

ISOLAMENTO DE BACIOS ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTES A PARTIR DE LESÕES EM CARÇAÇAS DE BOVINOS ABATIDOS EM FEIRA DE SANTANA, BAHIA, BRASIL

Vanessa Moura Reis¹, Larissa de Fátima Cardoso Duarte¹, Fernando Alzamora Filho¹, Nairléia dos Santos Silva¹, Erivelton de Oliveira Sousa², Joselito Nunes Costa¹.

RESUMO

Mycobacterium bovis é o agente causal da tuberculose bovina, enfermidade de impacto na saúde pública e perdas econômicas na pecuária, que leva ao desenvolvimento de lesões granulomatosas. O objetivo desse estudo foi avaliar a frequência de bacilos álcool-ácido resistentes em amostras *post mortem* com e sem lesões sugestivas de tuberculose. Foram coletadas 92 amostras de pulmões e linfonodos da carcaça de bovinos abatidos em Feira de Santana, Bahia, condenados pela inspeção. Foi obtida uma frequência de 12% (11/92) de crescimento de colônias de coloração creme e de aspecto rugoso. A baciloscopia revelou bacilos álcool-ácido resistentes em 100% dos isolados. Este estudo revelou que o exame bacteriológico de lesões observadas durante a inspeção de bovinos abatidos nos matadouros é um importante aliado na vigilância epidemiológica da tuberculose bovina, mas provas bioquímicas ou moleculares são necessárias para o diagnóstico definitivo.

Palavras-chave: BAAR, Isolamento, Micobacteria, Tuberculose

INTRODUÇÃO

Mycobacterium bovis é o agente causal da tuberculose bovina, enfermidade infectocontagiosa de evolução crônica que acomete bovinos e bubalinos e outros animais, tanto domésticos como silvestres,

e ocasionalmente o homem. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas nodulares, denominadas tubérculos (ACHA; SZYFRES, 2001; ALMEIDA et al., 2006; BRASIL, 2006, COLLINS, 2001).

A importância econômica atribuída à doença bovina está baseada nas perdas diretas resultantes da morte de animais, da queda no ganho de peso e diminuição da produção de leite, do descarte precoce e eliminação de animais de alto valor zootécnico (LILENBAUM, 2000; PACHECO et al., 2009). Os principais fatores que favorecem a transmissão desta doença no rebanho são: a elevada densidade, permitindo o contato entre os bovinos, principalmente, os leiteiros criados em sistema semi-intensivo e intensivo; a presença de um animal portador e a resistência do agente às condições ambientais favoráveis (OLIVEIRA et al., 2007).

No Brasil, a tuberculose bovina é endêmica e com o intuito de diminuir a ocorrência da doença nos rebanhos bovinos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 2001, o PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina), que tem o objetivo de reduzir a prevalência e incidência da doença, certificar as propriedades livres e, posteriormente, implantar medidas compulsórias de erradicação (BRASIL, 2006). Cumpridas essas etapas, faz-se necessário a implantação de sistema de vigilância

¹ Médica Veterinária. Mestre. Universidade Federal da Bahia. nreis19@yahoo.com.br

¹ Médico Veterinário. Professor Assistente. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Doutorando em Ciência Animal nos Trópicos – UFBA.

¹ Médica Veterinária. Mestranda. Universidade de São Paulo – USP

² Farmacêutico. Laboratório Central Professor Gonçalo Muniz.-LACEN, BA.

¹ Médico Veterinário. Doutor. Professor Adjunto Universidade Federal da Bahia.

epidemiológica nos abatedouros que, partindo de achados da inspeção e confirmação laboratorial, auxiliem no rastreamento de novos focos (FERREIRA NETO; BERNARDI, 1997; RODRIGUEZ et al., 2004; VARELLO et al., 2008).

A inspeção *post mortem* dos animais destinados ao consumo nos abatedouros tem grande importância na vigilância epidemiológica da tuberculose e, por meio desta medida, países endêmicos que possuem satisfatório desempenho nos seus serviços de inspeção nos abatedouros, juntamente com um consolidado programa de erradicação, têm conseguido reduzir a prevalência da doença, pois o diagnóstico precoce é a chave para o controle e a erradicação do *M. bovis* (KANTOR; RITACCO, 2006; RUA-DOMENECH, 2006). A identificação de alterações anatomopatológicas características durante a inspeção *post mortem* nos abatedouros, juntamente com a realização de exames bacteriológicos são importantes ferramentas na vigilância epidemiológica da doença (SOUZA et al., 1999).

O exame bacteriológico tem sido apontado como a sinalização mais segura da presença de micobactérias em animais com tuberculose e outras micobacterioses (PINTO et al., 2002). Desta forma, objetivou-se, realizar um estudo bacteriológico de bacilos álcool-ácidos resistentes em lesões sugestivas ou não de tuberculose, presentes nos pulmões e linfonodos de bovinos abatidos no município de Feira de Santana, Bahia.

MATERIAL E METODOS

No período de maio de 2009 a março de 2010, foram coletadas 92 amostras de pulmões e linfonodos

condenados por apresentarem lesões sugestivas de tuberculose ou por alterações diversas durante a rotina de inspeção de carcaças bovinas (Figura 1) de um matadouro frigorífico localizado no município de Feira de Santana, pelo Serviço de Inspeção Estadual. Estas amostras foram oriundas da inspeção de aproximadamente 10.120 bovinos abatidos. As amostras foram colhidas e colocadas em sacos plásticos individuais, refrigeradas e acondicionadas em caixa térmica até chegada ao Laboratório de Bacteriologia da UFBA, onde foram alíquotadas.

Uma alíquota da lesão coletada permaneceu armazenada a temperatura de -20°C, e a outra encaminhada ao setor de micobacteriologia do Laboratório Central Professor Gonçalo Muniz (LACEN-BA) para o processamento e análise. Neste, as amostras foram maceradas com salina 0,85% com a utilização de gral e pistilo estéreis, até a formação de uma suspensão homogênea. O macerado obtido foi filtrado em gaze estéril para um tubo tipo falcon de 50 ml e submetido à descontaminação pelo método Petroff, seguido de centrifugação a 3000 r.p.m. por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de salina 0,85% estéril. Em seguida, 100 µl da solução foram semeadas em duplicata em tubos contendo os meios de cultura de Lowenstein-Jensen (LJ) e Stonebrink-Leslie (ST). Os cultivos foram mantidos em estufas a 37°C por até 90 dias e avaliados semanalmente para verificação de colônias sugestivas de micobactérias (CPZ, 1973; BRASIL, 2008). As colônias isoladas foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen para confirmação das características tintoriais de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (BRASIL, 2008).



Figura 1: Carcaça bovina condenada com lesões sugestivas de tuberculose bovina

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 12% (11/92) das amostras analisadas houve crescimento bacteriano e a posterior confirmação de BAAR. As 81 amostras não apresentaram crescimento durante os 90 dias e não se observou contaminação durante o procedimento. O diagnóstico bacteriológico é um método seguro e considerado “padrão ouro”, entretanto, requer meios de cultivos específicos e métodos de descontaminação das amostras, além de um longo tempo para o crescimento das primeiras colônias (CORNER, 1994). Segundo Balian et al. (2002), as técnicas microbiológicas clássicas utilizadas para o isolamento de micobactérias apresentam uma sensibilidade baixa, pois os processos de descontaminação que tem por objetivo inativar outras bactérias presentes na amostra, também podem afetar o crescimento das micobactérias, o que pode justificar o elevado número de amostras sem crescimento no presente trabalho. Isto também pode estar relacionado ao caráter crônico da enfermidade, dificultando a observação de lesões em animais mais jovens, pois a maioria das amostras tratava-se de bovinos machos com até 42 meses de idade, e a prevalência das lesões nos achados *post-mortem* aumenta com a idade dos animais (O'REILLY; DABORN, 1995). O caráter crônico da enfermidade dificulta a observação de lesões em animais mais jovens (OIE, 2009; BRASIL,

2006). Outra justificativa seria a baixa prevalência da tuberculose bovina observada no Estado da Bahia. As prevalências de focos de tuberculose bovina e de animais positivos no Estado foram 1,6% e 0,21% (COSTA, 2012), uma das mais baixas observadas nos levantamentos oriundos dos PNCEBT.

A pesquisa de micobactérias através do método de Ziehl-Neelsen permite a visualização de BAAR somente na concentração estimada entre 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro. Apesar de ser uma técnica largamente utilizada, por ser de fácil execução e baixo custo, apresenta limitações, como a baixa sensibilidade e a impossibilidade de distinguir os membros da família *Mycobacteriaceae* e outros microrganismos BAAR, como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (PRITCHARD, 1998; BRASIL, 2008).

Todas as amostras BAAR cresceram apenas no meio de ST. As colônias apresentavam aspecto rugoso, coloração creme e arredondadas (Figura 2). Esta morfologia de colônias é considerada por Monteiro et al. (2003) como possivelmente a forma típica das micobactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e para Corner (1994) e Mota et al. (2001), são colônias típicas de *M. bovis*, aquelas de coloração creme, amareladas, pequenas, arredondadas, com bordas irregulares e superfície granular, semelhantes aos isolados da presente pesquisa.

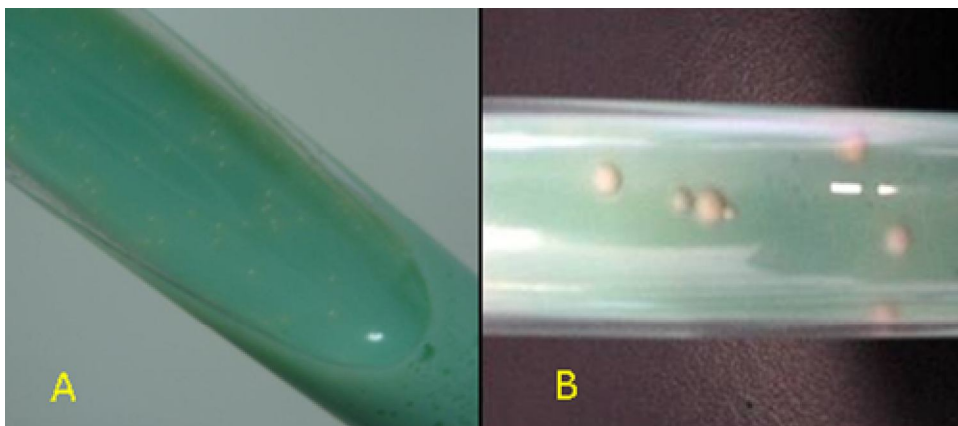


Figura 2: Colônias de BAAR após 30(A) e 60(B) dias de cultivo, respectivamente.

Costa et al. (2010) relataram que das dez amostras BAAR, oito apresentaram crescimento de colônias no meio ST e duas cresceram tanto no ST como em meio LJ, diferenciando do nosso experimento, que apenas observou o crescimento de colônias em meio ST.

Muitos estudos, como este, envolvendo o diagnóstico da tuberculose bovina por meio do exame bacteriológico de lesões oriundas de matadouros-frigoríficos durante a rotina de inspeção têm sido desenvolvidos na tentativa de identificar focos da doença e, assim, auxiliar o PNCEBT. Segundo Pinto et al. (2002), o exame microbiológico foi positivo em 38% das amostras sem lesões macroscópicas, confirmando a sua importância em situações especiais de inspeção que demandem maior proteção à saúde pública, como abate de bovinos positivos ou suspeitos à tuberculinização.

A utilização de informações oriundas de frigoríficos como uma das estratégias de combate à tuberculose bovina motivou o trabalho de diversos autores. Brown e Anda (1998), realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar a prevalência da tuberculose bovina no México, na região exportadora de animais para os Estados Unidos da América, através de lesões oriundas de matadouros para controle da introdução de animais doentes, demonstrando que o exame *post mortem* cuidadoso de linfonodos e pulmões é um componente importante de programas de erradicação de tuberculose, bem como deve ser uma parte integrante da inspeção veterinária e programas de higiene (COLLINS, 2006).

No Brasil, estudos têm sido desenvolvidos sobre a tuberculose bovina com base em informações de frigoríficos. A presença de *M. bovis* em carcaças bovinas com lesões sugestivas de tuberculose foi avaliada por Araújo et al. (2005), em 72 amostras de carcaças selecionadas durante a rotina de inspeção em abatedouros, sendo que 17 (23,6 %) das amostras apresentaram colônias sugestivas de micobactérias e que foram confirmados como BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen, obtendo um número de isolados superior ao obtido neste trabalho.

Na Bahia, o isolamento de micobactérias presentes em linfonodos e nas diversas lesões pulmonares em carcaças de bovinos, sugestivas ou não de tuberculose, comuns durante a rotina de inspeção em matadouros-frigoríficos da região metropolitana de Salvador, foram realizados por Costa et al. (2010), tendo como resultados, dez (23%) amostras BAAR, onze (26%) amostras sem crescimento e 22 (51%) apresentaram contaminação. O maior número de BAAR isolados positivos observados na pesquisa de Costa et al. (2010) pode estar relacionado com o abate de animais descartados das pequenas propriedades leiteiras, uma vez que as amostras eram oriundas de frigorífico com Serviço de Inspeção Municipal.

CONCLUSÃO

É importante a realização do exame bacteriológico para a identificação de BAAR em lesões *post mortem* suspeita ou não de tuberculose em animais

encaminhados à linha de abate, corroborando com o diagnóstico presuntivo, mas exames complementares são necessários para a identificação das espécies de micobactérias.

Acid Fast Bacilli isolated from lesions in carcasses slaughtered in the city of Feira de Santana, Bahia, Brazil.

ABSTRACT

Mycobacterium bovis is the causative agent of bovine tuberculosis, a disease of public health impact and economic losses in cattle production, leading to the development of granulomatous lesions. The aim of this study was to evaluate the frequency of acid fast bacilli in samples with and without *post-mortem* lesions suggestive of tuberculosis. We collected 92 samples of lungs and lymph nodes of the carcass of slaughtered cattle in Feira de Santana, Bahia, condemned by the inspection. Frequency of 12% (11/92) of colored growth colony cream rugose was obtained. The sputum smear microscopy revealed acid-fast bacilli in 100% of resistant isolates. This study showed that the bacteriological examination of lesions observed during the inspection of cattle slaughtered at abattoirs is an important ally in the epidemiological surveillance of bovine tuberculosis, but biochemical or molecular tests are required for definitive diagnosis.

Keywords – AFB, Isolation, Mycobacteria, Tuberculosis

REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales**. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, p. 266-283, 2001.

ALMEIDA, R. F. C.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; FERNANDES, M. C.; CARVALHO, N. M.; JORGE, K. S. G.; OSÓRIO, A. L. A. R. Resposta imune específica de bovinos experimentalmente sensibilizados com inóculos inativados de

Mycobacterium bovis e *Mycobacterium avium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 195-200, 2006.

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

BALIAN, S.C.; PINHEIRO, S.R.; GUERRA, J.L.; MORAIS, Z.M., FERREIRA F., FERREIRA NETO, J.S. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias, **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.11-14, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal-PNCEBT**. Brasília-DF, 188p. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobacterias**. 1ª Edição. Ministério da Saúde, Brasília. 436p. 2008.

BROWN, W. H.; ANDA, J. H.. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. Schaumburg, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 4, 1998.

CENTRO PANAMERICANODE ZONOSIS (CPZ). **Metodos de laboratorio de micobacteriologia veterinaria para el aislamiento e identificacion de micobacterias**. Buenos Aires: CPZ, 1973. 48p. (Série de monografias científicas y técnicas, 6).

Collins J. D. Tuberculosis in cattle: new perspectives. **Tuberculosis**, v 81, p. 17-21, 2001.

- COLLINS, J. D. Tuberculosis in cattle: strategic planning for the future. Amsterdam, **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 369-381, 2006.
- CORNER, L.A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Amsterdam, **Veterinary Microbiology**, v.40, n.1-2, p.53-63, 1994.
- COSTA, A. C. F.; SILVA, N. S.; ROCHA, V. C. M.; ROSALES-RODRIGUES, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; MOREIRA, E.L.T.; MADRUGA, C. R.; ARRUDA, S. M.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA. M. C. A.; OLIVEIRA, E. M. D. Tipificação genética, através da técnica de spoligotyping, de isolados de *Mycobacterium bovis* em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, p. 233-237, 2010.
- COSTA, L. B. **Caracterização da tuberculose bovina em regiões de relevância econômica no Estado da Bahia**.2012. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2012.
- FERREIRA NETO, J.S; BERNARDI, F. O controle da tuberculose bovina. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n.47, p. 9-13, 1997.
- KANTOR, I. N.; RITACCO, V. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 112, p. 111-118, 2006.
- LILENBAUM, W. Atualização em tuberculose bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, p. 145-151, 2000.
- MONTEIRO, P. H. T.; MARTINS, M. C.; UEKI, S. Y. M.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; TELLES, M. A. S. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of *mycobacterium tuberculosis* complex. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 171-174, 2003.
- MOTA, P. M. P. C.; LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; LAGE, A. P.; PARREIRAS, P. M. Isolamento de *Mycobacterium bovis* em cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.4, 2001.
- OLIVEIRA, I. A. S.; MELO, H. P. C.; CAMARA, A.; DIAS, R. V. C.; SOTO-BLANCO, B. Prevalência de tuberculose no rebanho bovino de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 395-400, 2007.
- O'REILLY, L. M.; DABORN, C. J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, Avenel, v. 76, p. 1-46, 1995.
- PACHECO, A. M.; HAMZÈ, A. L.; AVANZA, M. F. B.; PEREIRA, D. M.; PEREIRA, R. E. P.; CIPRIANO, R. S.; LOT, R. F. S. TUBERCULOSE BOVINA – RELATO DE CASO. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, Ano VII, n. 13, Julho de 2009.
- PINTO, P. S. A.; FARIA, J. E.; VILORIA, M. I. V.; BEVILACCQUA, P. D. Exame microbiológico da tuberculose como subsídio à inspeção *post-mortem* de bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 3, n.1, p. 10-15, 2002.
- PRITCHARD, D.G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **Journal of Comparative Pathology**, v.99, p.357-399, 1998.
- RODRIGUES, C. A.; MEDEIROS, E.; MELLO, G. C.; FAVARO, M. R.; ZAPPA, V. Controle da tuberculose bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, Ano VI, n. 11, julho 2008.
- RODRIGUEZ, C.A.R.; ZUMÁRRAGA, M.J.; OLIVEIRA, E.M.D.; CATALDI, A.A.; ROMANO, M.I.; OTTO, H.H.; BONAFÉ, V.L.; FERREIRA NETO, J.S. Caracterização molecular de isolados de

Mycobacterium bovis do Estado de São Paulo Brasil, utilizando a técnica de *spoligotyping*. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.3, p.277-282, 2004.

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

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

VARELLO, K.; PEZZOLATO, M.; MASCARINO, D.; INGRAVALLE, F.; CARAMELLI, M.; BOZZETTA, E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.20, n.2, p.164-169, 2008.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2009**. Disponível em:< <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>>. Acesso em: 23 Novembro 2009.

Agradecimento ao CNPq, por ter possibilitado e financiado esta pesquisa.