

Diagnóstico histopatológico e molecular de lesões sugestivas de tuberculose em búfalos abatidos nos municípios de Macapá e Santana, estado do Amapá¹

Juliana Daniele B. Pereira², Valiria D. Cerqueira², Pedro S. Bezerra Junior², Daniella K. Oliveira Bezerra², Flávio R. Araújo³, Adriana de Cássia L. Dias², Cristina P. Araújo⁴ e Gabriela Riet-Correa^{2*}

ABSTRACT.- Pereira J.D.B., Cerqueira V.D., Bezerra Júnior P.S., Oliveira Bezerra D.K., Araújo F.R., Dias A.C.L., Araújo C.P. & Riet-Correa G. 2017. [Histopathological and molecular diagnosis of lesions suggestive of tuberculosis in buffaloes slaughtered in the municipalities of Macapá and Santana, Amapá state, Brazil.] Diagnóstico histopatológico e molecular de lesões sugestivas de tuberculose em búfalos abatidos nos municípios de Macapá e Santana, estado do Amapá. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37(11):1198-1204. Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa 1, Bairro Guamá, Castanhal, PA 66075-110, Brazil. E-mail: gabrielariet@pq.cnpq.br

This study aimed to evaluate suggestive lesions of tuberculosis in buffaloes slaughtered in official slaughterhouses in the State of Amapá, Brazil, in order to confirm the diagnosis of tuberculosis by histopathological and molecular evaluation. Tissue samples of 20 buffaloes showing lesions suggestive of tuberculosis, from the municipalities of Macapá and Santana, were collected. The samples were divided into two parts: one was fixed in 10% buffered formalin and routinely processed for histopathological evaluation, stained by hematoxylin-eosin and Ziehl-Neelsen; and the other was used for Nested-PCRs for *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and for *Mycobacterium bovis*. Gross lesions suggestive of tuberculosis were observed in the lungs, bronchial, mediastinic, retropharyngeal and submandibular lymph nodes, liver and pleura. Histopathologically, all samples showed lesions suggestive of tuberculosis, characterized by granulomas composed of large amount of infiltration of epithelioid cells, Langhans cells and lymphocytes, bordering a necrotic core, calcified or not, surrounded by a fibrous connective tissue capsule. Acid-fast bacilli were observed in the tissues of 3/20 (15%) buffaloes. With regards to the molecular detection, 13/20 (65%) buffaloes showed positive tissue samples: 6 were positive both in the MTC and *M. bovis* Nested-PCRs, one was positive only in the MTC Nested-PCR, and 6 were positive only in the *M. bovis* Nested-PCR. The results of this study demonstrate the importance of diagnosing TB in buffaloes in the region and point to the requirement to implement effective measures to control and eradicate the disease.

INDEX TERMS: Histopathology, tuberculosis, buffaloes, Amapá, Brazil, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* complex, Nested-PCR.

¹ Recebido em 20 de maio de 2016.

Aceito para publicação em 31 de janeiro de 2017.

² Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa 1, Bairro Guamá, Castanhal, PA 66075-110, Brasil. *Autor para correspondência: gabrielariet@pq.cnpq.br

³ Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia 830, Zona Rural, Campo Grande, MS 79106-550, Brasil.

⁴ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva s/n, Cidade Universitária, Campo Grande, MS 79070-900.

RESUMO.- Este estudo teve como objetivo avaliar lesões sugestivas de tuberculose em búfalos abatidos em matadouros oficiais no Estado do Amapá, Brasil, a fim de confirmar o diagnóstico de tuberculose por avaliação histopatológica e molecular. As amostras de tecido de 20 búfalos que apresentavam lesões sugestivas de tuberculose, dos municípios de Macapá e Santana, foram coletadas. As amostras foram divididas em duas partes: uma delas foi fixada em formalina a 10% tamponada e rotineiramente

processadas para avaliação histopatológica, coradas pela hematoxilina-eosina e Ziehl-Neelsen; e a outra parte foi usado para *Nested-PCR* para o complexo de *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) e para *Mycobacterium bovis*. As lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose foram observadas nos pulmões, linfonodos brônquicos, mediastínicos, retrofaríngeos e submandibulares, fígado e pleura. Histopatologicamente, todas as amostras apresentaram lesões sugestivas de tuberculose, caracterizadas por granulomas compostos por grande quantidade de infiltração de células epitelióides, células de Langerhans e linfócitos, margeando um centro necrótico, calcificado ou não, rodeado por cápsula de tecido conjuntivo fibroso. Bacilos álcool-ácido resistentes foram observados nos tecidos de 3/20 (15%) búfalos. Com relação à detecção molecular, 13/20 (65%) bubalinos apresentaram amostras de tecidos positivos: 6 foram positivos nas *Nested-PCRs* para CMT e *M. bovis*, um foi positivo apenas na *Nested-PCR* para CMT, e 6 foram positivos apenas na *Nested-PCR* para *M. bovis*. Os resultados deste estudo demonstram a importância de diagnosticar a tuberculose em búfalos na região e apontam para a necessidade de implementar medidas eficazes para controlar e erradicar a enfermidade.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Histopatologia, tuberculose, búfalos, Amapá, bubalinos, *Mycobacterium bovis*, histopatologia, Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *Nested-PCR*.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma enfermidade de distribuição mundial, causada por bactérias Gram-positivas, pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). Os integrantes deste grupo exibem 99,9% de similaridade genética com variantes adaptadas a humanos, espécies domésticas e animais selvagens, possuindo diversos hospedeiros e graus de patogenicidade (Dos Vultos et al. 2008). O CMT inclui *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* subtipos I e II, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti* (Brosch et al. 2002), *Mycobacterium caprae* (Cvetnic et al. 2007), *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium pinnipedii* (Van Ingen et al. 2012), *Mycobacterium mungi* (Alexander et al. 2010) e *Mycobacterium suricattae* (Parsons et al. 2013).

Mycobacterium bovis causa enfermidade crônica debilitante em bovinos e bubalinos, diminuição dos índices produtivos, redução de 10 a 20% na produção leiteira, menor ganho de peso, infertilidade, descarte de animais, condenação de carcaças em abatedouros (Brasil 2006, Riet-Correa & Garcia 2006), além de perdas econômicas mundiais estimadas em três bilhões de dólares ao ano (Garnier et al. 2003).

A enfermidade ainda requer maiores estudos na espécie bubalina, especialmente na região norte do Brasil. No estado do Pará, registrou-se prevalência de 3,5 % em búfalos criados em municípios do Arquipélago do Marajó e ainda 7,2% de bubalinos positivos em outros nove municípios paraenses (Barbosa et al. 2014). No estado do Amapá, que concentra o segundo maior rebanho bubalino do país, superior a 285.000 cabeças (IBGE 2014), há registros frequentes de condenações por lesões sugestivas de tubercu-

lose em estabelecimentos oficiais de abate. Contudo, não há dados oficiais sobre a real condição sanitária do rebanho amapaense, o que contribui para a desvalorização da pecuária local e gera riscos à saúde pública, demonstrando a necessidade de estudos diagnósticos que visem confirmar a ocorrência de tuberculose por *M. bovis* em búfalos abatidos para consumo.

O presente trabalho objetivou avaliar lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos abatidos em matadouros oficiais, nos municípios de Macapá e Santana, estado do Amapá, a fim de confirmar o diagnóstico de tuberculose, mediante avaliação histopatológica e molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se coleta de tecidos apresentando lesões sugestivas de tuberculose de búfalos abatidos para consumo em dois estabelecimentos de abate fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE) do estado do Amapá, entre maio e agosto/2011 e durante outubro/2011, em matadouros localizados nas cidades de Macapá e Santana, respectivamente. No referido período, foram inspecionados 5.350 bubalinos, dos quais 2.630 em Macapá e 2.720 em Santana, registrando-se 28 condenações totais devido a lesões sugestivas de tuberculose, sendo coletados tecidos de 20 animais. Alguns bubalinos apresentavam lesões em diferentes órgãos, ocorrendo variação quanto ao número de tecido coletado por indivíduo (Quadro 1), totalizando 34 amostras. Os bubalinos

Quadro 1. Avaliação histopatológica e molecular por tecido coletado em búfalos apresentando lesões sugestivas de tuberculose, abatidos em Macapá e Santana (AP)

Identificação	Búfalo	Tecido	HE	Ziehl-Neelsen	Nested-PCR	
					CMT	<i>M. bovis</i>
255/11	1	P, F	LST	BAAR não observado	Neg	Neg
270/11	2	LM	LST	BAAR não observado	Pos	Pos
	P			Neg	Neg	Neg
263/11	3	LM	LST	BAAR não observado	Neg	Pos
274/11	4	LR	LST	BAAR não observado	Neg	Pos
		LM, LS, P			Pos	Pos
		F			Neg	Neg
268/11	5	P	LST	BAAR não observado	Pos	Pos
273/11	6	P	LST	BAAR não observado	Pos	Pos
		F			Neg	Pos
275/11	7	LM, P	LST	BAAR	Pos	Pos
283/11	8	LB	LST	BAAR não observado	Neg	Neg
282/11	9	P	LST	BAAR não observado	Neg	Neg
280/11	10	LB	LST	NR	Neg	Neg
277/11	11	LB	LST	BAAR	Neg	Pos
256/11	12	LB	LST	BAAR não observado	Neg	Pos
264/11	13	PL, P	LST	BAAR não observado	Neg	Pos
265/11	14	P, PL	LST	BAAR não observado	Neg	Neg
		F		BAAR	Neg	Neg
276/11	15	LB, P	LST	BAAR não observado	Neg	Pos
		F			Neg	Neg
262/11	16	LS	LST	NR	Pos	Neg
259/11	17	LM	LST	BAAR não observado	Neg	Neg
260/11	18	P	LST	BAAR não observado	Pos	Pos
279/11	19	LI	LST	BAAR não observado	Neg	Neg
281/11	20	LB	LST	BAAR não observado	Neg	Neg
		P			Neg	Pos

HE = Hematoxilina-eosina, LCT = Lesão sugestivas de tuberculose, CMT = Complexo *Mycobacterium tuberculosis*; NR = Não realizado, P= pulmão, PL = Pleura, F = Fígado, LM = Linfonodo mediastínico, LB = Linfonodo bronquial, LS = Linfonodo submandibular, LR = Linfonodo retrofaríngeo, LI = Linfonodo ilíaco.

avaliados não revelavam sinais clínicos associados à tuberculose durante exame visual *ante-mortem*, desconhecendo-se histórico de tuberculinização, condição sanitária dos rebanhos e origem exata de alguns animais.

As amostras coletadas foram divididas em duas porções. Uma foi fixada em formol tamponado a 10% e processada rotineiramente para avaliação histopatológica, sendo realizadas colorações de hematoxilina-eosina e Ziehl-Neelsen. O fragmento restante foi congelado e enviado à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Corte, Mato Grosso do Sul para execução do diagnóstico molecular. A realização de exame histopatológico não foi possível em um bubalino, devido à falha no processo de fixação da amostra.

A extração de DNA dos tecidos foi feita a partir de fragmentos de 100mg, abrangendo a região de transição entre lesão e tecido visualmente saudável, utilizando-se *kit* comercial DNEasy Blood & Tissue (Qiagen).

As amplificações de DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* ocorreram por meio de *Nested*-PCR, empregando-se *primers* e sondas para a o gene *rv2807*, que codifica pra uma proteína hipotética conservada daquele complexo, segundo Araújo et al. (2014a). Para *Mycobacterium bovis*, foram empregados *primers* e sondas para a região TbD1, segundo Araújo et al. (2014b). Esta região compreende o gene *mmpS6*, que codifica para uma provável proteína conservada de membrana, e a região 5' do gene *mmpL6*. TbD1 está presente em *M. bovis* (incluindo cepas de BCG), *Mycobacterium africanum*, *M. canettii* e ausente em isolados modernos de *M. tuberculosis* (Brosch et al. 2002, Mostowy et al. 2005, Lahlou et al. 2012).

As reações de *Nested*-PCR ocorreram em duas etapas. Inicialmente, foram feitas amplificações dos dois alvos citados por PCR convencional. Em seguida, realizou-se PCR em tempo real, utilizando-se os produtos das reações de PCR convencional como molde, e *primers* e sondas delimitando um produto menor, segundo Araújo et al. (2014a) e Araújo et al. (2014b).

PCR convencional. Para o complexo *M. tuberculosis*, foram utilizados os *primers forward* externo MTC: 5'-GGCGGTGGCG-GAGTTGAAGGCGATGAG-3' e *reverse* externo MTC: 5'-GCCGCGAG-CGAGTCTGGGCGATGTC-3', que delimitam um fragmento de 443 pares de bases (pb) de *rv2807*. Para *M. bovis*, foram utilizados os *primers forward* externo Mb: 5'-GTGGCGGTGCGGGATTGAG-CGTCTAT-3' e *reverse* externo Mb: 5'-TTATGGCGGCCACCCACC-CAAAACAG-3', que delimitam um fragmento de 474pb da região *TbD1*.

As reações para os dois alvos foram feitas separadamente em volume de 25uL, contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50uM de KCl; 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de cada dNTP; 7,5pmol de cada *primer*; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Sigma) e 400ng de DNA. As reações de amplificação foram feitas de termociclador MJ Mini Bio-Rad, para ambos os alvos, com o seguinte esquema: desnaturação inicial a 95°C por 4 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 90 seg, anelamento a 65°C por 30 seg, e extensão a 72°C por 45 seg. Uma etapa de extensão final a 72°C foi feita por 3 min.

PCR em tempo real (qPCR). Para o complexo *M. tuberculosis*, foram utilizados os *primers forward* interno MTC: 5'-CAT-TGCTGCGTAATTTCGATCA-3' e *reverse* interno MTC: 5'-GACCT-TGGGCGCCTCAT-3'; e a sonda MTC: 6FAM-CATCCACACCTGTTCG-MGBNFQ, que delimitam um fragmento de 56pb. Para *M. bovis*, foram utilizados os *primers forward* interno Mb: 5'-GCGG-TCTTCGCCAATGTT-3' e *reverse* interno Mb: 5'-GCAGCCGATGGA-ATTGCT-3'; e a sonda Mb: 6FAM-CGCGCAAGGCGA-MGBNFQ, que delimitam um fragmento de 51pb.

As reações de qPCR para os dois alvos foram feitas separadamente em volume de 12,5uL, contendo 6,25uL de *TaqMan Master*

Mix (ref 4352042, Applied Biosystems); 600nM de cada *primer*; 100nM de sonda e 3uL da reação de PCR convencional.

As reações de amplificações de qPCR foram realizadas em termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA). Para ambos os alvos, a desnaturação inicial foi realizada a 95°C durante 10 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 seg e anelamento/extensão a 62°C durante 30 seg.

Para todas as reações de PCR para *rv2807*, utilizou-se DNA de *M. bovis* cepa AN5 e de *M. tuberculosis* cepa H37Rv como controles positivos. Para todas as reações de PCR para TbD1, utilizou-se DNA de *M. bovis* cepa AN5 como controle positivo. Reações sem DNA foram usadas como controles negativos. Para teste de inibição de PCR, as amostras negativas foram inoculadas com 1uL de DNA de *M. bovis* cepa AN5 e testadas novamente.

RESULTADOS

Durante a inspeção das carcaças dos bubalinos nos mata-douros, foram observadas lesões sugestivas de tuberculose em pulmões, linfonodos mediastínicos, bronquiais, submandibulares e retrofaríngeos, fígado e pleura. Lesões pulmonares foram identificadas em 16 búfalos, caracterizadas mais frequentemente por nódulos firmes, esbranquiçados, encapsulados, de 2-3cm de diâmetro, preenchidos por material caseoso, com ou sem mineralização central, distribuídos bilateralmente. Os animais 5 e 9 apresentavam lesões pulmonares de até 15cm de diâmetro. Lesões em linfonodos mediastínicos foram observadas em oito búfalos. Essas lesões alcançavam até 10cm de comprimento, mostrando calcificação. Em dois búfalos, verificaram-se múltiplos nódulos esbranquiçados, de 1-2cm de diâmetro, firmes e encapsulados distribuídos na superfície pleural. Nos animais em que os linfonodos bronquiais estavam afetados, em cinco deles havia lesões pulmonares. No fígado, foram observadas lesões em cinco indivíduos. Um búfalo apresentava lesão hepática caseosa, única, associada a lesões nos linfonodos da cabeça, trato respiratório e comprometimento de linfonodos hepáticos. Apresentava, ainda, nódulos de 6-8cm de diâmetro, firmes, encapsulados, mineralizados centralmente, acometendo bilateralmente os linfonodos retrofaríngeos. Lesões múltiplas no parênquima hepático, de tamanho variável, foram observadas em outros sete animais. Em linfonodos submandibulares foram vistas lesões nodulares em dois bubalinos. Um búfalo apresentava linfonodos ilíacos aumentados de volume e preenchidos por material caseoso.

Na histopatologia, todas as amostras avaliadas apresentavam lesões sugestivas de tuberculose, caracterizadas por granulomas compostos por um centro necrótico, calcificado ou não, margeado por infiltrado de células epitelióides, células gigantes tipo Langhans e linfócitos. Estas áreas eram rodeadas por cápsula de tecido conjuntivo fibroso. Na coloração de Ziehl-Neelsen, havia bacilos álcool-ácido resistentes em quatro amostras, pertencentes a três animais.

Em 13 dos 20 bubalinos (65%) ocorreu amplificação nas amostras de tecidos para CMT e/ou *Mycobacterium bovis*, por meio das *Nested*-PCRs. Destes, houve amplificação nas *Nested*-PCRs para CMT e *M. bovis* em tecidos de 6 animais; apenas para CMT nos tecidos de um animal; e apenas para *M. bovis* em 6 búfalos.

O Quadro 1 apresenta as amostras coletadas de cada animal e os resultados das avaliações histopatológicas e moleculares.

DISCUSSÃO

Lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose foram encontradas com maior frequência nos pulmões (80%), linfonodos mediastínicos (40%) e bronquiais (30%), sugerindo a via respiratória como principal rota de transmissão nos bubalinos, devido à localização do complexo primário. A tuberculose pulmonar observada na maioria dos bubalinos do presente estudo é relatada como a forma mais comum da doença em búfalos (Freitas et al. 2001, Laisse et al. 2011). De forma semelhante, Albernaz et al. (2015) observaram lesões sugestivas de tuberculose em linfonodos mediastínicos, além de achados macroscópicos em linfonodos mesentéricos de bubalinos. Em bovinos, a maioria dos achados macroscópicos localizam-se nos linfonodos respiratórios, parênquima pulmonar, linfonodos da cabeça e mediastínicos (Corner 1994, Whipple et al. 1996, Proaño-Pérez et al. 2011, Alzamora Filho et al. 2014a, Alzamora Filho et al. 2014b).

As lesões histológicas foram semelhantes às observadas por Kanameda & Ekgat (1995), Laisse et al. (2011), Albernaz et al. (2015) na tuberculose bubalina, mantendo grande similaridade aos granulomas tuberculosos descritos na espécie bovina (Cancela & Marín 1993, Cassidy et al. 1999, Wangoo et al. 2005, Watrelot-Virieux et al. 2006, Varello et al. 2008). A detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em somente três búfalos demonstra a baixa sensibilidade da técnica, uma vez que 13 animais apresentaram resultados positivos nas técnicas de *Nested*-PCR. A baixa sensibilidade da coloração de Ziehl-Neelsen é relatada em bubalinos (Garine-Wichatitsky et al. 2010, Laisse et al. 2011) e em bovinos (Cancela & Marín 1993, Sulieman & Hamid 2002, Watrelot-Virieux et al. 2006). Um animal que apresentava BAAR foi negativo aos testes moleculares. Sabe-se que a sensibilidade das técnicas de PCR pode ser afetada pela presença de inibidores e pela quantidade de DNA na amostra clínica (Cardoso et al. 2009), porém, neste estudo, a presença de inibidores foi testada.

A utilização das técnicas de *Nested*-PCR possibilitou confirmar a infecção por micobactérias do CMT e/ou *Mycobacterium bovis* em 13 (65%) animais. Estes resultados se assemelham aos obtidos por Araújo et al. (2014b), nos quais a detecção direta de *M. bovis* em lesões sugestivas de tuberculose em bovinos e bubalinos, previamente reagentes ao teste tuberculínico intradérmico comparativo, alcançou sensibilidade clínica de 76% e especificidade de 100%. Em outro estudo, a identificação do CMT em tecidos bovinos e bubalinos, por meio de *Nested*-PCR, alcançou sensibilidade clínica de 76,7% e especificidade máxima (100%), índices superiores à PCR convencional e cultura (Araújo et al. 2014a). Percentuais superiores aos descritos por Laisse et al. (2011), que encontraram 42,1% (8/19) de positivos para *M. bovis* em búfalos africanos empregando *kit* comercial de amplificação simultânea para CMT e CMA.

Em bovinos reagentes à tuberculinização, Figueiredo et al. (2009) identificaram *M. bovis* em 88,24% (15/17) das

amostras, utilizando dois pares de *primers* específicos para *M. bovis* e *M. tuberculosis*, por meio de PCR múltipla. Parra et al. (2008), desenvolvendo sistema de PCR múltipla em tempo real, diretamente de amostras biológicas, obtiveram taxas de sensibilidade variando de 61,11% (lesões não visíveis) até 80,64% para lesões tuberculosas crônicas, permitindo a diferenciação entre membros do CMA e outras micobactérias não-tuberculosas. Furlanetto et al. (2012), empregando PCR-múltipla diretamente em fragmentos de tecido, detectaram presença de *M. bovis* em 7% (14/182) das lesões, mostrando maior sensibilidade do teste molecular comparado a análise microbiológica (1,5%). De forma semelhante, Zanini et al. (2001) encontraram 70,3% (38) de positivos para *M. bovis*, contra 42,6% de positivos ao isolamento, sendo que todas as amostras positivas pelo isolamento foram identificadas por PCR, destacando-se a sensibilidade do método molecular e vantagem da realização em curto período de tempo (24h). Araújo et al. (2005), analisando lesões sugestivas de tuberculose em bovinos, obtiveram 17 (23,65%) amostras positivas na cultura em meio Stonebrink, confirmando a presença de *M. bovis* em 13 (76,5%) amostras através de avaliação molecular por PCR. A eficiência da técnica de *Nested* q-PCR na detecção de CMT diretamente em tecidos bovinos foi descrita por Carvalho et al. (2015), em que 28% (56/198) das amostras mostraram positividade, superando os testes de Multiplex-PCR (14/98) e cultura (3/1998). Contudo, em bovinos, Proaño-Pérez et al. (2011) obtiveram baixo índice de positividade por meio de *Nested*-PCR 27,33% (9/33), contra 36,4% de isolamento de *M. bovis*. Fator este possivelmente relacionado ao volume e diluição de DNA empregados no referido estudo ou à quantidade de bacilos na amostra, uma vez que a sensibilidade de sistemas de PCR no diagnóstico de *M. bovis* encontra-se diretamente ligado a este fator (Collins 2011).

Reddington et al. (2011) relatam 100% de especificidade para PCR múltipla em tempo real (m-PCR) na identificação e diferenciação simultânea de micobactérias zoonóticas (*M. bovis*, *M. bovis* BCG e *M. caprae*) em bovinos. Shah et al. (2002) também destacam a importância da utilização da m-PCR associada a técnicas microscópicas para identificação e diagnóstico diferencial da tuberculose. Asil et al. (2013) ressaltam a utilidade da PCR associada a técnicas microscópicas, no sentido de aumentar a sensibilidade e facilitar o diagnóstico diferencial entre micobacterioses e outras doenças que produzem lesões semelhantes em bovinos.

Em um bubalino do presente estudo a reação de *Nested*-PCR foi positiva apenas na *Nested*-PCR para CMT. Tal fato pode refletir diferenças nas sensibilidades das *Nested*-PCRs para *rv2807* e TbD1. Lesões tuberculosas provocadas por *M. caprae* já foram descritas em bovinos e outras espécies domésticas (Cvetnic et al. 2007, Rodriguez et al. 2011). No entanto, não houve similaridade significativa entre as sequências dos *primers* e sondas para TbD1 e para *rv2807* com o genoma de *M. caprae* (ID: 16339) no Blastn do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Além disso, *M. caprae* é primariamente restrito a países da Europa (Proding et al. 2014). Dessa forma, a primeira hipótese é mais plausível.

A infecção por micobactérias não foi confirmada em 7 dos 20 bubalinos. As lesões observadas poderiam estar relacionadas a outros agentes bacterianos, como *Rhodococcus equi* (Flynn et al. 2001), *Corynebacterium* spp. (Muller et al. 2011), *Nocardia* sp. (Suliman & Hamid 2002), *Streptococcus* spp., ou serem decorrentes de micobacterioses atípicas, capazes de interferir em sistemas de PCR pouco sensíveis (Sahraoui et al. 2009, Thacker et al. 2011). Outra possibilidade seria a falha de sensibilidade das técnicas de *Nested-PCR*, uma vez que o diagnóstico diretamente em tecidos tem apresentado sensibilidade clínica média de até 75% (Araújo et al. 2014a, Araújo et al. 2014b).

No presente estudo, a identificação de *M. bovis* em bubalinos abatidos para consumo, associada à desconhecida condição sanitária do rebanho amapaense e falhas no controle de trânsito de animais, representam possibilidade real de transmissão de tuberculose zoonótica às pessoas que mantiverem contato com estes animais e/ou participarem do abate e beneficiamento da carne, trabalhadores rurais, tratadores e ordenadores (Pinto 2003, De Kantor et al. 2008). No México, casos ocupacionais de tuberculose latente e ativa causada por *M. bovis* alcançaram média de 72,6%, evidenciando elevado risco de infecção em indivíduos expostos ao contato direto com animais infectados, principalmente em ambientes dotados de pouca ventilação (Torres-Gonzales et al. 2013).

Sauret et al. (1992) registraram dez (10) casos humanos de tuberculose zoonótica entre 1986-1990, possivelmente relacionados a fatores ocupacionais. Para Thoen et al. (2006), casos ocupacionais de tuberculose pulmonar continuam surgindo, com 12 ocorrências na América Latina ocasionadas por *M. bovis* dentre 1966-2005. Estes números podem ser superiores, uma vez que a tuberculose relacionada ao bacilo bovino é clinicamente, radiograficamente e histopatologicamente indistinguível da enfermidade por *M. tuberculosis*, possivelmente incorrendo em subnotificação de tuberculose humana por *M. bovis* (Moda et al. 1996, Pérez Lago et al. 2014). Deve-se considerar, ainda, a possibilidade de transmissão da tuberculose zoonótica entre pessoas, inclusive entre pacientes imunocompetentes (Sunder et al. 2009, Etchechoury et al. 2010). Entre 1994-2005, dados retrospectivos de San Diego (EUA), mostraram que infecções por *M. bovis* corresponderam a 45% dos casos de tuberculose em crianças e 6% dos casos em adultos, oferecendo risco de morte ao longo do tratamento 2,55 vezes maior em comparação a *M. tuberculosis* (Rodwell et al. 2008).

Hábitos regionais relacionados ao consumo de leite cru e derivados oriundos de vacas com mastite tuberculosa, sem sinais clínicos visíveis, ou nunca testadas com antígenos tuberculínicos, expõem maior número de pessoas ao desenvolvimento de formas extrapulmonares de tuberculose. Casos humanos de tuberculose por ingestão de leite, chamada escrófula, são amplamente citados na literatura (Moda et al. 1996, Cosivi et al. 1998, Thoen et al. 2006, Doran et al. 2009) e a confirmação de *M. bovis* em amostras de leite através de testes moleculares (PCR) torna possível a rápida detecção do agente e aplicação de medidas de controle e erradicação da enfermidade em rebanhos infectados (Akhtar et al. 2015, Cezar et al. 2016).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram a importância em diagnosticar a tuberculose em búfalos na região e apontam para a necessidade de implantação de medidas efetivas de controle e erradicação da enfermidade nos rebanhos amapaenses, a fim de evitar maior disseminação da doença nesta espécie, evitando ainda o surgimento de casos humanos de tuberculose pulmonar e extrapulmonar de origem zoonótica.

Agradecimentos.- Aos médicos veterinários e técnicos da Agência de Defesa e Inspeção Agropecuária do Amapá, Serviço de Inspeção Estadual, pelo auxílio na coleta de amostras de lesões sugestivas de tuberculose em bubalinos.

REFERÊNCIAS

- Akhtar F., Javed M.T., Rehman A., Khan M. N., Akhtar P., Hussain S. M., Aslam M. S., Kausar R., Qamar M. & Cagiola M. 2015. The use of PCR technique in the identification in cattle and buffaloes in Pakistan. *Trop. Anim. Health Prod.* 47:1169-1175.
- Albernaz T.T., Oliveira C.M.C., Lima D.H., Silva N.S., Cardoso D.P., Lopes C.T.A., Brito M.F., Silva J.B., Salvarani F.M., Leite R.C. & Barbosa J.D. 2015. Comparison of the tuberculin test, histopathological examination, and bacterial culture for the diagnosis of tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in buffaloes (*Bubbalus bubalis*) in Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 47:1153-1159.
- Alexander K.A., Laver P.N., Michel A.L., Williams M., Van Helden P., Warren R.M. & Van Pittius N.C.G. 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg. Infect. Dis.* 16:1296-1299.
- Alzamora Filho F., Reis V.M., Fehlberg I., Alcântara A.C., Cavalcante M.P., Rocha V.C.F. & Costa J.N. 2014a. Identificação de *Mycobacterium bovis* em carcaças de bovinos abatidos no estado da Bahia, Brasil, por métodos bacteriológico e molecular. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66:1585-1591.
- Alzamora Filho F., Vasconcellos S.E.G., Gomes H.M., Cavalcante M.P., Suffys P.N. & Costa J.N. 2014b. Múltiplas estirpes de isolados de *Mycobacterium bovis* identificados por tipagem molecular em bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos. *Pesq. Vet. Bras.* 34:103-108.
- Araújo C.P., Leite C.Q.F., Prince K.A., Jorge K.S. & Osório A.L.A.R. 2005. *Mycobacterium bovis* infection by a molecular method from *post-mortem* inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100:749-752.
- Araújo C.P., Osório A.L.A.R., Jorge K.G., Ramos C.A.N., Souza Filho A.F., Vidal C.E.S., Vargas A.G.P., Roxo E., Rocha A.S., Suffys P.N., Fonseca Junior A.A., Silva M.R., Barbosa Neto J.D., Cerqueira V.D. & Araújo F.R. 2014a. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through *nested-PCR*. *Braz. J. Microbiol.* 45:633-640.
- Araújo C.P., Osório A.L.A.R., Jorge K.S.G., Ramos C.A.N., Filho F.S., Vidal C.E.S., Roxo E., Nishibe C., Almeida N.F., Junior A.A. F., Silva M.R., Neto J.D.B., Cerqueira V.D., Zumárraga M.J. & Araújo F.R. 2014b. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using *nested-PCR* for TbD1. *Plos One* 9:1-6.
- Asil T.A., Sanousi S.M., Gameel A., El Beir H., Fatheiraman M., Terab N.M., Muaz M.A. & Hamid M.E. 2013. Bovine tuberculosis in South Darfur State, Sudan: an abattoir study based on microscopy and molecular detection methods. *Trop. Anim. Health Prod.* 45:469-472.
- Barbosa J.D., Silva J.B., Rangel C.P., Fonseca A.H., Silva N.S., Bomjardim H.A. & Freitas N.F.Q.R. 2014. Tuberculosis prevalence and risk factors for water buffalo in Pará, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 46:513-517.
- Brasil 2006. Manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília. 190p.
- 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 Soolingen D. & Cole S.T. 2002. A new evolutionary

- scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc. Natl Acad. Sci. USA 99:3684-3689.
- Cancela M.M.G. & Marín J.F.G. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. 1993. J. Comp. Pathol. 109:361-370.
- Cardoso M.A., Cardoso R.F., Hirata R.D., Hirata M.H., Leite C.Q., Santos A.C., Siqueira V.L., Okano W., Rocha N.S. & Lonardoni M.V. 2009. Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. Zoonoses Public Health 56:465-470.
- Carvalho R.C.T., Furlanetto L.V., Maruyama F.H., Araújo C.P., Barros S.L.B., Ramos C.A.N., Dutra V., Araújo F.R., Paschoalin V.M.F., Nakazato L. & Figueiredo E.E.S. 2015. Evaluation of the efficiency of Nested q-PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from tuberculous-suspected lesions in *post-mortem* macroscopic inspections of bovine carcasses slaughtered in the state of Mato Grosso, Brazil. Meat Science 106:11-15.
- Cassidy J.P., Bryson D.G., Pollock J.M., Evans R.T., Forster F. & Neill S.D. 1999. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. J. Comp. Pathol. 121:321-337.
- Cezar R.D.S., Lucena-Silva L., Filho F.B.B., Borges J.M., Oliveira P.R.F., Lúcio E.C., Arruda-Lima M., Santana V.L.A. & Junior J.W.P. 2016. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* in cattle herds of the state of Pernambuco, Brazil. BMC Vet. Res. 12:31.
- Collins D.M. 2011. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 151:2-7.
- Corner L.A. 1994. *Post-mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40:53-63.
- Cosivi O., Grange J.M., Dabom C.J., Raiglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., De Kantor I. & Meslin F.X. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg. Infect. Dis. 4:59-70.
- Cvetnic Z., Jankovi-Katalinic V., Sostanic B., Spicic S., Obrovac M., Marjanovic S., Benic M., Kirin B.K. & Vickovic I. 2007. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 11:652-658.
- De Kantor I.N., Paolichi F., Bernardelli A., Torres P.M., Canal A., Lobo J.R., Almeida M.A.Z., Noack L.A.P., López J.F., Garín A., Insaurrealde A.L., Boschiroli-Cara M.L., Cataldi A. & Ambroggi M. 2008. La tuberculosis bovina em América Latina. Situación actual y recomendaciones. III Congreso Latinoamericano de Zoonosis, OIE, Buenos Aires, Argentina.
- Doran P., Carson J., Costello E. & More S.J. 2009. An outbreak of tuberculosis affecting cattle and people on an Irish dairy farm, following the consumption of raw milk. 2009. Ir. Vet. J. 62:390-397.
- Dos Vultos T., Mestre O., Rauzier J., Golec M., Rastogi N., Rasolofo V., Tonjum T., Sola C., Matic I. & Gicquel B. 2008. Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 3:e1538.
- Etchechoury I., Echeverría Valencia G., Morcillo N., Sequeira M.D., Imperia B., Lopez M., Caimi K., Zumarraga M.J., Cataldi A. & Romano M.I. 2010. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. Zoonoses Publ. Health 57:375-381.
- Figueiredo E.E.S., Silvestre F.G., Campos W.M., Furlanetto L.V., Medeiros L., Lilenbaum W., Fonseca L.S., Silva J.T. & Paschoalin V.M.F. 2009. Identification of *Mycobacterium bovis* isolates by a multiplex PCR. Braz. J. Microbiol. 40:231-233.
- Flynn O., Quigley F., Costello E., O'Grady D., Gogarty A., McGuirk J. & Takai S. 2001. Virulence-associated protein characterisation of *Rhodococcus equi* isolated from bovine lymph nodes. Vet. Microbiol. 78:221-228.
- Freitas J.A., Guerra J.L. & Panetta J.C. 2001. Características da tuberculose observada em búfalos para consumo: aspectos patológicos e identificação de micobactérias. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38:170-176.
- Furlanetto L.V., Figueiredo E.E.S., Conte Júnior C.A., Carvalho R.C.T., Silva F.G.S., Silva J.T., Lilenbaum W. & Paschoalin V.M.F. 2012. Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. Pesq. Vet. Bras. 32:1138-1144.
- Garine-Wichatitsky M., Caron A., Gomo C., Foggin C., Dutlow K., Pfukenyi D., Lane E., Le Bel S., Hofmeyr M., Hlokwé T. & Michel A. 2010. Bovine tuberculosis in buffaloes, Southern Africa. Emerg. Infect. Dis. 16:884-885.
- Garnier T., Eiglmeier K., Camus J., Medina N., Mansoort H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheelert P.R., Parkhill J., Barrel B.G., Cole S.T., Gordon S.V. & Hewinson R.G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc. Natl Acad. Sci. 100:7877-7882.
- IBGE 2014. Amapá, Pecuária. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ap&tema=pecuaria2011>> Acesso em: 20 fev2016.
- Kanameda M. & Ekgatat M. 1995. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the water buffalo (*Bubalus bubalis*). Trop. Anim. Health Prod. 27:227-228.
- Lahlou O., Millet J., Chaoui I., Sabouni R., Filali-Maltouf A., Akrim M., El Mzibri M., Rastogi N., El Aouad R. 2012. The genotypic population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Moroccan patients reveals a predominance of Euro-American lineages. PLoS One 7:e47113.
- Laise C.J.M., Gavier-Widén D., Ramis G., Bila C.G., Machado A., Quereda J.J., Agren E.O. & Van Helden P.D. 2011. Characterization of tuberculous lesions in naturally infected African buffalo (*Syncerus caffer*). J. Vet. Diagn. Invest. 23:1022-1027.
- Moda G., Daborn C.J., Grange J.M. & Cosivi O. 1996. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. Tuberc. Lung Dis. 77:103-108.
- Mostowy S., Inwald J., Gordon S., Martin C., Warren R., Kremer K., Cousins D. & Behr M.A. 2005. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. J. Bacteriol. 187:6386-6395.
- Muller B., Klerk-Lorist L., Henton M.M., Lane E., Parsons S., Van Pittius N.C.G., Kotze A., Van Helden P.D. & Tanner M. 2011. Mixed infections of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and nontuberculous mycobacteria in South African antelopes presenting with tuberculosis-like lesions. Vet. Microbiol. 147:340-345.
- Parra A., García N., Lacombe A., Moreno F., Freire F., Moran J. & Hermoso de Mendoza J. 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 127:315-324.
- Parsons S.D., Drewe J.A., Gey van Pittius N.C., Warren R.M. & van Helden P.D. 2013. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. Emerg. Infect. Dis. 19:2004-2007.
- Pérez-Lago L., Navarro Y. & García-de-Viedma D. 2014. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: a review. Res. Vet. Sci. 97:594-5100.
- Pinto P.S.A. 2003. Atualização em controle da tuberculose no contexto de inspeção de carnes. Bioscience J. 19:115-121.
- Proaño-Pérez F., Benitez-Ortiz W., Desmecht D., Coral M., Ortiz J., Ron L., Portaels F., Rigouts L. & Linden A. 2011. Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. Prev. Vet. Med. 101:65-72.
- Prodinger W.M., Indra A., Koksalan O.K., Kilicaslan Z. & Richter E. 2014. *Mycobacterium caprae* infection in humans. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 12:1501-1513.
- Reddington K., O'Grady J., Dorai-Rai S., Niemann S., Van Sooling D. & Barry T. 2011. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. PLoS One 6:1-8.
- Riet-Correa F. & Garcia M. 2006. Tuberculose, p.351-362. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Lemos R.A.A. Doenças de Ruminantes e Equinos. Vol.1. 2ª ed. Varela, São Paulo.
- Rodriguez S., Bezos J., Romero B., Juan L., Álvarez J., Castellanos E., Moya N., Lozano F., Javed M.T., Sáez-Llorente J.L., Liébana E., Mateos A., Dominguez L. & Aranaz A. 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. Emerg. Infect. Dis. 17:532-535.
- Rodwell T.C., Moore M., Moser K.S., Brodine S.K. & Strathdee S.A. 2008. *Mycobacterium bovis* tuberculosis in binational communities. Emerg. Infect. Dis. 14:1-16.
- Sahraoui N., Muller B., Guetarni D., Boulahbal F., Yala D., Ouzrout R., Berg S.,

- Smith N.H. & Zinsstag L. 2009. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. BMC Vet. Res. 5:4.
- Sauret J., Jolis R., Ausina V., Castro E. & Cornudella R. 1992. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. Tuber. Lung Dis. 73:388-391.
- Shah D.H., Rishendra V., Bakshi C.S. & Singh R.K. 2002. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett. 214:39-43.
- Souza M.A., Bombonato N.G., Soares P.M., Ramos G.B., Santos M.P., Ganda M.R. & Lima-Ribeiro A.M.C. 2014. Frequência de lesões macroscópicas em carcaças de bovinos reagentes ao teste tuberculínico. Arq. Inst. Biológico, São Paulo, 31:363-367.
- Sulieman M.S. & Hamid M.E. 2002. Identification of acid fast bacteria from caseous lesions in cattle in Sudan. J. Vet. Med. 49:415-418.
- Sunder S., Lanotte P., Godreuil S., Martin C., Boschioli M.L. & Besnier J.M. 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. J. Clin. Microbiol. 47(4):1249-1251.
- Thacker T.C., Harris B., Palmer M.V. & Waters W.R. 2011. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. BMC Vet. Res. 7:50.
- Thoen C., Lobue P. & De Kantor I. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet. Microbiol. 112:339-345.
- Torres-Gonzales P., Soberanis-Ramos O., Martinez-Gamboa A., Chavez-Mazari B., BarriosHerrera M.T., Torres-Rojas M., Cruz-Hervert L.P., Garcia-Garcia L., Singh M., Gonzales-Aguirre A., Leon-Gardun A.P., Sifuentes-Osornio J. & Bombadilla-del-Valle M. 2013. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. PLoS Negl. Trop. Dis. 7:1-8.
- Van Ingen J., Rahim Z., Mulder A., Boeree M.J., Simeone R., Brosch R. & Van Soolingen D. 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. Emerg. Infect. Dis. 18:653-655.
- Varello K., Pezzolato M., Mascarino D., Ingraville F., Cramelli M. & Bozzeta E. 2008. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. J. Vet. Diagn. Invest. 20:164-169.
- Wangoo A., Johnson L., Gough J., Ackbr R., Inglut S., Hicks D., Spencer Y., Hewinson G. & Vordermeier M. 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gd (WC1C) T cells and CD 68C cells. J. Comp. Pathol. 133: 223-234.
- Watrelet-Virieux D., Drevon-Gaillot, Toussaint Y. & Belli P. 2006. Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. J. Vet. Med. B 53:321-325.
- Whipple D.L., Bolin C.A. & Miller J.M. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. J. Vet. Diagn. Invest. 8:351-354.
- Zanini M.S., Moreira E.C., Lopes M.T., Oliveira R.S., Leão S.C., Fioravanti R.L., Roxo E., Zumarraga M., Romano M.I., Cataldi A. & Salas C.E. 2001. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96:809-813.