasto	2	11,71	9	53,00	11	64,71	-	-	0,05**
	Pasto/mineral	-	0,00	2	11,76	2	11,76			
Instalações	Pasto/mineral/concentrado	3	17,64	1	5,88	4	23,53	-	-	0,03**
	Curral	1	5,88	9	52,94	10	58,82			
	Curral/bezezeiro	2	11,76	3	17,66	5	29,42			
	Curral/bezezeiro/piquete maternidade/sala de ordenha	2	11,76	0	0,00	2	11,76			
Aquisição de animais	Não	2	12,00	9	53,00	11	65,00	4,50	0,49; 41,27	0,28
	Sim	3	18,00	3	18,00	6	35,00			
Local de aquisição	Estado	1	5,88	3	17,66	4	23,54	-	-	0,06**
	Outros Estados	2	11,76	0	0,00	2	11,76			
	Não se aplica	2	11,76	9	52,94	11	64,70			
Quarentena	Não	3	18,00	11	65,00	14	82,00	7,33	0,48; 111,26	0,19
	Sim	2	12,00	1	6,00	3	18,00			
Assistência Veterinária	Não	3	18,00	8	47,00	11	65,00	1,33	0,15; 11,50	1,00
	Sim	2	12,00	4	24,00	6	35,00			
Densidade animal	Não	1	6,00	10	59,00	11	65,00	20,00	1,39; 287,79	0,02*
	Sim	4	24,00	2	12,00	6	35,00			
Propriedade vizinha	Não	1	6,00	2	12,00	3	18,00	0,80	0,05; 11,512	1,00
	Sim	4	24,00	10	59,00	14	82,00			
Area de criação cercada	Não	1	6,00	1	6,00	2	12,00	0,36	0,01; 7,30	0,51
	Sim	4	24,00	11	65,00	15	88,00			
Contato com animais propriedades vizinhas	Não	4	24,00	5	29,00	9	53,00	0,17	0,01; 2,12	0,29
	Sim	1	6,00	7	41,00	8	47,00			
Presença de outras espécies	Não	0	0,00	2	12,00	2	12,00	2,61	0,10; 64,74	1,00
	Sim	5	29,00	10	59,00	15	88,00			
Realiza tuberculização	Não	2	12,00	12	71,00	14	82,00	35,00	1,34; 912,02	0,01*
	Sim	3	18,00	0	0,00	3	18,00			
Ocorrência de doenças	Não	4	24,00	10	59,00	14	82,00	1,25	0,08; 17,98	1,00
	Sim	1	6,00	2	12,00	3	18,00			
Emagrecimento progressivo	Não	4	24,00	10	59,00	14	82,00	1,25	0,08; 17,98	1,00
	Sim	1	6,00	2	12,00	3	18,00			
Sinais respiratórios	Não	3	18,00	7	41,00	10	59,00	0,93	0,11; 7,82	1,00
	Sim	2	12,00	5	29,00	7	41,00			

OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de Confiança; $p > 0,05$ = estatisticamente significativo; *Teste de Fischer; **Teste do Qui-quadrado.



FIGURA 9. Figura demonstrando possíveis fatores de risco associados à infecção pelo *M. bovis*: Instalações (1, 2 e 3); densidade animal (4); sala de ordenha (5); tanque de resfriamento (6); vaca com emagrecimento progressivo (7) e criação consorciada com outras espécies (8 e 9).

Na visão espacial de casos de infecção pelo *M. bovis* (pontos vermelhos) em búfalos da Região da Baixada Maranhense (Figura 10), observou-se uma área a ser trabalhada intensamente, pois há uma alta concentração de bubalinos na região, que apresenta um microclima que favorece a bubalinocultura por ser bastante drenada, rica em lagos e rios, sendo que estes sofrem influência direta do mar, ocasionando uma salinização de pastagens e menor consumo de nutrientes, incluindo sal mineral. Considerando esta situação a qual os animais são submetidos, os mesmos podem tornar-se mais susceptíveis ao surgimento de enfermidades.

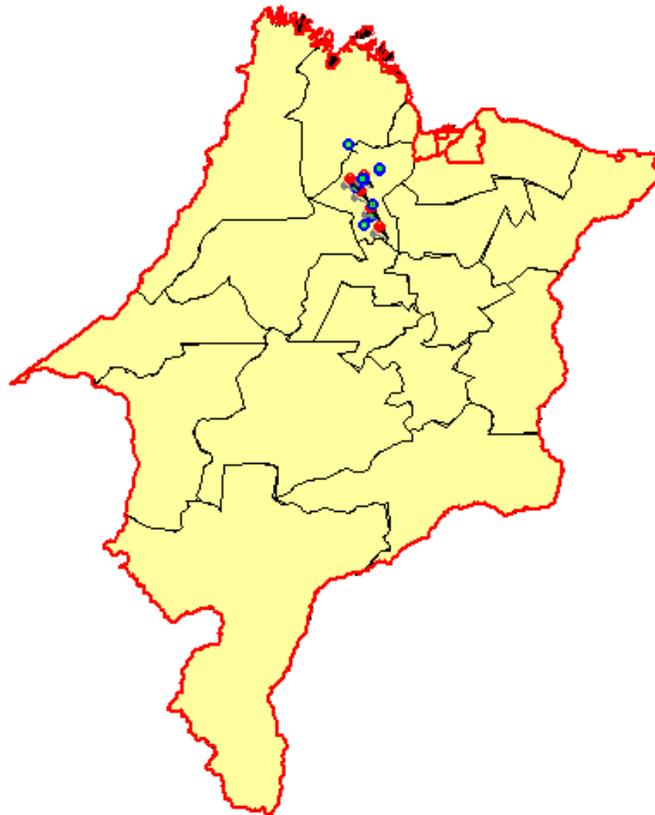


FIGURA 10. Mapa da visão espacial da tuberculização em bubalinos na Região da Baixada Maranhense – Maranhão, 2013.

Pela visão espacial por município (Figura 11), percebe-se que não há uma distribuição homogênea de rebanhos infectados, demonstrando que o búfalo parece ser mais resistente à infecção pelo *M. bovis*, apesar de haver predomínio do sistema extensivo de criação propiciando uma maior aglomeração e contato entre animais de rebanhos distintos. Muito embora, produtores tenham relatado morte de animais com emagrecimento e perda da condição física que são comumente atribuídos à seca que acomete a região em determinado período do ano. Imaginamos assim, que muitos diagnósticos errôneos têm sido realizados por práticos, criadores, donos de revendas e uma pequena parcela de veterinários, que não lançam mão das ferramentas de diagnóstico para detectar a infecção.

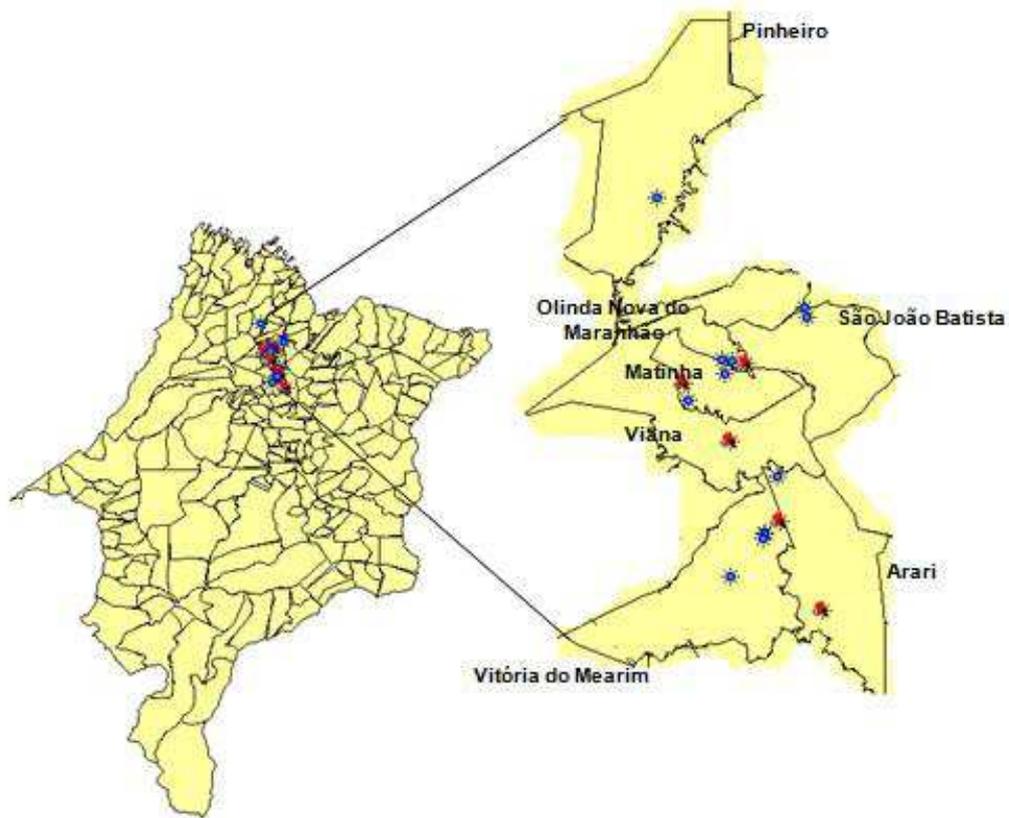


FIGURA 11. Mapa do georreferenciamento em rebanhos bubalinos positivos e negativos ao Teste Cervical Comparativo em Municípios da Baixada Maranhense – Maranhão, 2013.

Dos 455 soros sanguíneos avaliados através da técnica de ELISA indireto, observou-se 13,40% (n=61) animais reagentes, diferindo dos resultados encontrado no TCC quando foram detectados 7,91% (n=36) animais positivos (Tabela 7). Os animais reagentes ao teste ELISA e negativos ao TCC, possivelmente pode-se tratar de casos de anergia, uma vez que o sangue foi coletado antes da inoculação da tuberculina a fim de diminuir possíveis interferências no ELISA, o que poderia levar a resultados falso-positivos, já que Aagaard et al., (2006), afirmaram que em casos de tuberculose avançada os animais podem não ser detectados no teste de tuberculinização, devido à anergia.

Amostras de soro de búfalos negativos incluídos nesta pesquisa foram provenientes de rebanhos em que foram detectados casos de tuberculose, sendo assim não são considerados comprovadamente livre da doença, uma vez que Griffin et al., (1991) realizando estudo em áreas com alta prevalência de tuberculose bovina, observaram que animais apresentaram respostas humorais não tendo sido encontrada lesões *post mortem*, sugerindo que estes tenham tornado-se imunes após a exposição ao *M. bovis*.

O ELISA indireto tem sido utilizado como uma ferramenta alternativa para o diagnóstico da tuberculose a fim de detectar animais anérgicos, já que estes, são considerados como provável fonte de infecção e responsáveis pela manutenção da doença nos rebanhos (LILENBAUM et al., 1998). Carlos et al., (2013) afirmaram que há ainda uma falta de conhecimento no que se refere a resposta imune de búfalos a infecção pelo *M. bovis*, sendo necessário estudos mais abrangente com base em testes sorológicos para melhorar a identificação de animais imunologicamente anérgicos desta espécie.

TABELA 7. Avaliação das técnicas de ELISA Indireto e Teste Cervical Comparativo em amostras de soro de rebanhos bubalinos na Região da Baixada Maranhense, Maranhão, 2013

	ELISA INDIRETO	TESTE CERVICAL COMPARATIVO
	Nº ANIMAIS (%)	Nº ANIMAIS (%)
REAGENTES	61 (13,41%)	36 (7,91%)
NÃO REAGENTES	394 (86,59%)	419 (92,09%)
TOTAL	455 (100%)	455 (100%)

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- A frequência da infecção pelo *M. bovis* é baixa;
- O aumento máximo da espessura da pele ocorreu 72 horas após a inoculação das tuberculinas.
- Foram considerados fatores de risco para a transmissão do *M. bovis* instalações, densidade animal e realização de tuberculinização.
- O estudo espacial demonstrou que a infecção pelo *M. bovis* encontra-se distribuída de forma homogênea na região estudada.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

AAGRAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V. et al. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. **J. Clin microbial**, v. 44, p.4326-4335, 2006.

ABRAHÃO, R.M.C.M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. 1998. 273p. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ABRAHÃO, R.M.C.M.; NOGUEIRA, P.A.; MALUCELLI, M.I.C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.1-17, 2005.

ADAWY, A. T. Incidence of tuberculosis in egyptian buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 1., 1985, Cairo. Abstracts of contributory papers: proceedings. Cairo: **Egyptian Veterinary Association for Buffalo Development**, 1985. p. 806-818.

AGED-MA. Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão, 2011.

AWAD, F. I.; MAHAMOUD, A. H. The single intradermal comparative tuberculin test in the egyptian buffalo. **Veterinary Record**, v. 16, p. 133, 1957.

BELCHIOR, A.P.C. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais, Brasil. 2001.55f. **Dissertação** (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. 1ª ed. São Paulo. Editora Rocca, 1988.

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

BORGHESE, A.; MAZZI, M. Buffalo population and strategies in the world. In: Buffalo production and research. Roma: FAO. 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/010/ah847e/ah847e00.htm>. Acesso em 20 mar. 2009.

BRASIL Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do programa Nacional de Controle e erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNECBT)**, Brasília: MAPA, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Defesa Animal (DDA). **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 6**, de 08 de janeiro de 2004.

BRASIL. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT**. MAPA/SDA/DSA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

BRASIL. Manual de Zoonose. Programa de Zoonose Região Sul. **Tuberculose, Conselho Regional de Medicina Veterinária**. Volume 1, 1ª Edição, 2009.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. (2003). Testes não-paramétricos. In: Bioestatística: CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed. cap. 18, 2003.

CASILLAS, C.R.; ELIZONDO, G.V.; DIAZ, C.A. Comparación del ELISA con la tuberculinización en el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Comparison of ELISA and the tuberculin test in the diagnosis of bovine tuberculosis). **Tec. Pec. Mex.** v.33, n.3, p.148-158, (1995).

CASTRO, K.G.; LIEVORE, J.P.M.; CARVALHO, G.D. Tuberculose bovina: diagnóstico, controle e profilaxia. **PUBVET**, Londrina, v.3, n. 30, 2009.

CHAPINAL, N.; ELKIN, B.T.; JOLY, D.O. et al. Agreement between the caudal fold test and serological tests for the detection of Mycobacterium bovis infection in bison. **Preventive Veterinary Medicine**, doi: 10.1016/j.preventmed.2012.02.019, 2012.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos domésticos**. 2. ed., Rio de Janeiro, Medsi, cap.21, 1992, p.219-240.

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

COSIVI, O.; GRANGE, J.M.; DABORN, C.J.; RAVIGLIONE, M.C.; FUGIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R.A.; HUCHZERMAYER, H.F.A.R.; KANTOR, I.; MESLIN, F.X. Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n. 1, 1998.

CYRILLO, F.C.; LEAL, M.L.R.; MORENO, A.; MOTTA, P.M.P.C.; SINHORINI, I.L.; CASCONCELLOS, S.A.; PINHEIRO, S.R.; BENESI, F.J. Teste de tuberculização em ovinos (*Ovis aries*) experimentalmente sensibilizados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.3, p.191-197, 2007.

DE LA RUA DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.T.; VORDEMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFON-HADLEY, R.S. Ante mortem diagnosis in cattle: A review of the tuberculin tests, g-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v.81, n. 2, 190-210, 2006.

DE VOS, V.; BENGIS, R. G.; KRIEK, N. P. et al. The epidemiology of tuberculosis in free-ranging African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park, South Africa. Onderstepoort **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 68, 119–130, 2001.

DOF. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 **Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*)**. México: Diario Oficial, 1996.28p.

DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. **Micobactérias**. In: TRABULSI, R.L.; ATERTHUM, F. (Eds.). Microbiologia. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap.56.

EID, G. E.; MOUSA, I. M. I.; SELIM, S. A. K. Comparison between tuberculin test and enzyme linked immunosorbant assay for diagnosis of tuberculosis in cattle and buffaloes. **Veterinary Medical Journal Giza**, v. 49, p. 355-369, 2001.

ENRIQUEZ-CRUZ, C.; CRUZ-HERNÁNDEZ, N.I.; ZERTUCHE-RODRÍGUEZ, J.L. et al. Epidemiology of bovine tuberculosis in México, bordering the United States, at establishment of controlling strategies. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.62, n.5, p.1029-1035, 2010.

FAO, FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>> acesso em: 11 de janeiro de 2013.

FERREIRA NETO, J.S.; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. Disponível em: <http://www.bichooline.com.br/artigos/ha0008.htm>. Acesso em: 18 dez. 2001.

FIGUEIREDO, S.M; ROCHA, V.C.M.; HIGINO, S.S.; BATISTA, C.S.A.; ALVES, C.J.; CLEMENTINO, I.J.; AZEVEDO, S.S. Tuberculose bovina no Estado da Paraíba: estudo retrospectivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 9, p. 712-716, 2010.

FREITAS, J.A.; GUERRA,V.L.; PANETTA,J.C.; Características da tuberculose observada em búfalos abatidos para consumo: aspectos patológicos e identificação de micobactérias. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 4, p. 170-176, 2001a.

FREITAS, J.A.; PANETTA,J.C.; CURCIO, M.; M UEKI, S.Y. Isolamentos de cepas de Mycobacterium avium em búfalos abatidos para o consumo. **Revista de Saúde Pública** 35(3), p. 315-317, 2001b.

FREITAS, J. A., AGUIAR, R. V., PEDROSO, S. C. S., BARROSO, R., MONTEIRO F. J. C. Levantamento da Ocorrência de Tuberculose e Brucelose em Rebanhos Leiteiros no Estado do Pará. **Revista de Ciências Agrárias**.Belém, n. 46, p.227-237, jul./dez. 2006.

GARINE-WICHATITSKY, M. Bovine Tuberculosis in Buffaloes, Southern Africa. **Emerging Infectious Diseases**. vol. 16, n. 5, May 2010.

GUANZIROLI, M.C.; CICUTA, M.E.; ZUMÁRRAGA, M.J.; ROMANO, M.I. Primer aislamiento de Mycobacterium bovis de búfalo del nordeste argentino. **Rev. Vet.** 19: 2, 143–146, 2008.

GUINDI, S.M.; LOFTY, O.; AWAD, W.M. Some observations regarding the infectivity and sensitivity for tuberculosis in buffaloes in Arab Republic of Egypt. **Journal of Egyptian Veterinary Medical Association**. n.35, p. 125-138, 1975.

GRANGE, J. M. Mycobacterium bovis infection in human beings. **Tuberculosis**, v. 81, n. 1-2, p. 71-777, 2001.

GRIFFIN, J.F.; NAGAI, S.; BUCHAN, G.S. Tuberculosis in domesticated red deer: comparison of purified protein derivative and the specific protein MPB70 for in vitro diagnosis. **Res. Vet Sci**. v. 50, p. 279-285, 1991.

HAAGSMA, J. Bovine tuberculosis. Off. Intern. Épizooties. **Manual Amendment 2**, p.11, 1995.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2007. Banco de dados agregados. Disponível em:<<http://www.sidra.igge.gov.br/dba/acervo>>. Acesso em: 15 abril de 2009.

IBGE, Intituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2011. Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=1>>. Acesso em: 13 Janeiro de 2013.

JAVED, M. TARIQ et al. Risk factors associated with the presence of positive reactions in the SCCIT test in water buffalo around two cities in Punjab, Pakistan. **Acta Tropica**, Punjab, v. 115, n. , p.242-247, 20 abr. 2010.

JANEWAY-JR C.A. & TRAVERS P.O. O Sistema Imunológico na Saúde e na Doença. 2ª ed. Editora Artes Médicas, Porto Alegre, p.11:9-11:13, 1997.

KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. **Veterinary Microbiology**, v.40, p. 514, 1994.

KANAMEDA, M.; EKGATAT, M.; WONGKASEMJIT, S.; SIRIVAN, C.; PACHIMASIRI, T.; KONGKRONG, C.; BUCHAPHAN, K.; BOONTARAT, B. An evaluation of tuberculin skin tests used to diagnose tuberculosis in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Preventive Veterinary Medicine** 39, 129-135, 1999.

LAGE, A.P.; LOBATO, F.C.F.; MOTA, P.M.P.C.; GONGALVES, V.S.P. **Atualização em tuberculose bovina**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998, 65p.

LÁU, H.D. Common buffalo diseases in Amazonian Brasil. **Buffalo Buletin**. v.9, n.4, 1990.

LÁU HD. Important economic diseases in buffaloes. **Proceedings IVth World Buffalo Congresso**. São Paulo (Brasil), p. 209–220, 1994.

LÁU, H.D. **Teste Intradérmico no Diagnóstico da Tuberculose em Búfalos**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2006.

LILENBAUM, W.; SCHETTINI, J.; RIBEIRO, E.R. et al. Tuberculose bovina: prevalência e estudo epidemiológico em treze propriedades de diferentes sistemas de produção da Região dos Lagos do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.20, p.120-123, 1998.

LILENBAUM, W.; SCHETTINI, J.C.; FERREIRA, M.A.S.; SOUZA, G.N.; RIBEIRO, E.R.; MOREIRA, E.C.; FONSECA, L.S. (1999). Evaluation of an ELISA – PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. **Res. Vet. Sci.** 66, 191-195, 1999.

LILENBAUM, W. Atualização em Tuberculose Bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.22, n.4, p.145-151, 2000.

LILENBAUM, W. & FONSECA, L. The use of ELISA as a complementary tool for bovine tuberculosis control in Brazil. Braz. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.43, n. 2, p. 256-261, 2006.

LOPES, L.B.; CUNHA, A.P.; MOTA, R.A.; LEITE, R.C. Comparação de duas técnicas de tuberculinização em búfalos. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.2, p.187-191, 2006.

MANDAL, P.C. & SINGH, B. Tuberculous metritis in a buffalo (*Bos bubalus*). **Indian Journal of Animal**. Hlth, p.121-122, 1975.

MANSOUR, N.K. Incidence of same zoonotic agents and tuberculosis in slaughtered buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Medical Journal**. Giza. v.43, n.2, p.231-239, 1994.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 10 Janeiro de 2013.

MARQUES, M. E.O.; MAIA JUNIOR, J.F.; ZAPPA, V. Controle da tuberculose bovina. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 10, p.1-5, jan. 2008.

MATTHIAS, D. Infecções por microbactérias. In: BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988. p. 261-289.

MEDEIROS, L.S.; MARASSI, C.D.; FIGUEIREDO, E.E.S.; LILENBAUM, W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis In Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. ISSN 1517-8382, 2010.

MELLO, D.QUEIROZ, J. C.; GALVÃO, T. B. Reações positivas à prova de tuberculina em búfalos, *Bubalus bubalis*, var. *Bubalis* (Linneu 1758). **Revista de Medicina Veterinária**, São Paulo, v.1, p.115-116, 1965.

MILLER, E.B. Tuberculous cattle problem in the United States to 1917. **Hist. Med. Vet.** v. 14, p. 1-64, 1989.

MICHEL, A. L.; BENGIS, R.G.; KEET, D. F.; HOFMEYR, M.; KLERK, L.M.; CROSS, P.C.; JOLLES, A.E.; COOPER, D. WHYTE, I.J.; BUSS, P.; GODFROID, J. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: implications and challenges. **Veterinary Microbiology**. 112, 91–100, 2006.

MODA, G.; DABORN, C.J.; GRANGE, J.M.; COSIVI, O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. **Tubercle and Lung Disease**. v.77, p.103-108, 1996.

MOTA, P.M.P.C.; NAKAJIMA, M. Tuberculose bovina. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: Embrapa – CNPGL, 1992, p.96-122.

MOTA, P. M. P. C.; LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; LAGE, A. P.; PARREIRAS, P. M.; LEITE, R. C. Ocorrência de tuberculose em rebanhos bubalinos (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*-Linneus, 1758) no Município de Parintins, Amazonas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 441-443, 2002.

MONAGHAN ML, DOHERTY ML, COLLINS JD, KAZDA JF, QUINN PJ. The tuberculin test. **Veterinary Microbiology**. V.40, p.111–124, 1994.

MURAKAMI, P.S.; FUVERKI, R.B.N.; NAKATANI, S.M.; FILHO, I.R.B.; BIONDO, A.W. Tuberculose bovina: saúde animal e saúde pública. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecnia**. Unipar, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 67-74, jan./jun. 2009.

NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M.; BRYSON, D.B; HANNA, J. Patogenesis of Mycobactrium bovis infection in cathe. **Veterinary Microbiology**. v.40, n.1-2, p.41-52,1994.

NEVES, K.A.L.; SOUSA, I.K.F.; DELGADO, E.M.; ABRANTES, M.R.; MOREIRA, T.R.; VINHOLTE, B.P.; VALE, W.G.; SILVA, J.B.A. Descarte de vísceras de bubalinos abatidos sob inspeção federal na região oeste do Pará, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. 2011 dez.; 18(4 Supl. 3): 1139. IX Congresso Brasileiro Buiatria. 04 a 07 de Outubro de 2011. Goiânia - Goiás, Brasil.

OIE. World Organization for Animal Health, OIE. Bovine tuberculosis. Disponível em:<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BOVINE-TB-EN.pdf >. Acessado em: 15 janeiro 2013a.

OIE. World Organization for Animal Health. Bovine tuberculosis. OIE Terrestrial Manual 2009. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf>. Acessado em: 15 janeiro 2013b.

OLIVEIRA, I. A. S.; MELO, H. P. C.; CÂMARA, A.; DIAS, R. V. C.; SOTO BLANCO, B. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 395-400, 2007.

OLIVEIRA, V.M.; FONSECA, A.H.; PEREIRA, M.J.S.; CARNEIRO, A.V.; JESUS, V.L.T, ALVES, P.A.M. Análise retrospectiva dos fatores de associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**., v.60, n.3, p.574-579, 2008.

OLIVEIRA, V.M.; FONSECA, A.H.; PEREIRA, M.J.S.; CARNEIRO, A.V.; JESUS, V.L.T.; ALVES, P.A.M. Análise retrospectiva dos fatores associados à distribuição da tuberculose bovina no estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.3, p.574-579, 2008.

O' REILLY, L.M. & DABORN, C.J. The epidemiology of Mycobacterium bovis infection in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, v.76, p.1-46, 1995.

PEREZ, A.M.; WARD, M.P. TORRES, P. et al. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**. v.56, p.63-74, 2002.

PEREIRA, H. M.; SANTOS, H.P.; BEZERRA, D.C.; ARAGÃO, A.C.C.; SOUSA, V.E. Ocorrência de tuberculose em rebanho bubalino (*Bubalus bubalis* var. *Bubalis-linneus*, 1758) em uma propriedade do município de Arari, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. Supl. 1, 2009 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria.

POLLOCK, J.M. & NEILL, S.D. Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. **Journal Veterinary**. v.163, n.2, 115-127, 2002.

PORTUGAL, M.A.S.C.; GIORGI, W.; SIQUEIRA, P.A. Ocorrência de tuberculose em bubalinos (*Buballus bubalis* var. *Bubalis linneus*, 1758) no Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 4, p. 231-238, 1971.

PROAÑO-PEREZ, F.; RIGOUTS, L.; BRANDT, J.; DORNY, P.; RON, J.; CHAVEZ, M.; RODRIGUEZ, R.; FISSETTE, K.; VAN AERDE, A.; PORTAELS, F.; BENITEZ-ORTIZ, W. Preliminary observations on Mycobacterium spp. In dairy cattle in Ecuador. **Animal Journal of Tropical Medicine**. Hyg. v. 75, p. 318–323, 2006.

PROAÑO-PEREZ, P.; BENITEZ-ORTIZ, W.; CELI-ERAZO, M. et al. Comparative intradermal tuberculin test in dairy cattle in the north of Ecuador and risk factors associated with bovine tuberculosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.81, n.6, p.1103-1109, 2009.

RADOSTITS, O. M.; GA Y, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 817-827, 2002.

RAMOS, M.C.; MORAES M.J.; CALISNI, A.L.; ROSCANI, G.N.; PICOLLI, E.A. A retrospective bacteriological study of mycobacterial infections in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Br J Infect Dis**, n. 4, p.86-90, 2000.

RIBEIRO, A.C.C.L. **Diagnóstico da tuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Tese- 34p. 2003.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Livraria Varela, v.1,p.437, 2007.

RITACCO, V.; KANTOR, I.N.; BARRERA, L.; NADER, A.; BERNADELLI, A.; TORREA, G.; ERRICO, F.; FLIESS, E. Assessment of the sensivity and specificity of ELISA for the detection of Mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. **Journal Veterinary Medicine**. v.34, n.2, p. 119-125, (1987).

ROCHA, DÉLCIO. **Bubalinocultura: Búfalo**: sinônimo de produção de carne. Publicado em 17/05/2007a.

RODWELL, T.C.; KRIEK, N.P.; BENGIS, R.G.et al. Prevalence of bovine tuberculosis in african buffalo At kruger national park. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37, n.2, p. 258–264, 2001.

ROSEMBERG, J. Tuberculose – Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculção. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v.7, n.2, 1999.

ROXO, E. Tuberculose In: GONÇALVES, C.A; ROXO, E.; CALIL, E.M.B.; KOTAIT, I.; BALDASSI, L.; PORTUGAL, M.A.SC.; LAUAR, N.M.; CALIL, R.M.; GIORGI, W. **Zoonoses: doenças dos animais transmissíveis ao homem**. São Paulo: CATTI, 1995. p.115-120.

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

ROXO, E. M. bovis como causa de zoonose. **Rev. Ciênc. Farm.** São Paulo. v.18, n.1, p. 101-108,1997.

ROXO, E.; VASCONCELLOS, S.R.; PINHEIRO, S.R.; BARUSELLI, P.S.; MACRUZ, R.; LEITE, C.Q.L. Evaluation of tuberculin skin reaction in buffaloes (Bubalus bubalis). **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.65, n.1, p.81-92, 1998.

RUGGIERO, A.P.M. Métodos moleculares aplicados ao aplicados ao diagnóstico da tuberculose bovina. 2004. 68p. **Dissertação** (mestrado) – Universidade de São Paulo, faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2004.

RUGGIERO, A. P.; IKUNO, A. A.; FERREIRA, V. C. A.; ROXO, E. Tuberculose Bovina: Alternativas para Diagnóstico. **Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal**. v.74, n.1, p.55-65, 2007.

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL (SENASA). 2000. Tuberculosis bovina, pruebas tuberculínicas (inoculación, lectura e interpretación), preguntas y respuestas. **Publ. SENASA**, Buenos Aires, Argentina, 76 p.

SALAZAR, F.H.P. Ocorrência de tuberculose causada por Mycobacterium bovis em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Mato Grosso, Brasil. 2005. 68p. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Campo Grande, 2005.

SERRA. O. R. Condições de manejo, preservação e caracterização fenotípica do grupamento genético equinos “Baixadeiro”. 2004. **Dissertação** (mestrado) -

Universidade Estadual do Maranhão, Campus Paulo VI, São Luis, Maranhão, 2004.

SILVA, E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. **Veterinary Microbiology**. v.78, n. 2, p. 111-117, 2001.

SILVA, P.E.G.; PINHEIRO, S.R.; LEAL, M.L.R.; BERTAGNON, H.G.; MOTTA, P.M.P.C.; SINHORINI, I.L.; VASCONCELLOS, S.A.; BENESI, F.J. Teste de tuberculinização em caprinos (*Capra hircus*) experimentalmente sensibilizados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.880-886, 2006.

SHUKLA, R. R. & SINGH, G. Studies on tuberculosis among indian buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v. 49, n.2, p. 119-123, 1972.

SMALL, K .J.; THOMSON, D. The efficiency of bovine PPD tuberculin in single caudal fold test to detect tuberculosis in water buffalo. **Buffalo Bulletin**, n. 1, v.5, p. 62-64, 1986.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos**. São Paulo: Manole, v. 1 e v. 2, p. 620, 621, 1218, 1993.

SOUZA, A.V.; SOUSA, C.F.A.; SOUZA, R.M.; RIBEIRO, R.M.P.; OLIVEIRA, A.L. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 59, p. 22-27, 1999.

TADAYON, K.; MOSAVARI, N.; SHAHMORADI, A.H.; SADEGHI, F.; AZARVANDI, A.; FORBES, K. The Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Buffalo in Iran. **J. Vet. Med.** B 53, 41–42, 2006.

TRIOLA, Mário. F. **Introdução à Estatística**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.

VACCARO, A.; CAPUANO, G.; DAMIANO, N. Ricerche sulla prevalenza della tubercolosi nell' allevamento bufalino della province de caserta e salerno. In: CONGRESSO INTERNATIONAL SULL' ALLEVAMENTO BUFALINO NEL MONDO. **Atti Del Convegno**, 2., 1982, Caserta, p.191.

VANNAMAYYA, P.R.; SHARMA, A.K.; PARAI, T,P,; PALIWAL, O.P.; PARIHAR, N.S. Evaluation of tuberculin and johnin tests with pathological lesions in buffaloes. **Indian Journal Animal Science**., v.3, n.57, p.189-190, 1987.

VASCONCELOS, A.T.C. **Búfalos no Maranhão**. 1ª Ed. São Luís. p. 37. 2012.

VIEIRA, J.N., et al. Bubalinocultura no Brasil: Short communication. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 2, Ed. 149, Art. 1003, 2011. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis. Fact Sheet No 104. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>>. Acesso em: 21 janeiro de 2004.

WELSH, M.D.; CUNNINGHAM, R.T.; CORBETT, D.M.; GIRVIN, R.M.; MCNAIR, J.; SKUCE, R.A.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Immunology**. v. 114, n. 1, p. 101-111, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1993. Zoonotic tuberculosis. Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*), WHO/CDS/VPH **Monograph Series** 130: 27, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. Tuberculosis control in the WHO European Region. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/document/CMA/rc52fstb0702e.pdf>>. Acesso em: 7 novembro de 2005.

ZAVA, M.A.R.A. Produção de Búfalos. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987. BÚFALO - SELVAGEM, MAS NEM TANTO! **Revista Rural**, nº 126 – ago./2008.

APÊNDICES

APÊNDICE B – FICHA CADASTRAL DA PROPRIEDADE.

TUBERCULOSE EM BÚFALOS (*BUBALUS BUBALIS*, VAR. *BUBALIS-LINNAEUS*, 1758): DIAGNÓSTICO, AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA, FATORES DE RISCO, GEORREFERENCIAMENTO E COMPARAÇÃO DE TESTES EM REBANHOS DA BAIXADA MARANHENSE – MA, BRASIL

Ficha Nº _____

Coordenadas geográficas _____

Ficha Cadastral da Propriedade

Dados Gerais

1. Nome da Propriedade: _____
2. Regional: _____ Município: _____
3. Endereço: _____
4. Nome do Proprietário: _____
5. Efetivo do rebanho: _____
6. Raça dos Animais: _____ Sexo: _____ Idade: _____
7. Sistema de Criação: _____ Aptidão: _____
8. Alimentação: () Pasto () Pasto + Concentrado () Mineralização
9. Ingestão de água: _____

INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS:

10. Instalações:
() Curral () Bezerreiro () Piquete maternidade () Sala de ordenha
11. Adquire animais com frequência? () Sim () Não
12. Aquisição de animais: () Região () Estado () Outros Estados
13. Realiza Quarentena? () Sim () Não

- 30 dias 40 dias 50 dias 60 dias
14. Assistência Veterinária: Sim Não
15. Destino dos Animais: Abate Venda Outros
16. Área de criação cercada: Sim Não
17. Propriedades Vizinhas : Sim Não
- 17.1 Aglomeração de animais: Sim Não
- 17.2 Distância Aproximada: _____
- 17.3 Contato entre os animais das prop. vizinhas: Sim Não
- 17.4 Contato de Fômites das prop. vizinhas: Sim Não
- Agulhas Seringas Utensílios de ordenha Material cirúrgico
18. Criação consorciada: Sim Não
- Bovinos Ovinos Caprinos Suínos Cães Gatos
19. Vacinação: Sim Não
- Aftosa Raiva Clostridioses Brucelose Leptospirose
20. Realiza teste de Tuberculinização: Sim Não
21. Realiza exames de brucelose: Sim Não
22. Ordenha: N°de ordenhas / Dia: _____
- Manual Mecânica
23. Produção/dia/leite _____
24. Reprodução: MN MN + IA IA
25. Ocorrência de Doenças: Sim Não
- Brucelose Tuberculose Aftosa Leptospirose Raiva
26. Sinais Clínicos
- Emagrecimento progressivo Hipertrofia ganglionar
27. Digestivos: Sim Não
- Diarréia Timpanismo Sialorréia
28. Reprodutivos: Sim Não
- Aborto: Sim Não
- Eficiência Reprodutiva: Retorno ao cio
- Aumento do intervalo entre cios
- Esterelidade
29. Respiratórios: Sim Não

Dispneia Tosse seca Secreção nasal

30. Neurológicos: Sim Não

Paralisia de membros Incoordenação Mov. pedalagem

Agressividade

31. Sacrifício de Animais: Sim Não .

Observações:
